



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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES A PARTIR DE RESÍDUOS
VEGETAIS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção
do título de Doutora em Ciências Biológicas
(Botânica).

BOTUCATU - SP

- 2017 -

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

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES A PARTIR DE RESÍDUOS
VEGETAIS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO

PROF^a ADJUNTA LUCIANA FRANCISCO FLEURI
ORIENTADORA

PROF^a DR^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES
CO-ORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção
do título de Doutora em Ciências Biológicas
(Botânica).

BOTUCATU - SP
- 2017 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Clarissa, Hamaio Okino Delgado.

Desenvolvimento de biocatalisadores a partir de resíduos vegetais para aplicação em biorremediação e produção de biodiesel. – 2017.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2017.

Orientadora: Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Márcia Ortiz Mayo Marques

Assunto CAPES:

1. Bioquímica vegetal

CDD

Palavras-chave: lipases, resíduos de laranja, biorremediação, biodiesel, óleos vegetais



DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha família.

Aos meus pais que são meu porto seguro.

À minha irmã, minha maior incentivadora e amiga.

*Ao meu marido por todo amor, companheirismo, respeito e amizade recebidos nesses
11 anos compartilhados.*

*Ao meu filho por todo amor que fez crescer em mim e por me mostrar a importância e
alegria de cada pequena conquista.*

Agradecimentos

À minha orientadora a professora doutora Luciana Francisco Fleuri por todo o apoio técnico científico, amizade, dedicação e respeito; mas principalmente, por acreditar em mim, o que me faz querer melhorar sempre e almejar objetivos cada vez maiores. Tenho certeza que nossa parceria ainda renderá muito frutos e permanecerá por muitos anos.

Aos meus colegas de laboratório, Paula, Mayara, Débora, Milene, Mirela, Valesca, Júlia, Bruna, Giovanna, Samara, Thiago, Celina e João, pela ajuda, companheirismo, amizade e por tornarem nosso dia-a-dia prazeroso e produtivo.

À minha banca de qualificação e defesa, composta pelos professores doutores Cláudio Aguiar, Valber Pedrosa, Marcela Pavan Bagagli e Carmen Boaro por avaliarem meu trabalho e pelas contribuições que com certeza o enriqueceram.

À empresa JBT Food Tech por ter cedido as amostras de resíduos de laranja e os dados de balanço de massas, representada pela Daniela Kharfan, a quem também agradeço pelos esforços em aproximar empresas e universidades.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas – IAC por ter cedido os equipamentos e estrutura para realização das análises. À minha co-orientadora a professora doutora Márcia Ortiz Mayo Marques por todo o apoio técnico, companhia e respeito. Nossa parceria me fez enxergar este trabalho por outra visão o que com certeza o enriqueceu.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Botânica, em especial à professora doutora Carmen Boaro por buscar melhorar nosso programa e por tratar a todos com carinho e respeito.

Ao Departamento de Química e Bioquímica, em especial aos professores doutores William Zambuzzi e Giuseppina Lima e aos servidores Gabriela e Augusto pelo auxílio na realização das análises, conversas e conselhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa de pesquisa (processo nº 2014/10962-7) e auxílio regular à pesquisa (processo nº 2015/01753-8);

e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	14
ABSTRACT	15
INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica: Análise do processamento de frutas no Brasil para inclusão de processos para obtenção de lipases e outros produtos biotecnológicos	22
1.1 Introdução	22
1.2 Lipases vegetais - papéis biológicos, características e discussão sobre o uso de resíduos como fonte.....	23
1.3 Análise dos resíduos do processamento de frutas para uso em aplicações biotecnológicas e perspectivas de biorefinarias	35
1.4 Conclusão	40
1.5 Referências bibliográficas.....	41
CAPÍTULO 2: Atividade enzimática e caracterização de extratos de resíduos de laranja variedade Hamlin	51
2.1 Introdução	51
2.2 Material e métodos	52
2.2.1 Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco.....	52
2.2.2 Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja	53
2.2.3 Atividade de lipase e influência do pH e temperatura	53
2.2.4 Estudo de especificidade	53
2.2.5 Análises estatísticas.....	54

2.3	Resultados	54
2.3.1	Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco.....	54
2.3.2	Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja	56
2.4	Discussão.....	62
2.4.1	Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco.....	62
2.4.2	Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja	63
2.5	Conclusão	64
2.6	Agradecimentos.....	65
2.7	Referências bibliográficas.....	65
CAPÍTULO 3: Otimização da atividade de lipases obtidas de resíduos laranja por sinergismo com lipases fúngicas e imobilização enzimática.....		68
3.1	Introdução	68
3.2	Material e métodos	69
3.2.1	Extratos lipolíticos	69
3.2.2	Atividade de lipase	71
3.2.3	Efeito sinérgico	71
3.2.4	Maximização da atividade lipolítica	71
3.2.5	Efeito de solventes orgânicos.....	71
3.2.6	Efeito do Ultrassom.....	72
3.2.7	Estudo de especificidade	72
3.2.8	Imobilização.....	72

3.3	Resultados	73
3.3.1	Efeito sinérgico	74
3.3.2	Maximização da atividade lipolítica com a combinação de extratos 50%F/25% V	76
3.4	Discussão.....	79
3.5	Conclusão.....	83
3.6	Referências bibliográficas	83
CAPÍTULO 4: Biorremediação de resíduos de óleo de cozinha por lipases obtidas de resíduos de laranja – Modificação por hidrólise e alcoólise e análise de citotoxicidade.		
4.1	Introdução	87
4.2	Material e métodos	89
4.2.1	Obtenção, concentração, determinação e identificação de lipases.....	89
4.2.2	Preparo do resíduo de óleo	90
4.2.3	Tratamento do óleo de soja cru e seu resíduo	90
4.2.4	Hidrólise.....	91
4.2.5	Alcoólise	92
4.2.6	Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por cromatografia gasosa	92
4.2.7	Citotoxicidade	93
4.2.8	Adequação do meio reacional	94
4.2.9	Planejamento dos blocos experimentais.....	94
4.3	Resultados e discussão	96

4.3.1	Obtenção, concentração, determinação e identificação de lipase	96
4.3.2	Tratamento do óleo de soja cru e seu resíduo	99
4.3.3	Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por CG	100
4.3.4	Citotoxicidade	106
4.4	Conclusão	111
4.5	Agradecimentos.....	111
4.6	Referências bibliográficas.....	111
CAPÍTULO 5: Produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise enzimática e química: análise da viabilidade reacional e estimativa de custo.		116
5.1	Introdução	116
5.2	Material e métodos.....	117
5.2.1	Viabilidade reacional - modificação de óleos vegetais visando à produção de biodiesel	118
5.2.2	Catálise enzimática.....	118
5.2.3	Catálise química	119
5.2.4	Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por CG	119
5.2.5	Estimativa de custos.....	120
5.2.6	Disponibilidade das matérias primas, rendimento e custo do óleo	120
5.2.7	Estimativa de custos para o processamento de óleos em biodiesel por catálise química e enzimática.....	121
5.3	Resultados e discussão	124
5.3.1	Viabilidade reacional	124

5.3.2	Estimativa de custos	130
5.3.3	Disponibilidade das matérias primas, rendimento e custo do óleo	130
5.3.4	Estimativa de custos para o processamento de óleos em biodiesel por catálise química e enzimática.....	131
5.3.5	Discussão geral.....	137
5.4	Conclusão	141
5.5	Agradecimentos.....	141
5.6	Referências bibliográficas	142
CONCLUSÃO GERAL		147
PERSPECTIVAS		148
ANEXO I		a

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura I.1 Fluxograma de experimentos e produtos científicos gerados	18
--	----

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Fluxograma dos resíduos gerados no processamento de frutas com sugestões de aplicações biotecnológicas.....	39
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Balanço de massas de suco de laranja de diferentes variedades (safras de 07/08 a 15/16)	55
Figura 2.2 Balanço de massas dos resíduos do processamento de suco de laranja de diferentes variedades, safras de 2007/08 a 2015/16.....	56
Figura 2.3 Atividade de lipase de laranja variedade Hamlin em substratos p-NP (para-nitrofenil).....	57
Figura 2.4 Estudo de pH ótimo de extratos resíduos de laranja Hamlin.....	58

Figura 2.5 Estudo de pH de estabilidade de extratos resíduos de laranja Hamlin	59
Figura 2.6 Estudo de temperatura ótima de extratos resíduos de laranja Hamlin.....	60
Figura 2.7 Estudo de temperatura de estabilidade de extratos resíduos de laranja Hamlin	61
Figura 2.8 Panorama do processamento de laranja para suco no Brasil e análise de seus resíduos como fonte de lipase	64
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1 Efeito de solventes na atividade de lipase de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato.	76
Figura 3.2 Efeito de ultrassom na atividade de lipase de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato.....	77
Figura 3.3 Atividade de lipase em substratos sintéticos de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato.....	78
Figura 3.4 Imobilização por adsorção e encapsulamento de extratos fúngico e vegetal isolados e combinados.....	79
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1 Zimograma de lipases contidas nos extratos obtidos de resíduos de laranja; a) zimograma do padrão de peso molecular	99
Figura 4.2 Hidrólise de óleo de soja catalisado por lipases de resíduos de laranja e comercial.	100
Figura 4.3 PCA aplicada à composição química (ácidos graxos) das amostras da reação de alcoólise.....	101
Figura 4.4 Dendograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster) das amostras de alcoólise catalisada por lipases.....	102
Figura 4.5 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 3 das amostras de alcoólise catalisada por lipases.	103
Figura 4.6 PCA aplicada à composição química (ácidos graxos) das amostras da reação de hidrólise catalisada por lipases.....	104
Figura 4.7 Dendograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster) das amostras da reação de hidrólise catalisada por lipases..	105
Figura 4.8 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 5, das amostras de hidrólise catalisada por lipases.....	105

Figura 4.9 Ensaio de citotoxicidade por alcoólise e por hidrólise	110
---	-----

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 PCA aplicada à composição química (ácidos graxos) das amostras.	126
---	-----

Figura 5.2 Dendograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster).	127
--	-----

Figura 5.3 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 6.	128
---	-----

Figura 5.4 Oleaginosas alternativas para produção de biodiesel nas diferentes regiões do Brasil	139
---	-----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 Espécies utilizadas como fonte de lipases comerciais	26
---	----

Tabela 1.2 Potencial de resíduos vegetais para obtenção de lipases.....	35
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Efeito sinérgico de extratos lipolíticos fúngico e vegetal na atividade de lipase utilizando o óleo de oliva como substrato.....	74
---	----

Tabela 3.2 Efeito sinérgico de extratos fúngico e vegetal na atividade de lipase utilizando o óleo de oliva como substrato (comparação entre valores teóricos e observados).....	75
--	----

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 Tratamentos para o estudo de biorremediação utilizados nos ensaios titulométricos, na identificação de compostos por cromatografia gasosa e cultivo celular.	91
--	----

Tabela 4.2 Concentração de extratos de lipase obtidos de resíduos de laranja.....	97
---	----

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1 Rendimento da modificação de óleos vegetais por catálise química e enzimática	125
--	-----

Tabela 5.2 Estimativa de custo da extração de óleos vegetais.....	131
---	-----

Tabela 5.3 Estimativa de custo da produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise química.....	134
---	-----

Tabela 5.4 Estimativa de custo da produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise enzimática	135
---	-----

OKINO-DELGADO, C. H. DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES A PARTIR DE RESÍDUOS VEGETAIS PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIODIESEL. 2017. 134P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO

O processamento agroindustrial brasileiro tem buscado converter cada vez mais seus resíduos em subprodutos. Neste contexto, o processamento de frutas se destaca devido à riqueza de composição das partes inicialmente consideradas resíduos, que podem incluir biomoléculas de elevado valor como enzimas e compostos bioativos. Dentre as enzimas estão as lipases que catalisam reações de hidrólise e síntese de glicerídeos e que possuem expectativas de crescimento de mercado promissoras devido à atual demanda por biocombustíveis e biorremediação. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou os resíduos do processamento de laranja para suco e verificou que esses podem ser utilizados como fontes diretas de lipases. As lipases de laranja possuem elevada atividade em reações de hidrólise e síntese, em faixa de pH ácida a alcalina (6,0 a 8,0), termoestabilidade até 50°C e afinidade por substratos de diferentes tamanhos de cadeia (p-nPP, p-NPL e PNPB); podem ser concentradas por precipitação com sulfato de amônio e imobilizadas por adsorção; apresentam efeito sinérgico com lipases fúngicas e potencial para aplicação na biorremediação de resíduos de óleo de cozinha. Os resultados obtidos estão apresentados em 5 capítulos, sendo que o primeiro é composto pela revisão bibliográfica sobre o potencial dos resíduos gerados no processamento de frutas brasileiras como fontes de lipases e a inclusão desse processo no conceito de biorrefinarias; o segundo descreve a obtenção e caracterização bioquímica de lipases obtidas de resíduos de laranja de diferentes variedades; o capítulo 3 apresenta a otimização da atividade dessas lipases por imobilização e sinergismo com lipases fúngicas; no capítulo 4 consta a avaliação das lipases de laranja na biorremediação de óleo de cozinha; e o capítulo 5 descreve o estudo sobre a viabilidade financeira e bioquímica da produção de biodiesel por catálise química e enzimática a partir de diferentes óleos vegetais.

Palavras-chave: lipases, resíduos de laranja, biorremediação, imobilização, biodiesel, óleos vegetais

ABSTRACT

Brazilian agroindustrial processing has sought the maximum conversion of waste into by-products. In this context, the fruit processing stands out due to the rich composition of the parts initially considered as residues, which may include high value biomolecules such as enzymes and bioactive compounds. Among the enzymes are lipases that catalyze reactions of hydrolysis and synthesis of glycerides and which have promising market growth expectations due to the current demand for biofuels and bioremediation. In this context, the present work evaluated the wastes from processing from orange to juice and found that these can be used as direct sources of lipases. Orange lipases have high activity in hydrolysis and synthesis reactions, ranging from acid to alkaline pH (6.0 to 8.0), thermostability up to 50 ° C and affinity for substrates of different chain sizes (p-nPP, P-NPL and PNPB); this can be concentrated by ammonium sulfate precipitation and immobilized by adsorption; and have a synergistic effect with fungal lipases and potential for application in bioremediation of cooking oil residues. The results obtained are presented in five chapters. The first one consists of the bibliographical review on the potential of the residues generated in the processing of Brazilian fruits as sources of lipases and the inclusion of this process in the concept of biorefineries; The second describes the obtaining and biochemical characterization of lipases obtained from orange residues of different varieties; Chapter 3 presents the optimization of the activity of these lipases by immobilization and synergism with fungal lipases; Chapter 4 includes the evaluation of orange lipases in bioremediation of cooking oil; And chapter 5 describes the study on the financial and biochemical viability of biodiesel production by chemical and enzymatic catalysis from different plant oils.

Keywords: lipase, orange waste, bioremediation, immobilization, biodiesel, plant oil

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil produziu cerca de 270 milhões de toneladas de alimentos, incluindo grãos, frutas e hortaliças no ano de 2015 (IBGE, 2017; CONAB, 2015). Parte desse total passa por algum tipo de processamento, o que contribui para a preservação da qualidade e quantidade, além de aumentar o valor agregado da fruta em relação ao produto *in natura* (SEBRAE, 2015; FAO, 2014). Porém, apenas uma parcela do volume total da produção agrícola é convertida em produto final, sendo que, os resíduos gerados são parcialmente reutilizados e o restante é descartado (MARTÍNEZ et al., 2012).

Esses resíduos gerados são regulamentados e fiscalizados por órgãos governamentais distintos em diferentes instâncias. Além disso, outros termos são comumente utilizados para denominar os resíduos, o que acaba por dificultar a padronização das terminologias. Por isso, a seguir estão descritas as definições oficialmente aceitas dos termos associados aos resíduos.

A lei número 12.305, de 2 de agosto de 2010, institui a política nacional de resíduos sólidos e define os termos:

Resíduo sólido: material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, e cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos, cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível.

Rejeitos: resíduos sólidos que, depois de esgotadas todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis, não apresentem outra possibilidade que não a disposição final ambientalmente adequada.

Já o decreto lei número 73/2011, de 17 de junho de 2011, decretada pelo Ministério do Meio ambiente define:

Resíduo: quaisquer substâncias ou objetos de que o detentor se desfaz ou tem a intenção ou a obrigação de se desfazer.

Reutilização: qualquer operação mediante a qual produtos ou componentes que não sejam resíduos são utilizados novamente para o mesmo fim para que foram concebidos.

Valorização: qualquer operação, cujo resultado principal seja a transformação dos resíduos de modo a servirem um fim útil, substituindo outros materiais que, caso contrário, teriam sido utilizados para um fim específico ou a preparação dos resíduos para esse fim na instalação ou conjunto da economia.

Subproduto: a quaisquer substâncias ou objetos resultantes de um processo produtivo cujo principal objetivo não seja a sua produção quando verificadas as seguintes condições: a) Existir a certeza de posterior utilização da substância ou objeto; b) A substância ou objeto poder ser utilizado diretamente, sem qualquer outro processamento que não seja o da prática

industrial normal; c) A produção da substância ou objeto ser parte integrante de um processo produtivo; e d) A substância ou objeto cumprir os requisitos relevantes como produto em matéria ambiental e de proteção da saúde e não acarretar impactos globalmente adversos do ponto de vista ambiental ou da saúde humana, face à posterior utilização específica.

Neste contexto, o cenário de manejo de resíduos vem sendo alterado pela inclusão de processos para obtenção de novos produtos que utilizam resíduos como matéria-prima, que visam obter subprodutos a partir de resíduos (DHILLON et al., 2016). Entre esses produtos estão as lipases, capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de triglicerídeos. Essas enzimas possuem grande demanda mercadológica, com expectativas promissoras de crescimento de mercado, devendo chegar a cerca de 600 milhões de dólares anuais até 2020 (MARKETS AND MARKETS, 2015). Porém, apesar de estarem presentes em elevada diversidade de plantas, animais e micro-organismos, as lipases comerciais são obtidas de apenas algumas fontes a valores elevados. Essa situação torna aplicações que requerem quantidades elevadas de enzimas de baixo custo, como a produção de biodiesel e biorremediação, impraticáveis.

Dessa forma, estudos sobre novas fontes de lipases com alta atividade e características bioquímicas diversas, por métodos simples, de baixo custo e de fontes abundantes como os resíduos agroindustriais são especialmente atrativos. Podem inclusive, auxiliar a reduzir os valores das enzimas comerciais viabilizando aplicações como a biorremediação e produção de biodiesel por catálise enzimática.

Para isso, o presente estudo considerou todo o material gerado no processamento de laranja não convertido em suco como resíduo. Esses resíduos são subdivididos em diferentes frações durante o processo de extração de suco, pois, cada uma recebe destinação distinta. O número de frações geradas varia de acordo com o equipamento e configurações utilizadas, sendo que neste estudo foram utilizados os resíduos gerados pelo uso da extratora *in line* da empresa J. B. T. Food Tech, na configuração padrão. Essa extratora separa os resíduos em três frações denominadas casca, que corresponde ao epicarpo do fruto e é utilizado para extração de pectina; o fragmento de casca, *frit*, que corresponde à parte mais externa do epicarpo e é utilizada para extração de óleo essencial; e o bagaço, que corresponde ao mesocarpo. Após a extração, o suco ainda contém interferentes que são removidos em

equipamentos adicionais denominados *finishers* (despolpadeiras), os quais separam o suco do resíduo denominado polpa (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016; J. B. T. Food Tech, 2013).

Assim, o estudo aqui apresentado avaliou a reutilização dos resíduos de laranja para sua valorização pela obtenção direta de lipases. A Figura I.1 apresenta o fluxograma que descreve os experimentos realizados durante o desenvolvimento dessa pesquisa e indica qual produto científico (patente/artigo) foi gerado.

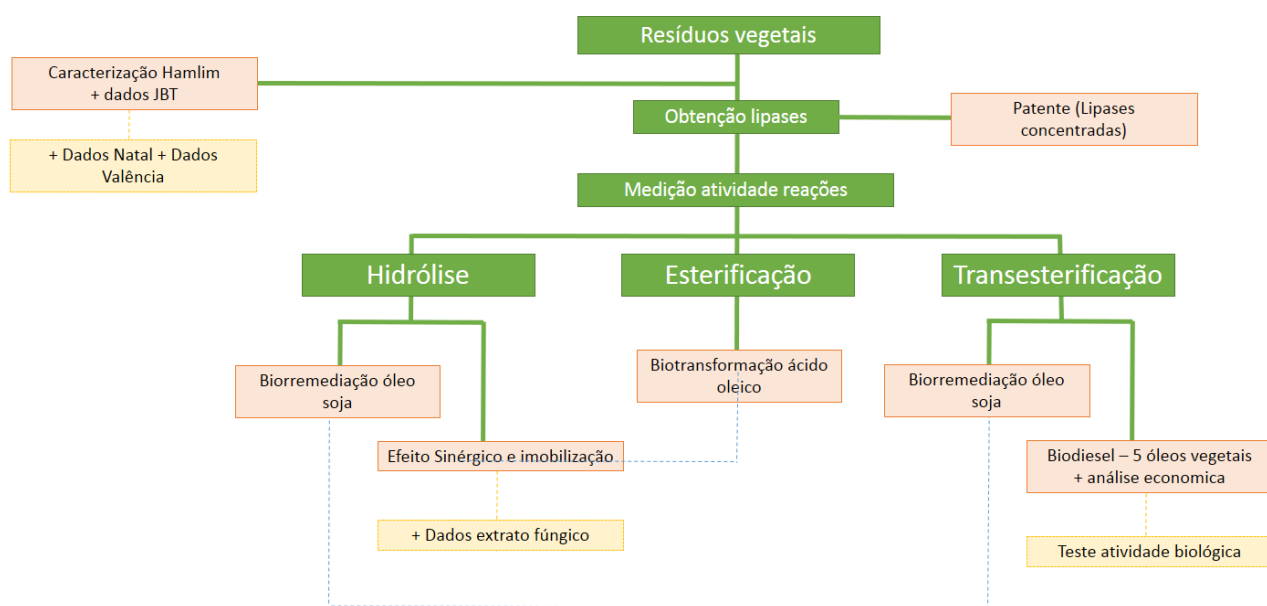


Figura I.1 Fluxograma de experimentos e produtos científicos gerados

O capítulo 1 intitulado “Análise do processamento de frutas no Brasil para inclusão de processos para obtenção de lipases e outros produtos biotecnológicos” é composto pela revisão bibliográfica que contextualiza o cenário do processamento de frutas no Brasil e indica quais resíduos e subprodutos são gerados a partir das principais frutas processadas no país. Entre as frutas estudadas, os resíduos de laranja, manga, mamão e dendê apresentaram maior potencial como fontes diretas de lipases, devido às características das enzimas e dos processos utilizados. Este estudo também propôs a inclusão desse e de outros produtos na cadeia produtiva de frutas dentro do conceito de biorrefinarias.

O capítulo 2 intitulado “Atividade enzimática e caracterização de extratos de resíduos de laranja variedade Hamlin” avaliou se há diferenças entre as frações de resíduos de laranja das principais variedades utilizadas para a extração. Para isso, foram analisados os dados de balanço de massas do processamento de laranja entre as safras de 2007 a 2016 das variedades de laranja Hamlin, Pera, Valência e Natal, que foram fornecidos pelo departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa JBT Food Tech. Apresenta também os dados da caracterização bioquímica de lipases de resíduos de laranja da variedade Hamlin e as compara com os dados da variedade Pera obtidos durante o mestrado da referida aluna. Os resultados apresentados neste estudo serão publicados juntamente com os de caracterização de lipases de resíduos de laranja das variedades Valência e Natal obtidos pelo mesmo grupo de pesquisa em formato de artigo científico.

Durante a pesquisa também foram conduzidos experimentos sobre a concentração de extratos brutos de lipases obtidos de resíduos de laranja. Os resultados foram publicados no formato de patente depositada no INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial, número do processo BR1020150180888 com o título de “Obtenção e processamento de extratos lipolíticos de resíduos da laranja”. Por incluir informações confidenciais, os resultados deste estudo não foram incluídos neste documento, mas, como evidência do processo patentado foi anexado o recibo de depósito da referida patente.

No decorrer dos experimentos foi verificado que os extratos brutos de lipases de laranja apresentam a atividade catalítica reduzida na presença de solventes orgânicos, o que dificulta sua aplicação em reações de síntese, como a alcoólise, assim como em processos de purificação que utilizam reagentes como acetona. Assim, foram conduzidos estudos com o objetivo de atenuar essa sensibilidade. Para isso, foram avaliadas diferentes abordagens para essa finalidade, a saber: efeito sinérgico com lipases fúngicas com o objetivo de aumentar a transformação final; diminuição do tempo de exposição das lipases pelo uso de ultrassom; e aumento da resistência às alterações do meio reacional por imobilização enzimática por adsorção e encapsulamento. Os resultados foram descritos no capítulo 3 intitulado “Otimização da atividade de lipases obtidas de resíduos laranja por sinergismo com lipases fúngicas e imobilização enzimática” e serão publicados no formato de artigo científico.

Já no capítulo 4 intitulado “Biorremediação de resíduos de óleo de cozinha por lipases obtidas de resíduos de laranja – Modificação por hidrólise e alcoólise e análise de citotoxicidade”, constam as análises da aplicação de lipases de laranja e comerciais na biorremediação de resíduos de óleo de cozinha. Este trabalho também será publicado no formato de artigo científico.

Além disso, essas enzimas foram avaliadas quanto à aplicabilidade na produção de biodiesel e os resultados deste estudo estão descritos no capítulo 5 intitulado “Produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise enzimática e química: estimativa de custo e análise da viabilidade enzimática”. O objetivo do trabalho foi avaliar se diferentes matérias-primas oleaginosas vegetais, disponíveis no Brasil, podem ser utilizadas para a produção de biodiesel em relação à viabilidade reacional, ou seja, se os catalisadores testados apresentam rendimento satisfatório na conversão de triglicerídeos a ésteres de ácidos graxos; e, em caso afirmativo, se os custos dessa conversão são compatíveis ao preço final para o biodiesel comercializado. Para isso, foram testados catalisadores enzimáticos e químicos na alcoólise de óleos vegetais e esterificação do ácido oleico. Além disso, foram avaliados os valores de fatores de impacto no custo final em reais por litro de biodiesel, produzido por catálise química e enzimática a partir de 9 matérias-primas vegetais. Os resultados serão publicados no formato de artigo científico.

Após a apresentação dos capítulos foram inseridos a conclusão geral e perspectivas sobre os trabalhos realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CONAB (2015) Boletim Hortigranjeiro 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em maio de 2017.
- Dhillon G.S.; Kaur S.; Oberoi H.S.; Spier M.R. Brar S.K. (2016) Chapter 2 – Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications. Em: Protein byproducts - transformation from environmental burden into value-added products. Academic-press, 21–36.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization (2014) Disponível em: www.fao.org.
Acessado em maio de 2017.

Markets and Markets (2015) Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022. Disponível em: www.marketsandmarkets.com. Acessado em maio de 2017.

Martínez R.; Torres P.; Meneses M.A.; Figueroa J.G.; Pérez-Álvarez J.A.; Viuda-Martos M. (2012) Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. Food Chemistry, 135(3):1520–1526.

Ministério do Meio Ambiente do Brasil (2010) Lei número 12.305, de 2 de agosto de 2010. Disponível em: www.mma.gov.br. Acessado em junho de 2017.

Ministério do Meio Ambiente do Brasil (2010) Decreto lei número 73/2011, de 17 de junho de 2011. Disponível em: www.mma.gov.br. Acessado em junho de 2017.

Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2016) Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. Food Reviews International, 32: 1–14.

SEBRAE – Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas (2015) Boletim de inteligência 2015 – Agronegócio – Fruticultura. Disponível em: www.bibliotecas.sebrae.com.br

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica: Análise do processamento de frutas no Brasil para inclusão de processos para obtenção de lipases e outros produtos biotecnológicos

1.1 Introdução

O Brasil possui grande extensão territorial e, como consequência, diferentes condições climatológicas e sistemas de cultivo vegetal, destacando-se como o principal produtor e exportador de culturas de diferentes espécies e origens. Na safra de 2014/15 a produtividade de grãos (cereais, leguminosas e oleaginosas), frutas e hortaliças, atingiu aproximadamente 270 milhões de toneladas. Em geral, as estimativas indicam que esse volume continuará crescendo, e que em 2017 a produção brasileira de cereais, leguminosas e oleaginosas deverá ser 20% maior em relação ao ano anterior (IBGE, 2017; CONAB, 2015). Dessa produção, cerca de 200 milhões correspondem a grãos e cereais, que incluem as culturas de soja, girassol, milho, algodão, amendoim, arroz, mamona, aveia, centeio, cevada, trigo e triticale, abrangendo cerca de 58 milhões de hectares majoritariamente concentradas nas regiões sul e centro-oeste do país e conduzidas por grandes produtores agrícolas (IBGE, 2016, MAPA, 2006).

Já em relação às frutas, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial. Os três maiores, China, Índia e Brasil, produziram cerca de 340 milhões de toneladas de frutas em 2012 (SEAB, 2013; FAO 2012; IBGE 2012). O perfil brasileiro difere do mundial, ou seja: as frutas mais produzidas em nosso país são, em ordem decrescente, laranja, banana, coco, abacaxi, mamão, castanha-de-cajú, cajú e castanha-do-Brasil, enquanto, as frutas mais produzidas mundialmente são banana, melancia, maçã, laranja e uva (SEBRAE, 2015, SEAB, 2013). As áreas de produção estão pulverizadas em todo o país, sendo que cada espécie está concentrada na região de melhor adaptação climática e são conduzidas majoritariamente por pequenos produtores (IBGE, 2016; SEBRAE, 2015).

Antes da comercialização, grande parte das frutas passa por algum tipo de processamento, o que contribui para a preservação da qualidade e quantidade, além de aumentar o valor agregado. Em 2013, como exemplo, a indústria de processamento de frutas

e vegetais processou cerca de 136 milhões de toneladas na China; 40 milhões nos EUA; 4,8 milhões na Índia e 23 milhões de toneladas no Brasil (SEBRAE, 2015; FAO, 2014).

O processamento de frutas engloba a produção de sucos integrais e concentrados, frutas e polpas congeladas, compotas e geleias, frutas desidratadas, entre outros produtos (SHARMA et al., 2016; THASSITOU e ARVANITOYANNIS, 2001). Durante o processamento é gerada elevada quantidade de resíduos, que representa elevados gastos com destinação adequada, transporte e tratamento para redução dos danos causados ao meio ambiente. Entretanto, este cenário vem sendo alterado pela inclusão de processos para obtenção de novos produtos que utilizam esses resíduos como matéria-prima (DHILON et al., 2016; MARTÍNEZ et al., 2012). Entre esses produtos estão as lipases, capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de triglicerídeos (FLEURI, 2016; LOPES et al., 2011) e que possuem elevada demanda mercadológica, assim novas fontes de obtenção vêm sendo pesquisadas atualmente.

Neste contexto, o presente trabalho buscou analisar o potencial da indústria brasileira de processamento de frutas para inclusão de processos de obtenção de lipases e outros produtos biotecnológicos a partir de resíduos e discutir a inclusão de novos produtos na cadeia produtiva de frutas no país.

1.2 Lipases vegetais - papéis biológicos, características e discussão sobre o uso de resíduos como fonte

Enzimas são, em geral, proteínas que atuam como biocatalisadores nos seres vivos, acelerando reações bioquímicas. Essa característica faz com que sejam interessantes em aplicações biotecnológicas, já que, em comparação com a catálise química, são mais eficientes, específicas e menos onerosas (BINOD et al., 2013). Mais de 500 produtos, em mais de 150 processos industriais, utilizam enzimas nas mais diversas áreas como alimentos, têxtil, detergentes, lavanderias, alimentação animal, cosméticos, biocombustíveis e química fina (KUMAR et al., 2014). O mercado de enzimas movimentou cerca de 8 bilhões de dólares em 2015 e estimativas indicam que esse mercado continuará crescendo exponencialmente chegando a 17 bilhões de dólares em 2024 (GRAND VIEW RESEARCH, 2016). Esse

aumento está relacionado à crescente demanda populacional por produtos mais sustentáveis como os biocombustíveis produzidos por catálise enzimática; assim como pela demanda por alimentos funcionais com propriedades biológicas, obtidos por processos catalíticos (PRADO et al., 2017; MARKETS AND MARKETS, 2015; KUMAR et al., 2014).

A atividade enzimática está vinculada à estrutura proteica, que define sua função e especificidade, com elevada diversidade de funções. Entretanto, todas as enzimas descritas estão divididas, pela *Enzyme Commission* em apenas 6 grupos de acordo com a reação catalisada mais característica, o que enfatiza o fato de que as reações bioquímicas nos mais diversos seres vivos são catalisadas de maneira similar (DEVASENA, 2010). Assim, a maioria das enzimas pode ser obtida de animais, plantas e micro-organismos.

As enzimas comerciais são obtidas majoritariamente por processos fermentativos (SETH et al., 2014). Porém, as enzimas vegetais apresentam menores custos, pois podem ser obtidas por métodos mais simples e sem necessidade de empregar engenharia genética, o que é comumente utilizado para enzimas microbianas. Estima-se que lipases vegetais podem custar 20 vezes menos do que as obtidas por processos fermentativos, comparando-se os valores por unidade de atividade enzimática (MOUNGUENGUI et al., 2013).

Embora os métodos de obtenção de enzimas vegetais apresentem menores custos, a estrutura para produção vegetal requer grandes extensões territoriais e maior tempo de cultivo em relação aos micro-organismos, por possuírem maior ciclo de desenvolvimento. Já a produção enzimática por processos fermentativos pode ser conduzida em espaços reduzidos e o período de incubação limita-se à apenas alguns dias. No entanto, quando a matéria-prima vegetal empregada para obtenção direta de enzimas consiste em resíduos, os fatores inerentes à produção agrícola, são neutralizados, pois dessa forma seria utilizada fonte vegetal já disponível (FLEURI, 2016).

Entre as enzimas que podem ser obtidas de diferentes fontes e aplicadas em diversas áreas estão as lipases, as quais são capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de glicerídeos. As lipases estão entre os biocatalisadores com expectativas mais promissoras de crescimento de mercado, devendo chegar a cerca de 600 milhões de dólares anuais até 2020,

principalmente devido ao aumento de demanda na Ásia e América Latina em aplicações na área da saúde, biocombustíveis e alimentos (MARKETS AND MARKETS, 2015).

A reação considerada típica catalisada pelas lipases é a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa, por isso, essas enzimas são agrupadas na subclasse das éster-carboxílico hidrolases pela *Enzyme Commission*, codificadas pelo número 3.1.1.3 e denominadas triacilglicerol acilidrolase. A reação de hidrólise de lipídeos consiste no rompimento da ligação éster do glicerídeo produzindo glicerol e ácidos graxos, na presença de água (CASTRO et al., 2004).

Em condições com baixo conteúdo de água as lipases são também capazes de catalisar reações de transesterificação. Nessa reação pode ocorrer alteração na composição e distribuição dos ácidos graxos, pois a troca de radicais acil entre compostos resulta em um glicerídeo diferente do inicial. Sendo que a denominação da reação varia de acordo com a substância utilizada. Assim, é denominada de acidólise quando ocorre entre um éster e um ácido; alcoólise quando o éster é substituído por um álcool; e interesterificação quando ocorre entre ésteres. Nestas reações um ácido graxo, um álcool ou outro éster, reagem com o glicerídeo, resultando no rearranjo dos grupos de ácidos graxos produzindo um novo glicerídeo com propriedades físicas e químicas diversas (CARVALHO et al., 2003; PEREIRA et al., 2003).

As lipases vegetais, em geral, apresentam atividade ótima em ampla faixa de pH, variando de ácida, como as obtidas de frutos de palma (pH 4,5) descritas por Abigor et al. (1985); passando pela neutra, como as de resíduos de laranja (pH de 6,0 a 7,0) descritas por Okino-Delgado e Fleuri (2014); até básica, provenientes de grãos como trigo e soja (pH 8,0) descritas por Gadge et al. (2011) e Kapranchikov et al. (2004). A faixa de temperatura ótima ocorre entre 20 e 40°C (SETH et al., 2014). As lipases vegetais podem ser utilizadas na interesterificação de triglicerídeos de cadeia curta e longa por lipase de mamão para produção e aromas, alcoólise de óleos vegetais para produção de biodiesel por lipases de mamona e colza e hidrólise de triglicerídeos por lipases de cereais para a indústria de alimentos (MOUNGUENGUI et al., 2013; DE MARIA et al., 2006; GANDHI e MUKHERJEE, 2000).

Apesar da expressividade do mercado de lipases e dessas enzimas estarem presentes em plantas, animais e micro-organismos, até 2014 foi apenas de 29 lipases relatadas no banco de dados UniProt, entre as quais apenas algumas foram caracterizadas. A Tabela 1.1. lista fontes utilizadas para obtenção de lipases comerciais, na qual, verifica-se que há um número reduzido de espécies exploradas, entre elas oito fúngicas, duas de leveduras, três bacterianas, uma animal e uma vegetal.

Tabela 1.1 Espécies utilizadas como fonte de lipases comerciais

Empresa	Espécie	Fonte de lipase	Fonte
Sigma Aldrich	<i>Aspergillus niger</i>	Fungo	www.sigmaaldrich.com
Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungo	www.novozymes.com
Amano Enzymes	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bactéria	www.amano-enzyme.co.jp
Sigma Aldrich	<i>Candida antártica</i>	Levedura	www.sigmaaldrich.com
Novozymes	<i>Candida antartica A</i>	Levedura	www.novozymes.com
Novozymes	<i>Candida antartica B</i>	Levedura	www.novozymes.com
c-Lecta	<i>Candida antártica (CalB)</i>	Levedura	www.c-lecta.com
Sigma Aldrich	<i>Candida rugosa</i>	Levedura	www.sigmaaldrich.com
Novozymes	<i>Humicola insolens</i>	Fungo	www.novozymes.com
Sigma Aldrich	Porco (pâncreas)	Animal	www.sigmaaldrich.com
Sigma Aldrich	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Bactéria	www.sigmaaldrich.com
Amano Enzymes	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bactéria	www.amano-enzyme.co.jp
Sigma Aldrich	<i>Rhizomucor miehei</i>	Fungo	www.sigmaaldrich.com
Novozymes	<i>Rhizomucour miehei</i>	Fungo	www.novozymes.com
Sigma Aldrich	<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungo	www.sigmaaldrich.com
Biocon	<i>Rhizopus oryzae</i>	Fungo	www.biocon.es
Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Fungo	www.novozymes.com
Sigma Aldrich	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Fungo	www.sigmaaldrich.com
Sigma Aldrich	Trigo (gérmen)	Vegetal	www.sigmaaldrich.com

O valor das lipases comerciais possui ampla variação, desde cerca de R\$ 2,80/100 U de atividade para a lipase de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) até R\$ 16.000,00/100 U de atividade para a lipase de *Candida antartica* (Sigma-Aldrich®) (SIGMA-ALDRICH, 2017). Essa diferença pode ser explicada pela diversidade das características apresentadas pelas enzimas, dificuldade dos métodos de obtenção, necessidade de purificação e requerimentos inerentes de cada aplicação (BIOCON, 2017; DEVASENA, 2011). Em aplicações, como nas

áreas de química fina e cosméticos, são necessárias reações muito específicas que necessitam de extratos purificados com elevada atividade por grama de extrato, restringindo as lipases que podem ser utilizadas e elevando os custos de obtenção devido à necessidade de purificação. No entanto, há aplicações mais simples, como a modificação de azeite de oliva emulsionado, que a maioria das lipases disponíveis é capaz de catalisar com o uso de extratos menos concentrados e brutos. Além disso, há exigências inerentes da área de aplicação, como ocorre na indústria de alimentos veganos para os quais não é permitido o uso de fontes de origem animal ou microbianas modificadas geneticamente (AMANO ENZYMES, 2017).

Dessa forma, a baixa diversidade de espécies utilizadas como fontes de lipases evidencia a importância das pesquisas por novas fontes dessas enzimas, em especial as provenientes de resíduos vegetais. Além disso, as lipases vegetais podem apresentar características distintas das microbianas possibilitando novas aplicações. Assim, a seguir estão descritas as principais frutas produzidas e processadas no Brasil, os resíduos gerados em seu processamento, as aplicações biotecnológicas e a discussão do potencial de tais resíduos para obtenção de lipases e outros produtos biotecnológicos dentro do conceito de biorrefinaria.

Laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

A laranja é a segunda fruta mais produzida no mundo, chegando a 800 milhões de toneladas por ano, sendo o Brasil o maior produtor. A maior parte da produção brasileira é processada para obtenção de suco concentrado, correspondendo a cerca de 80% do volume total de frutos. Durante este processo os resíduos gerados representam 50% da massa da fruta (SEBRAE, 2015; IPEA, 2012). Estima-se que sejam gerados mais de 15 milhões de toneladas de resíduos de frutas cítricas no mundo (MARIN et al., 2007).

Os principais resíduos gerados a partir do processamento de laranja para suco são denominados de bagaço ou core, que corresponde ao mesocarpo do fruto; casca ou *peel*, composta pelo epicarpo; fragmento de casca ou *frit*, constituída pela parte mais externa do epicarpo; e polpa que corresponde ao endocarpo. Tal fracionamento é obtido pelo uso do equipamento *in line* utilizado pela empresa J.B.T. Food Tech, que é o mais utilizado no

mundo para a extração de suco cítrico (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016; J. B. T. FOOD TECH, 2013; VIDAL e VIDAL, 2006).

Os resíduos cítricos são comumente utilizados para obtenção de polpa desidratada, pectina, fibras e óleo essencial, os quais vêm sendo aprimorados em técnicas como as descritas por Hosseini et al. (2015) para extração de pectina; e Boukroufa et al. (2015) para obtenção de pectina, polifenóis e óleos essenciais. Entretanto, o volume utilizado para essas finalidades é baixo em relação ao total de resíduos produzidos. Dessa forma, a busca por novas aplicações para esses resíduos faz-se necessária como o destino para fins biotecnológicos. Esse foco é possível e promissor pelo fato do processo de extração ser mecânico, totalmente realizado em condições amenas de temperatura e pressão e sem adição de compostos químicos que poderiam desestruturar e/ou diminuir as propriedades biológicas dos compostos presentes nos resíduos (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016; LANIDAYA, 2009).

Os resíduos de laranja também podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos, como no estudo descrito por Madeira Jr. et al. (2014) sobre fermentação em estado sólido por *Paecilomyces variotii*, visando o aumento da capacidade antioxidante e dos compostos hesperidina, naringenina e ácido elágico. Assim como, no descrito por Mantzouridou et al. (2015) que utilizou a fermentação pela levedura comercial Vitilevure MT (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de aromas. Em outros estudos, o bagaço foi utilizado como substrato em processos fermentativos para produção de biogás e metano (ERDORGAN et al., 2015) e a casca testada como combustível sólido e como bioadsorvente de metais pesados (SANTOS et al., 2015).

Esses resíduos também podem ser utilizados como fontes diretas de lipases, como descrito por Okino-Delgado e Fleuri (2014). As lipases de resíduos de laranja têm sido aplicadas no estudo de biorremediação de resíduos de óleo de cozinha e modificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. Além disso, outros trabalhos como o descrito por Francisco (2017) propõem a aplicação dessas enzimas para bioconversão de óleos vegetais visando o aumento de atividade biológica para fins farmacêuticos, demonstrando a versatilidade dessas enzimas.

Manga (*Mangifera indica* L.)

A manga está entre as frutas tropicais mais produzidas no mundo, incluindo o Brasil que é o sétimo maior produtor e segundo maior exportador, abrangendo uma área de 66 mil hectares concentrados nas regiões sudeste e nordeste do país (FAO, 2012; EMBRAPA, 2010).

A composição da fruta, bem como dos seus resíduos, varia de acordo com as condições edafoclimáticas de cultivo, ponto de maturação e variedade. Entretanto, em geral, a polpa corresponde a 60% da massa total do fruto e é constituída por carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas, minerais, fibras, taninos, polifenóis, flavonoides, alcaloides, pigmentos e compostos aromáticos (DAR et al., 2016; JAHURUL et al., 2015; MA et al., 2011). A casca corresponde a cerca de 25% da massa do fruto e é construída por fibras, minerais, mono e diterpenos e os compostos antioxidantes como os compostos fenólicos mangiferina, kampferol, quercetina e antocianinas. Já as sementes correspondem a aproximadamente 15% da massa total do fruto e são constituídas por amido, fibras, lipídeos, tocoferóis e esteróis como o campesterol, stigmaterol e β -sitosterol (JAHURUL et al., 2015).

Esses resíduos podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos como no estudo descrito por Fernando et al. (2014), no qual polpa e resíduos foram utilizados como substrato pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y2034 para produção de bioetanol. Podem ainda ser utilizados para extração de pectina como no estudo descrito por Pandit et al. (2015).

O estudo descrito por Okino-Delgado (2014) descreve a obtenção direta de lipases a partir da casca e a polpa de manga da variedade Tommy Atkins, cujas enzimas apresentam atividade ótima em azeite de oliva em pH de ácido a neutro e temperaturas até 50°C. O que demonstra que os resíduos do processamento de manga poderiam ser utilizados como fontes diretas de lipases.

Uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis lobruscas* L.)

Mundialmente, foram produzidos cerca de 74 milhões de toneladas de uvas na safra 2013/14. A produção se concentra na Europa, representando mais de 50% de todas as uvas colhidas mundialmente, principalmente na Itália, França e Espanha (UVIBRA, 2015). No

Brasil foram produzidas cerca de 1,5 milhões de toneladas de uvas na safra 2014/15, concentradas em poucas regiões, sendo a principal a serra gaúcha localizada no Rio Grande do Sul, onde a maior parte da produção é destinada para o processamento para vinho e sucos (EMBRAPA, 2015).

As cascas e sementes de uva provenientes do processamento para vinhos são ricas em compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácidos fenólicos, com estrutura considerada ideal para sequestro de radicais livres, com elevada ação antioxidante, por isso, vêm sendo estudadas para aplicações no tratamento e prevenção de doenças degenerativas e tumorais, na conservação de alimentos, em cosméticos para a prevenção do envelhecimento precoce, entre outras (NOGALES-BUENO et al., 2017; RIEBEL et al., 2017; DE CAMARGO et al., 2014). Estudos conduzidos por De Camargo et al. (2016) concluíram que compostos fenólicos extraídos de resíduos de uva foram capazes de inibir a ação das enzimas α -glucosidade e lipases e, por isso, poderiam ser utilizados no tratamento de doenças como diabetes e obesidade.

As sementes de uva contêm aproximadamente 15% de conteúdo lipídico e são utilizadas, principalmente na Europa, para obtenção de óleo. No Brasil, a extração de óleo ainda é baixa, mas possui elevado potencial de crescimento devido à versatilidade de aplicação nas indústrias alimentícia, de cosméticos e de biodiesel (FREITAS, 2007).

Os frutos e resíduos da uva são fontes de quitinases, endoglicosil-hidrolases, que catalisam a hidrólise de ligações β -1,4 da quitina, que por sua vez, estão entre as fontes mais abundantes de carboidratos e estão presentes em exoesqueletos de insetos e crustáceos e na parede celular de fungos. Dessa forma, as quitinases presentes nos vegetais estão associadas ao mecanismo de defesa de plantas, já que, a quitina degradada pelas quitinases é o principal componente do exoesqueleto dos insetos. O ataque à planta desencadeia processos metabólicos que induzem o aumento na produção de etileno e ácido salicílico, que, por sua vez, estimulam a produção de quitinases, acarretando aumento da sua concentração em frutos imaturos. Nessas condições, essas enzimas podem corresponder a 50% da concentração das proteínas solúveis encontradas nos frutos (GOMES et al., 2010; PATEL et al., 2009).

Extratos de sementes de uva possuem ação inibitória em lipases pancreáticas e colesterol esterases e, por isso, vêm sendo estudadas para o uso no tratamento e prevenção de obesidade de hiperlipidemia (ADISAKWATTANA et al., 2010; MORENO et al., 2003). Entretanto, dados do genoma de *Vitis vinifera* indicam a presença de lipases, que estariam envolvidas no catabolismo de lipídeos (UNIPROT, 2016). Dessa forma, considerando a presença de lipase na planta e de compostos com ação inibitória dessa enzima em elevadas concentrações, pondera-se que lipases possam ser obtidas de uvas e, conseqüentemente, de seus resíduos. Entretanto, são necessários estudos que avaliem a presença de lipases ativas, suas características e potenciais aplicações.

Coco (*Coco nucifera* L.)

O coqueiro de *Coco nucifera* L. ocorre naturalmente em todos os continentes, sendo que cerca de 90 países o cultivam comercialmente. Os cultivos comerciais se concentram nas regiões litorâneas, principalmente no continente asiático. Em todo o mundo foram produzidos aproximadamente 60 milhões de toneladas de cocos em 2008 (EMBRAPA, 2011; FAO, 2009).

No Brasil o coco é consumido principalmente *in natura*, entretanto, o processamento vêm crescendo e inclui diferentes partes do fruto. O endosperma sólido ou albúmen, conhecido comercialmente como amêndoa corresponde à parte branca da polpa, é desidratado e destinado à produção de coco ralado e leite de coco. Já a parte líquida do endosperma, conhecida popularmente como água de coco, vem sendo processada e comercializada engarrafada. O mesocarpo é empregado como fonte de fibras em inúmeros processos (EMBRAPA, 2011).

O óleo de coco é constituído por triglicerídeos saturados, possui elevado valor e é utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de biodiesel (SULAMAIN et al., 2013). O biodiesel de óleo de coco possui desempenho superior ao produzido a partir de outros óleos vegetais, devido ao seu calor específico reduzido (KALAM et al., 2016).

Os resíduos lignocelulósicos provenientes do mesocarpo do fruto também vêm sendo avaliados como substratos em processos fermentativos para a produção de bioetanol (SOARES et al., 2016).

Ejedegba et al. (2007) demonstraram que o extrato das amêndoas de coco, apresenta atividade de lipase em óleo de coco, trioleína, tripalmitina e azeite, em temperaturas até 35°C e em faixa de pH de 7,5 a 8,5. Entretanto, o processamento do fruto inclui a etapa de autoclavagem, com o intuito de facilitar a separação da amêndoa da casca fibrosa (EMBRAPA, 2010). Essa etapa contribui para desestruturar as enzimas presentes nos resíduos, e como consequência a exploração dos resíduos para obtenção direta de enzimas não é possível. Dessa forma, a fração casca do processamento de coco vem sendo estudada como fonte de polímeros utilizada como suporte, bem como substrato de processos fermentativos para produção de biocombustíveis (KOCAMAN et al., 2017).

Mamão papaia (*Carica papaya* L.)

O Brasil é o maior produtor de mamão do mundo, sendo que no ano de 2013 foram produzidos mais de 1,5 milhões de toneladas de frutos. A Bahia é o estado de maior produção correspondendo a cerca de 45% de toda a produção brasileira (EMBRAPA, 2014; IBGE, 2014).

Os frutos imaturos de mamão papaia assim como o caule possuem látex rico em enzimas como proteases e lipases. Na Ásia e África o mamoeiro é cultivado exclusivamente para a obtenção de látex, sendo empregado nas indústrias farmacêutica, de alimentos e cosmética. As lipases provenientes do látex de mamão são capazes de catalisar reação de esterificação, transesterificação e interesterificação de glicerídeos (DE MARIA et al., 2006). Paques et al. (2008) caracterizaram bioquimicamente as lipases de resíduos de mamão papaia, que foram capazes de manter atividade após concentração por precipitação com acetona e sulfato de amônio e apresentaram atividade ótima em faixas de pH de ácidas a básicas e à 55°C.

Dessa forma, os resíduos agroindustriais do processamento de mamão poderiam ser explorados para a obtenção de lipases, apresentando como diferencial, a manutenção da atividade em meios reacionais com elevada concentração de solventes.

Mamona (*Ricinus communis* L.)

A mamona possui ocorrência global, adaptando-se a climas, do tropical quente e úmido ao temperado. A parte comercialmente explorada é o fruto, que abriga sementes lisas, ovaladas que variam em tamanho e coloração (MALHOTRA et al., 2015).

As sementes possuem cerca de 50% de sua massa constituída por óleo, que possui atividade biológica associada à proteína ricina e ao alcaloide ricinina. Quando ingerido por animais e insetos, o óleo de mamona causa diarreia, anorexia, fraqueza, apatia e até óbito. Possui também outras propriedades exploradas pela indústria farmacêutica como atividade convulsionante e estimulante de memória (SALIMON et al., 2010).

Durante a produção de óleo, para cada tonelada de produto, são gerados cerca de 1,1 tonelada de resíduos. Esses, por sua vez, são utilizados como biomassa para geração de energia e adubação orgânica, já que, não podem ser utilizados diretamente para alimentação animal devido à sua toxidez (SANTOS et al., 2016). No entanto, há a possibilidade de biodetoxificação desses resíduos, o que permite a aplicação na alimentação animal (GODOY et al., 2009).

A presença de lipases em sementes de mamona foi verificada há mais de 50 anos, apresentando características de atividade ótima em pH ácido e estabilidade em temperaturas amenas, e capacidade de catalisar a hidrólise de óleos vegetais ricos em ácido linoleico e linolênico (AVELAR et al., 2013; ORY et al., 1960). Entretanto, não são exploradas comercialmente para esta finalidade, devido ao fato de estarem ativas apenas em sementes dormentes, ou seja, quando ainda estão imaturas e ainda não podem ser utilizadas para a extração de óleo (AVELAR et al., 2013). No entanto, os resíduos do processamento de mamona podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos para a produção de diferentes enzimas por micro-organismos, como celulasas por *Aspergillus japonicus* (Herculano et al., 2011) e lipases por *Pseudomonas aeruginosa* (Amara e Salem, 2009).

Dendê (*Elaeis guineenses* Jacq.)

A palma de dendê ou dendezeiro é originária do continente africano e cultivada mundialmente na faixa da linha do Equador. No Brasil a produção de dendê se concentra na região Norte e abrange cerca de 65 mil hectares (EMBRAPA, 2001).

O fruto é a parte explorada comercialmente, sendo do tipo drupa séssil, esférico, com aproximadamente 4 cm e chega a pesar 30 g. O óleo pode ser extraído de diferentes partes do fruto, recebendo denominações distintas (CASTRO e KLUGE, 2001).

O óleo proveniente do mesocarpo é denominado óleo de palma, representa cerca de 50% da massa do fruto fresco, é o segundo mais produzido no mundo, possui coloração avermelhada devido à presença de carotenoides, sendo também rico em precursores de vitamina E. Já o óleo obtido do endocarpo é conhecido comercialmente como de palmiste e é considerado um subproduto da produção de óleo de palma, correspondendo a cerca de 3% da massa do fruto (SILVA, 2007).

A presença de lipases ativas foi verificada no óleo obtido do mesocarpo, apresentando atividade ótima em ampla faixa de pH, do ácido (4,5) ao alcalino (9,0) e temperatura amenas de 30°C a 35°C, sendo que essas características variam de acordo com o estágio de maturação e concentração de água dos frutos (EBONGUE et al., 2006; ABIGOR et al., 1985). Assim, a obtenção de lipases poderia ser adicionada ao processo de extração de óleo de palma à frio utilizando métodos simples como a centrifugação, sem prejuízo ao produto final.

As lipases estão presentes em fontes vegetais diferentes das utilizadas comercializadas atualmente, sendo que o resumo do potencial dos resíduos vegetais, apresentados neste estudo, como fontes de lipases está descrito na Tabela 1.2. Nota-se que entre as culturas descritas somente algumas possuem elevado potencial para exploração de seus resíduos como fontes diretas de lipases devido às características inerentes do fruto, como a atividade apenas em sementes dormentes (mamona) e presença de compostos inibitórios (uva); ou do processamento, como o uso de elevadas temperaturas (coco). Por outro lado, os resíduos gerados no processamento de laranja, manga, mamão e dendê possuem elevado potencial para obtenção direta de lipases devido à elevada atividade dessa enzima e elevada quantidade de resíduos gerados nos processamentos, os quais são adequados à manutenção da atividade enzimática. Os resíduos provenientes do processamento de frutas podem ser utilizados em diversas áreas: as cascas provenientes de processos mecânicos e físicos são interessantes para obtenção direta de compostos por manter as características originais no fruto; já as tortas

provenientes de processos de extração à quente podem ser utilizadas como substratos para processos fermentativos; e os bagaços ricos em celulose podem ser utilizados como biomassa para produção de energia. Assim, considera-se que estudos sobre a obtenção e aplicação de lipases desses resíduos poderiam agregar novas opções de fontes para a exploração comercial.

Tabela 1.2 Potencial de resíduos vegetais para obtenção de lipases

<i>Vegetal</i>	<i>Produto principal</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Presença de lipase</i>	<i>Potencial para obtenção de lipases</i>	<i>Fonte</i>
<i>Laranja</i>	suco	frit, casca, bagaço e polpa	Confirmada e caracterizada	Elevado, processamento padronizado, elevada produção e atividade	Okino-Delgado e Fleuri (2014a)
<i>Manga</i>	polpa	Casca	Confirmada e caracterizada	Elevado, elevada atividade e produção, porém o processamento não é padrão	Okino-Delgado e Fleuri (2014b)
<i>Uva</i>	suco	casca e semente	Confirmada teoricamente	Baixo, ação inibitória de lipase	Adisakwattana et al. (2010)
<i>Coco</i>	polpa	Casca	Confirmada	Baixo, temperatura elevada no processamento	EMBRAPA (2010)
<i>Mamão</i>	polpa	casca e semente	Confirmada e caracterizada	Elevado, elevada atividade e uso comercial para extração de outras enzimas	De Maria et al. (2006)
<i>Mamona</i>	óleo	casca e bagaço	Confirmada e caracterizada	Baixo, atividade apenas em sementes dormentes	Avelar et al. (2013)
<i>Dendê</i>	óleo	casca e bagaço	Confirmada e caracterizada	Elevado, elevada atividade e uso comercial para extração de outras enzimas	Ebongue et al. (2006)

1.3 Análise dos resíduos do processamento de frutas para uso em aplicações biotecnológicas e perspectivas de biorefinarias

A reutilização de resíduos para conversão em energia, alimentação animal e como fonte para obtenção de moléculas de elevado valor agregado, como antioxidantes e enzimas, tem sido considerada uma opção viável e sustentável. Entretanto, o tipo de aplicação possível depende das características dos processos empregados para transformar o material *in natura* em produtos finais, já que são gerados diferentes resíduos com características bioquímicas distintas. A seguir estão descritos os principais tipos de processamento de frutas, com análise dos resíduos gerados e discussão sobre sua aplicabilidade para fins biotecnológicos, bem

como as perspectivas de integralização do reaproveitamento de resíduos aos processos já existentes culminando em biorrefinarias.

O processamento de frutas é dividido em transformação primária e secundária. A transformação primária engloba processos que aumentam a vida útil do produto agrícola, transformando-os em produtos que podem ser comercializados, mas que geralmente são utilizados como matéria-prima para transformações secundárias, ou seja, constituem processos simples de extração de polpas, óleos essenciais, aromas e *flavors*. Já a transformação secundária ou final gera produtos mais elaborados destinados ao consumidor final, incluindo bebidas, doces, compotas, entre outros (CUNHA et al., 2008).

O tipo do produto obtido dos processamentos depende da espécie, variedade e características físico-químicas de cada fruta a ser processada, sendo que os principais são polpa, suco, néctar, refresco, óleo, doce em pasta, doce em massa, doce cremoso, fruta em calda, geleia e fruta desidratada (OLIVEIRA e SANTOS, 2015). A seguir estão descritos os processos de obtenção de polpa e suco de frutas, incluindo os processos envolvidos e os resíduos gerados.

A polpa de fruta é o produto não fermentado, não concentrado, não diluído, obtido de frutos polposos, por meio de processo tecnológico adequado, com um teor mínimo de sólidos totais, proveniente da parte comestível do fruto obtido por transformação primária (BRASIL, 2000). As frutas são primeiramente higienizadas e lavadas, podendo haver adição de produtos químicos como hipoclorito ou detergentes. As frutas higienizadas são selecionadas, sendo descartadas as fermentadas ou imaturas. Após a seleção, dependendo das características de cada espécie, as frutas podem ser conduzidas diretamente para o despolpamento, como no caso da uva, maçã, acerola e cajá; ou passarem por processos de retirada de casca, como ocorre com a banana, manga e mamão. As polpas, então, podem ser pasteurizadas ou congeladas para aumentar seu tempo de conservação (TOLENTINO e GOMES, 2009).

O suco é o produto obtido pela dissolução em água potável, da polpa da fruta polposa, por meio de processo tecnológico adequado, não fermentado, de cor, aroma e sabor característicos da fruta, submetido a tratamento que assegure sua conservação e apresentação até o momento do consumo (BRASIL, 2003). A produção de sucos inclui as etapas de

processamento para polpa e podem incluir a diluição e adição de conservantes e outros aditivos para padronização (OLIVEIRA e SANTOS, 2015).

Durante a seleção das frutas são descartadas as inadequadas para o consumo, ou seja, as que estão imaturas, fermentadas ou deterioradas, que, em geral, apresentam características organolépticas (aroma, sabor e textura) e microbiológicas comprometidas (EMBRAPA, 2004). As características dos resíduos dessa etapa de processamento são muito variáveis, já que são constituídos por frutos fora do padrão (frutos imaturos e em estágio de putrefação são descartados juntos). O teor de sólidos solúveis, por exemplo, sofre elevada variação nos diferentes estágios de maturação, variando de 14° BRIX quando os frutos estão verdes até 22° BRIX quando os frutos estão amarelos, como ocorre em mangas da variedade Ataulfo. A variação de compostos fenólicos totais também ocorre durante a maturação da manga, com menor concentração em frutos verdes, atingindo um pico quando as frutas estão no ponto ideal de consumo e sofrendo redução quando os frutos caminham para a putrefação (AZIZ et al., 2012; PALAFOX-CARLOS et al., 2012a). Dessa forma, o uso de resíduos da etapa de seleção como fonte direta pode ser comprometido devido à baixa uniformidade, sendo mais indicados para uso como substrato para processos fermentativos devido à elevada concentração de nutrientes e umidade.

O descascamento pode ser realizado por equipamentos ou manualmente. Geralmente, os equipamentos utilizados são fabricados em aço inox e incluem conjuntos de facas que removem as cascas mecanicamente, separando as partes comestíveis. Essa etapa é interessante para o aproveitamento dos resíduos gerados como fontes diretas de compostos, já que a casca é a parte na qual, geralmente, concentram-se os compostos relacionados à proteção dos frutos e de maior interesse biotecnológico. Na casca de manga, por exemplo, há maior concentração de flavonoides em comparação com a polpa do fruto (PALAFOX-CARLOS et al., 2012b). As etapas de descascamento e refinamento, portanto, geram resíduos promissores para o uso como matéria-prima em aplicações biotecnológicas, pois são homogêneos e os compostos bioativos e enzimas estão presentes em abundância nas cascas e sementes das frutas.

O despulpamento à quente é o processo utilizado para separar a polpa das fibras de frutas que apresentam escurecimento rápido, como maçã, banana e pêssago. O aquecimento inativa as enzimas por desestruturação paralisando imediatamente o escurecimento (OETTERER et al., 2006). Além disso, acabam por afetar outras enzimas impedindo que os resíduos desses processos sejam utilizados na obtenção direta de enzimas, vitaminas, aromas e outras substâncias termossensíveis (CASTRO et al., 2011). Dessa forma, considera-se que o aproveitamento dos resíduos como fonte direta é possível somente para substâncias que não são alteradas pelas elevadas temperaturas como flavonoides, polímeros e fibras.

Durante o despulpamento e refino as sementes, no geral, são retiradas inteiras, já que a sua desintegração pode conferir alteração no sabor do produto. As sementes facilmente separáveis da parte comestível são retiradas manualmente ou por equipamentos mecânicos, como no caso do mamão, carambola e citros (TOLENTINO e GOMES, 2009). Por isso, considera-se que essas sementes podem ser utilizadas na obtenção direta de compostos bioativos e enzimas.

O aproveitamento de resíduos pode ser maximizado quando implantado o conceito de biorrefinaria, cujo objetivo é a integralização de processos de conversão de biomassa em novos produtos como biocombustíveis, insumos químicos, compostos bioativos, materiais, alimentos, rações e energia; otimizando recursos e minimizando efluentes e maximizando os benefícios e lucro (EMBRAPA, 2011).

Uma vez que as biorrefinarias agregam diferentes rotas de conversão, incluindo vias bioquímicas, microbianas, químicas e termoquímicas, o seu conceito é dinâmico e está em pleno desenvolvimento, mas pode ser definido como “a união de tecnologias entre matérias-primas biológicas, intermediários industriais e produtos finais” (KAMM e KAMM, 2004). Atualmente há diferentes exemplos de biorrefinarias já instaladas, como as usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade a partir da cana-de-açúcar e as fábricas de óleo, rações, biodiesel e diversos outros derivados a partir da soja; entretanto, esse conceito poderia ser aplicado em muitas outras culturas, em especial no Brasil que possui elevada diversidade de culturas e processos (EMBRAPA, 2011).

O fluxograma apresentado na Figura 1.1 inclui as etapas mais frequentes do processamento de frutas, os resíduos gerados nessas etapas e sugestões para suas aplicações biotecnológicas. O material descartado na etapa de seleção é menos uniforme, por isso, são menos indicados para obtenção de enzimas e compostos ativos de maneira direta. Já os resíduos gerados no descascamento são, em geral, uniformes e concentram compostos bioativos e enzimas. Na etapa de corte e despulpamento a finalidade depende do método empregado, pois, quando há uso de elevadas temperaturas pode haver desestruturação dos compostos bioativos e enzimas. Dessa forma, seriam incluídos novos produtos no processamento já instalado aumentando assim, a rentabilidade e sustentabilidade do processo.

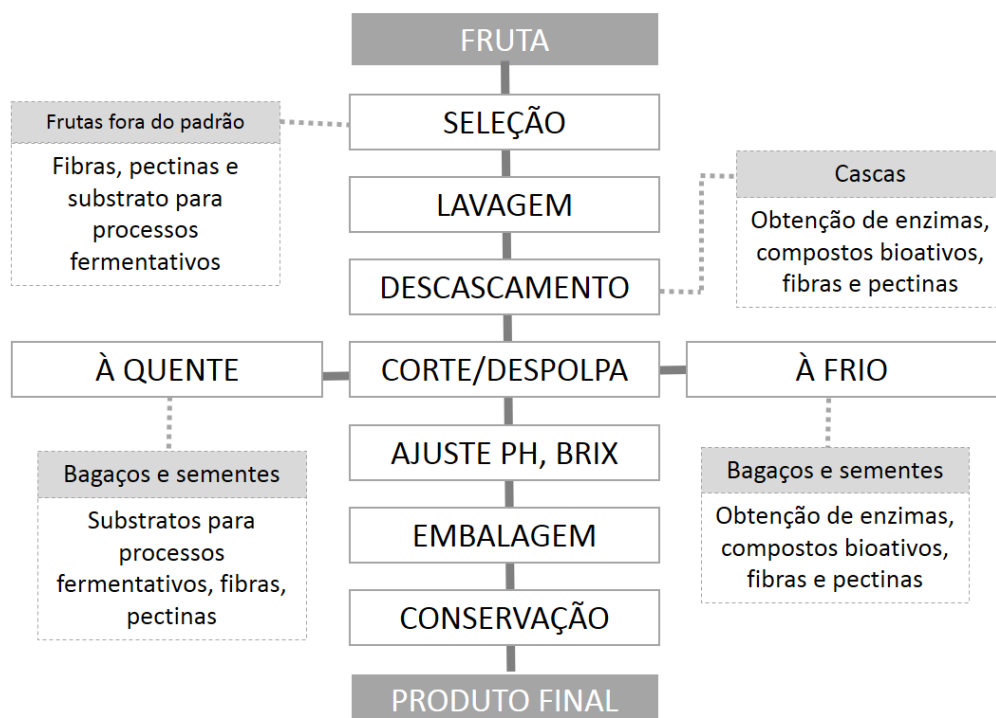


Figura 1.1 Fluxograma dos resíduos gerados no processamento de frutas com sugestões de aplicações biotecnológicas

A indústria cítrica está entre as que possuem maior potencial, devido ao tamanho do setor, ao processamento padronizado e sem etapas desnaturantes, possibilitando a obtenção de novos produtos sem interferência no processo de produção do produto principal. Do processamento de laranja para suco originam-se os resíduos *frit*, casca e bagaço, dos quais podem ser obtidos biocatalisadores, antioxidantes e fibras. A partir da extração dessas

biomoléculas, dependendo do resíduo, o mesmo pode ser destinado à obtenção de óleo essencial, pectina e aroma, e em seguida direcionado à alimentação animal, bioenergia ou ser utilizado para processos fermentativos para a obtenção de novas enzimas e compostos bioativos. Já do processamento de laranja para suco concentrado pode-se obter a polpa que é fonte de antioxidantes e aromas e, após suas extrações, ser direcionada também para a alimentação animal, bioenergia ou processos fermentativos (FLEURI, 2016).

Outro tipo de processamento que poderia incluir o conceito de biorrefinaria do processamento de frutas são as indústrias de polpa, que utilizam o processo de extração a frio de polpa de frutas de diferentes espécies durante o ano. Dessa forma, durante o processamento seriam extraídas as polpas de frutas como produto principal; enquanto as cascas das frutas poderiam ser utilizadas em processos de extração de compostos antioxidantes e enzimas das cascas; as sementes em processos de obtenção de óleos e enzimas; e os resíduos lignocelulósicos poderiam ser conduzidos para geração de energia ou como substratos em processos fermentativos.

1.4 Conclusão

O processamento de frutas tem aumentado com o intuito de maximizar a durabilidade e agregar valor ao produto, no entanto, como consequência a geração de resíduos também tem crescido, principalmente porque a proporção entre produtos principais e resíduos, em média, é de 1:1 (m/m). Assim, o aproveitamento desses resíduos como matéria-prima de processos biotecnológicos, além de aumentar a rentabilidade, devido à inclusão de novos produtos, reduz o descarte de resíduos, tornando o processo mais sustentável. Entre esses novos produtos destacam-se as lipases que possuem mercado expressivo e que atualmente são obtidas a partir de poucas fontes apesar de estarem presentes em grandes quantidades e em diversas espécies. Entre as espécies analisadas, os resíduos do processamento de laranja, manga, mamão e dendê possuem maior potencial para a obtenção direta de lipases. Além disso, as etapas de obtenção desse e outros produtos biotecnológicos poderiam ser inseridos no processamento de frutas já instalado em conceitos de biorrefinarias, nos quais uma fruta daria origem a diferentes produtos tornando o processamento mais sustentável e rentável.

1.5 Referências bibliográficas

- Abigor D.R.; Opute F.I.; Opoku A.R. Osagie A.U. (1985) Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp, Journal of the Science of Food and Agriculture, 36 (1985) 599–606.
- Amara A.A.; Salem S.R. (2009) Degradation of castor oil and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa*. American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences, 5 (4): 556-563
- Amara A.A.; Salem S.R. (2009) Degradation of castor oil and lipase production by *Pseudomonas aeruginosa*. American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences, 5 (4): 556-563.
- Avelar, M. H. M., D. M. J. Cassimiro, K. C. Santos, R. C. C. Domingues, H. F. de Castro and A. A. Mendes (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. Industrial Crops and Products, 44(0): 452-458
- Aziz N.A.A.; Wong L.M.; Bhat R.; Cheng L.H. (2012) Evaluation of processed green and ripe mango peel and pulp flours (*Mangifera indica* var. Chokanan) in terms of chemical composition, antioxidant compounds and functional properties. Science of Food and Agriculture, 92(3): 557–563.
- Carneiro, A.P.M. (2009) Farelo de babaçu em rações para frangos de corte na fase final: desempenho, rendimento de carcaça e avaliação econômica. Ciência Animal Brasileira, 10(1): 40-47.
- Bello R. H.; Linzmeyer P.; Franco C. M. B.; Souza O.; Sellin N.; Medeiros S. H. W.; Marangoni C. (2014) Pervaporation of ethanol produced from banana waste. Waste management, 34: 1501-1509.
- Castro P.R.C.; Kluge R.A. (2001) Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira. Stoller do Brasil, 95-112.
- CONAB (2015) Boletim Hortigranjeiro 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>

- Cunha A.M.; Araújo R.D.; Mello C.H.; Boeira J.L.F. (2008) Relatório de acompanhamento setorial de frutas processadas. UNICAMP e ABDI.
- De Camargo A.C., Regitano-d'Arce M.A.B., Biasoto A.C.T., Shahidi, F. (2014) Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 12159–12171.
- De Camargo A.C.; Regitano-d'Arce M.A.B., Biasoto A.T., Shahidi F. (2016) Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities, 212: 395-402.
- De María P.D.; Sinisterra J.V.; Tsai S.W.; Alcántara A.R. (2006) *Carica papaya* lipase (CPL): An emerging and versatile biocatalyst. *Biotechnology Advances*, 24: 5: 493–499.
- Devasena T. (2010) *Enzymology*. 1º edição, Oxford. YMCA Library Building, Jai singh Road, New Delhi.
- Dhillon G.S., Kaur S., Brar S.K. (2013) Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 789–805.
- Dhillon G.S.; Kaur S.; Oberoi H.S.; Spier M.R. Brar S.K. (2016) Chapter 2 – Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications. Em: Protein byproducts - transformation from environmental burden into value-added products. Academic-press, 21–36.
- Doye R. Abigor D.R.; Opute F. I.; Opoku A. R.; Osagie A. U. (1985) Partial purification and some properties of the lipase present in oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 599-606.
- Ebongue G.F.N.; Dhoujb R.; Carrière F.; Zollo P.H.A.; Arondel V. (2006) Assaying lipase activity from oil palm fruit (*Elaeis guineensis* Jacq.) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:10: 611-617.

- Ejedegba B.O.; Onyyeneke E.C.; Oviasogie P.O. (2007) Characteristics of lipase isolated from coconut (*Cocos nucifera* linn) seed under different nutrient treatments. African Journal of Biotechnology, 6 (6), 723-727.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2001) Situação atual e perspectivas futuras da dendeicultura nas principais regiões produtoras: a experiência do Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acessado em dezembro de 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2004) Capítulo XII Pós colheita. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acessado em dezembro de 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) Aproveitamento Industrial do Coco-da-Baía Maduro (Coco Seco). Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acessado em dezembro de 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011) Biorrefinarias. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48750/1/biorrefinaria-modificado-web.pdf>. Acessado em dezembro de 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011) Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/doc_164.pdf. Acessado em dezembro de 2016.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2015) Desempenho da viticultura brasileira. Disponível em: <https://www.embrapa.br/>. Acessado em dezembro de 2016.
- FAOSTAT - Food and Agriculture Organization (2014) Disponível em: www.fao.org. Acessado em dezembro de 2016.
- Federici F.; Fava F.; Kalogerakis N.; Mantzavinos D. (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: concept, opportunities and the case of olive mill wastewaters. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 84 (6): 895–900.

- Ferrari R.A.; Soler M.P. (2015) Obtention and characterization of coconut babassu derivatives. *Scientia Agricola*, 72 (4): 291-297.
- Ferreira M.E.M. (2014) Análise exergoeconômica da produção de biodiesel de babaçu por via metílica e etílica. Tese de apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Fleuri L.F. (2016) Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de livre docência – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Botucatu.
- Fleuri L.F.; Novelli P.K.; Delgado C.H.O.; Pivetta M.R.; Pereira M.S.; Arcuri M.L.C.; Capoville B.L. (2014) Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 2585–2591.
- Fleuri L.F.; Oliveira M.C.; Arcuri M.L.C.; Capoville B.L.; Pereira M.S.; Okino-Delgado C. H.; Novelli P.K. (2014b) Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 23(4): 1199–1205.
- Francisco V.C.B. (2017) Resíduos de laranja como fonte direta de lipases: obtenção, caracterização bioquímica e aplicações. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu.
- Gadge P.P.; Madhikar S.D.; Yewle J.N.; Jadhav N.N.; Chougale A.D.; Zambare V.P.; Padul M.V. (2011) Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (*Glycine max*), *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7: 141–145.
- Gandhi N.N.; Mukherjee K.D. (2000) Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(2): 566-570.

- Gombert A.K.; Pinto A.L.; Castilho L.R.; Freire D.M.G. (1999) Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*, 35: 85–90.
- Gomes L.P.; Ribeiro de Oliveira C.I.; Silva M.C.; Andrade C.T.; Aguila E.M.D.; Silva J.T.; Paschoalin V.M.F. (2010) Purificação e caracterização da quitinase de uva (*Vitis vinífera* L. cv Red Globe) para a produção de quitosana a partir de quitina de camarão. *Química Nova*, 33(9): 1882-1886.
- Herculano P.N.; Porto T.S.; Moreira K.A.; Pinto G.A.S.; Souza-Motta C.M.; Porto A.L.F. (2011) Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165:3: 1057–1067.
- Hrmova M., Fincher G.B. (2001) Plant Enzyme Structure. Explaining substrate specificity and the evolution of function. *Plant Physiology*, 125: 54–57.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2003) Indicadores agropecuários 1996-2003. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acessado em maio de 2017.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014) Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em www.ftp.ibge.gov.br. Acessado em maio de 2017.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016) Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em www.ftp.ibge.gov.br. Acessado em maio de 2017.
- Kapranichikov V. S.; Zhrebtssov N. A.; Popova T. N. (2004) Purification and characterization of lipases from wheat germ, *Prikladnaia. Biokhimiia i Mikrobiologiia*. 40: 98–103.
- Kalam M. A.; Rashed M. M.; Imdadul H. K.; Masjuki H. H. (2016) Property development of fatty acid methyl ester from waste coconutoil as engine fuel. *Industrial Crops and Products*, 87: 333–339.
- Kocaman S.; Karaman M.; Gursoy M.; Ahmetli G. (2017) Chemical and plasma surface modification of lignocellulose coconut waste for the preparation of advanced biobased composite materials. *Carbohydrate Polymers*, 159: 48-57.

- Laufenberg G.; Kunz B.; Nystroem M. (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: Bioresource Technology, 87 (2): 167–198.
- Lima J.R.O.; Silva R.B.; Silva C.C.M.; Santos S.S.; Santos J.R.; Moura E.M.; Moura C.V.R. (2007) Biodiesel from babassu (*Orbignya* sp.) synthesized via ethanolic route. Química Nova, 30(3): 600-603.
- Lopes, D.B.; Fraga, L.P.; Fleuri, L.F.; Macedo, G.A. (2011) Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? Food Science and Technology, 31:3:1.
- Mahro B.; Timm M. (2007) Potential of biowaste from the food industry as a biomass resource. Engineering in Life Sciences, 7(5): 457–468.
- Malhotra D.; Mukherjee J.; Gupta M.N. (2015) Lipase catalyzed transesterification of castor oil by straight chain higher alcohols. Journal of Bioscience and Bioengineering, 119: 3: 280–283.
- Markets and Markets (2015) Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food & Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region - Global Forecast to 2022. Disponível em: www.marketsandmarkets.com. Acessado em dezembro de 2016.
- Markets and Markets (2015) Lipase Market by Source (Microbial Lipases, Animal Lipases), Application (Animal Feed, Dairy, Bakery, Confectionery, Others), & by Geography (North America, Europe, Asia-Pacific, Latin America, RoW) - Global Forecast to 2020. Disponível em: www.marketsandmarkets.com. Acessado em dezembro de 2016.
- Martínez R.; Torres P.; Meneses M.A.; Figueroa J.G.; Pérez-Álvarez J.A.; Viuda-Martos M. (2012) Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. Food Chemistry, 135(3):1520–1526.

- Medeiros-Costa, J.T. (1985) Estágio atual da taxonomia dos gêneros e espécies da unidade *Attalea* (Palmae) no Brasil. Teresina, PI: Embrapa–Uepae de Teresina, 36.
- Ministério de minas e energia do Brasil (2014) Inventário energético de resíduos rurais. Disponível em: www.epe.gov.br/mercado/. Acessado em dezembro de 2016.
- Nascimento U.M.; Vasconcelos A.C.S.; Azevedo E.B.; Silva F.C. (2009) Otimização da produção de biodiesel a partir de óleo de coco babaçu com aquecimento por micro-ondas. *Eclética Química*, 34 (4): 37-48.
- Nogales-Bueno J.; Baca-Bocanegra B.; Rooney A.; Hernández-Hierro J.M.; Heredia F.J.; Byrne H.J. (2017) Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin. *Talanta*, 167(15): 44–50.
- Oetterer M.; Regitano-d’Arce M.A.B.; Spoto M.H.F. (2006) Fundamentos de ciências dos alimentos. Editora Manole, Piracicaba.
- Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163: 103–107.
- Okino-Delgado C.H. (2014) Obtenção de lipases vegetais, caracterização bioquímica e aplicação. Dissertação apresentada a Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu.
- Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2016) Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. *Food Reviews International*, 32: 1–14.
- Oliveira E.N.A.; Santos D.C. (2015) Tecnologia e processamento de frutos e hortaliças. Editora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte.
- Ory R.L.; Angelo A.J.; Altschul A.M. (1960) Castor bean lipase: action on its endogenous substrate. *The Journal of Lipid Research*, 1: 208-213.

- Palafox-Carlos H.; Yahia E.M.; González-Aguilar G.A. (2012a) Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*, 135: 105–111.
- Palafox-Carlos H.; Yahia E.M.; Islas-Osuna M.A.; Gutierrez-Martinez P.; Robles-Sánchez M.; González-Aguilar G.A. (2012b) Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135: 7–13.
- Palma M.B.; Pinto A.L.; Gombert A.K.; Seitz K.H.; Kivatinitz S.C.; Castilho L.R.; Freire D.M.G. (2000) Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. Capítulo em: Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Part of the series Applied Biochemistry and Biotechnology, 1137-1145.
- Panda, S.K.; Mishra, S.S.; Kayitesi, E.; Ray, R.C. (2016) Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environmental Research*, 146: 161–172.
- Prado, D.Z.; Capoville, B.L.; Okino-Delgado, C.H.; Athanazio-Heliodoro, J.C.; Pivetta M.R.; Pereira, M.; Zanutto, M.R.; Novelli, P.K.; Fleuri, L.F. (2017) Capítulo: Nutraceutical food: composition, biosynthesis, therapeutic properties and applications. Em: Alexandru Grumezescu and Alina Maria Holba. (Org.). Handbook of Food Bioengineering, Volume 17. Alternative and replacement foods. 1ed.. 01ed.Bucharest: Elsevier, in press.
- Riebel M.; Sabel A.; Claus H.; Xia N.; Li H.; König H.; Decker H.; Fronk P. (2017) Antioxidant capacity of phenolic compounds on human cell lines as affected by grape-tyrosinase and Botrytis-laccase oxidation. *Food Chemistry*, 229(15): 779–789.
- Rosa, J. (2011) Quebradeiras de coco babaçu: uma atividade sustentável? Tese de doutorado pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

- Salimon J.; Noor D.A.M.; Nazrizawati A.T.; Firdaus M.Y.; Noraishah A. (2010) Fatty acid composition and physicochemical properties of malaysian castor bean *Ricinus communis* L. seed oil. *Sains Malaysiana*, 39(5): 761–764.
- SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (2015) Prognósticos/fruticultura 2014/15. Disponível em: www.agricultura.pr.gov.br. Acessado em dezembro de 2016.
- SEBRAE - Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas (2013) Mercado da manga. Disponível em: www.sebrae.com.br. Acessado em dezembro de 2016.
- SEBRAE – Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas (2015) Boletim de inteligência 2015 – Agronegócio – Fruticultura. Disponível em: www.bibliotecas.sebrae.com.br. Acessado em dezembro de 2016.
- Silva J.A.C.; Soares V.F.; Fernandez-Lafuente R.; Habert A.C.; Freire D.M.G. (2015) Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122: 323–329.
- Silva T.O.D. (2007) Estudo da emissão de aldeídos e outros COV por óleos de dendê e soja em diferentes condições, sob aquecimento a temperatura de processos de fritura. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em química pela Universidade Federal da Bahia.
- Soares J.; Demeke M.M.; Foulquié-Moreno M.R.; Velde M.V.; Verplaetse A.; Fernandes A. A.R.; Thevelein J.M.; Fernandes P.M.B. (2016) Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. *Bioresource technology*, 216: 744:753.
- Sulaiman S.; Aziz A.R.S.; Aroua M.K. (2013) Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil. *Journal of Food Engineering* 114: 228–234.
- Swamy G.J.; Muthukumarappan K. (2017) Optimization of continuous and intermittent microwave extraction of pectin from banana peels. *Food chemistry*, 220: 108-114.

Teixeira M.A. (2003) Caracterização Energética do Babaçu e Análise do Potencial de Cogeração. Tese apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia mecânica pela Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas.

Tolentino V.R.; Gomes A. (2009) Processamento de vegetais – frutas/polpa congelada. Manual técnico 12 do programa Rio Rural, Niterói, Rio de Janeiro.

UVIBRA – União brasileira de vitivinicultura (2014) Panorama da vitivinicultura brasileira 2014. Disponível em: www.uvibra.com.br. Acessado em dezembro de 2016.

Zhang Y.; Gao Z.; Song N.; Li X. (2016) High-performance supercapacitors and batteries derived from activated banana-peel with porous structures. *Electrochimica Acta*, 222: 1257-1266.

CAPÍTULO 2: Atividade enzimática e caracterização de extratos de resíduos de laranja variedade Hamlin

2.1 Introdução

O Brasil produz cerca de 60% do suco de laranja comercializado mundialmente, sendo que na safra 2015/16 produziu cerca de 12 milhões de toneladas de laranja. Desse total 85% foi processado para produção de suco gerando cerca de 900 mil toneladas do produto concentrado (FCOJ - *frozen concentrate orange juice*) (CITRUS BR, 2017). No Brasil, esse processamento inicia-se em maio, utilizando laranjas de variedades precoces como a Hamlin (corresponde em torno de 10% das laranjas processadas); chegando ao ápice de julho a outubro com a variedade Pera que é a mais utilizada (corresponde a cerca de 40% das laranjas processadas); e estende-se até dezembro e janeiro com variedades tardias como a Natal e Valência (que correspondem a cerca de 30 e 20% das laranjas processadas, respectivamente). Assim, a indústria de processamento de laranja para suco mantém suas atividades durante a maior parte do ano, o que é essencial para garantir a fluidez e rentabilidade do setor (EMBRAPA, 2013).

As diferentes variedades de laranja possuem características distintas, as quais influenciam as características do suco (ARANHA, 2011); dos resíduos (LERMA-GARCÍA, 2016); e provavelmente das lipases e outras moléculas contidas nesse material.

Aproximadamente 75% dos sucos cítricos produzidos no mundo utilizam a extratora *in line* da empresa JBT Food Tech, cujo equipamento gera diferentes frações de resíduos durante a extração (JBT FOOD TECH, 2017; OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016).

Cada fração de resíduo é gerada em diferente proporção em relação ao suco, de acordo com a variedade, safra e configuração do equipamento (EMBRAPA, 2013; ARANHA, 2011). Sua composição também varia, já que cada uma delas é constituída por determinada parte anatômica do fruto e, por isso, são destinadas à obtenção de diferentes subprodutos. A casca corresponde ao epicarpo e é a fração mais utilizada para a extração de pectina; o *frit* é composto pela parte mais externa do epicarpo e é utilizada na extração de óleo essencial; o bagaço corresponde ao mesocarpo e vêm sendo estudado como biomassa para produção de energia; já a polpa equivale ao endocarpo, o qual possui as características organolépticas mais

próximas ao suco, devido a mesma origem anatômica, sendo a fração de resíduo mais utilizada para alimentação animal (OKINO-DELGADO E FLEURI, 2016).

Além das aplicações mencionadas, esses resíduos vêm sendo estudados como matéria-prima para novos produtos biotecnológicos entre os quais, destacam-se as enzimas lipases, que podem ser obtidas diretamente dos resíduos de laranja como descrito por Okino-Delgado e Fleuri (2014). Essas enzimas apresentaram elevada atividade em faixa de pH de ácido a neutro, em temperaturas de 20 a 70°C e catalisam reações de hidrólise e síntese de ácidos graxos, que podem ser aplicadas nas áreas de produção de biodiesel, modificação de produtos lácteos, biorremediação de resíduos de conteúdo lipídico, entre outras (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2016).

Dessa forma, o presente estudo comparou as frações de resíduos do processamento de laranja para suco das principais variedades utilizadas no Brasil. Para isso, foram avaliados os dados de balanço de massas de rendimento de suco/resíduo. As lipases de resíduos da variedade Hamlin foram caracterizadas bioquimicamente e comparadas aos dados obtidos para a variedade Pera já publicados, com o intuito de verificar se as diferentes frações das diferentes variedades podem ser utilizadas como fontes diretas de lipases. Além disso, o mesmo grupo e pesquisa caracterizou lipases obtidas de resíduos de laranja das variedades Natal e Valência.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco

Os dados sobre o balanço de massas do processamento de laranja para suco foram coletados a partir da safra 2007/2008 até a safra 2015/2016 pelo centro de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa JBT Food Tech, situado na cidade de Araraquara-SP, Brasil. A cada ano foram processados pelo menos quatro lotes das variedades Pera, Natal, Hamlin e Valência utilizando a extratora *in line*, na configuração padrão. Que geraram quatro frações de resíduos, a saber: casca (*peel*); fragmento de casca (*frit*); bagaço (*core*); e a polpa. Cada lote foi composto por frutos selecionados e considerados adequados ao consumo. A massa de

cada fração foi mensurada durante o processamento. O valor total e porcentagens relativas foram calculados em relação à soma da pesagem do suco e de todas as frações de resíduos.

2.2.2 Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja

Foram utilizados resíduos do processamento de laranja para suco, pertencentes à espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck da variedade Hamlin, cultivadas no estado de São Paulo, coletadas e processadas no ano de 2015. O processamento foi realizado na extratora *in line* da empresa J.B.T. Food Tech na cidade de Araraquara-SP. Foram coletadas as quatro diferentes frações de resíduos, as quais foram amostradas, processadas separadamente e preparadas de acordo com o descrito por Okino-Delgado e Fleuri (2014).

2.2.3 Atividade de lipase e influência do pH e temperatura

A atividade lipolítica das frações foi medida pela hidrólise de azeite de oliva emulsionado, seguindo o método descrito por Macedo et al. (1997) e Lopes et al. (2011) e modificado por Okino-Delgado e Fleuri (2014). A atividade específica foi obtida comparando a atividade de lipase em azeite de oliva em condições padrão (pH 7,0 e 40°C) com a quantidade de proteínas totais do extrato enzimático, determinada pelo método de Biureto, descrito por Gornall et al. (1949). O resultado foi expresso em unidades de atividade por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

O estudo do pH ótimo foi conduzido pela medição da atividade de lipase de cada extrato seguindo o método utilizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014). A faixa de variação do pH foi de 4 a 10. No estudo de pH de estabilidade as amostras foram incubadas por 24 h nas soluções tampão dos diferentes pHs antes da determinação de atividade de lipase.

O estudo de temperatura ótima foi conduzido pela medição da atividade de lipase de cada extrato seguindo o método utilizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014). A faixa de variação da temperatura foi de 20 a 80°C. No estudo de termoestabilidade as amostras foram incubadas por 60 min nas diferentes temperaturas antes da determinação de atividade de lipase.

2.2.4 Estudo de especificidade

A especificidade das lipases de laranja por diferentes substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica foi determinada sobre p-nitrofenil palmitato (p-NPP) seguindo os métodos descrito por Mahadik et al. (2002) e Lopes et al. (2011); sobre p-nitrofenil laurato (p-NPL) pelo método descrito por Gutarra et al. (2009); e sobre p-nitrofenil-butirato (p-NPB) seguindo os métodos de Calado et al. (2002) e Lopes et al. (2011).

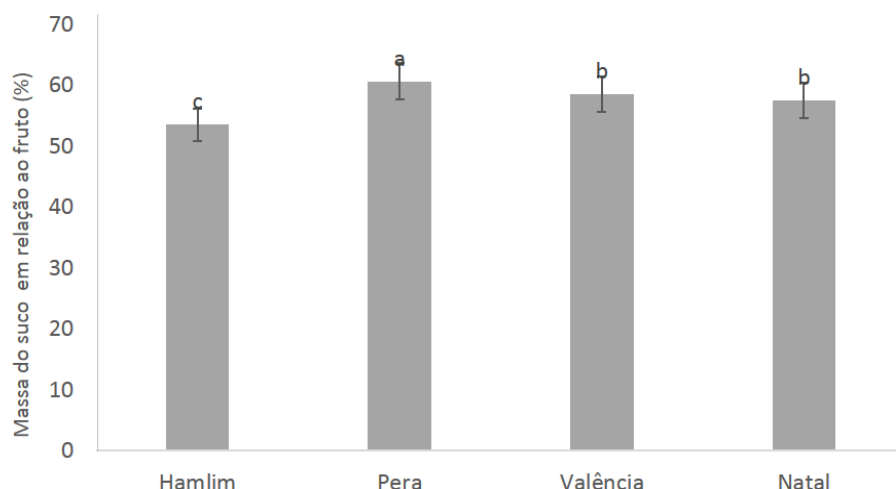
2.2.5 Análises estatísticas

Os dados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Assistat 7.7 beta.

2.3 Resultados

2.3.1 Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco

A análise do balanço de massas do suco gerado pelo processamento de laranja de diferentes variedades demonstrou que a proporção entre resíduos e suco difere entre as variedades (Figura 2.1). Entre as variedades analisadas, a Pera possui o maior rendimento, correspondendo a 60,55% de suco e a Hamlin o menor, correspondendo a 53,44% de suco. Considerando as porcentagens das massas de todas as variedades em todas as safras a média de suco foi de 57,48%.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Skott Knott ($p \leq 0,05$).

Figura 2.1 Balanço de massas de suco de laranja de diferentes variedades (safras de 07/08 a 15/16)

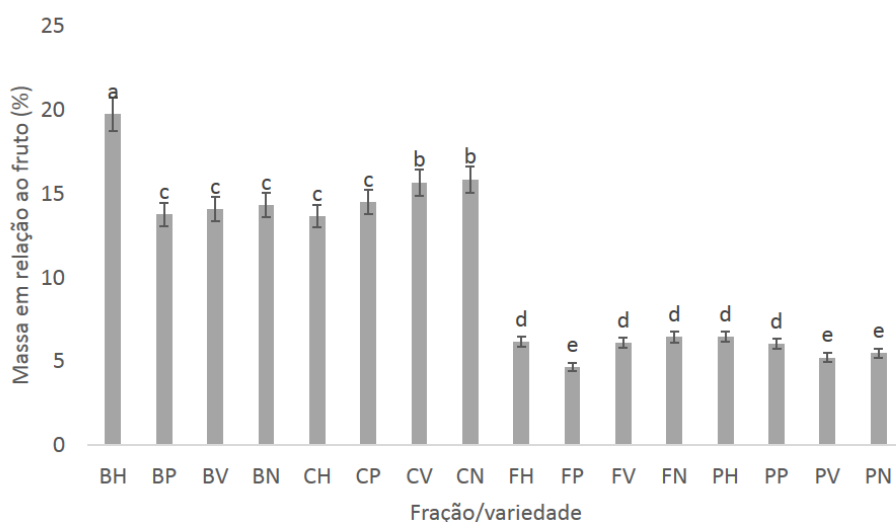
A análise do balanço de massas dos resíduos do processamento de laranja de diferentes variedades demonstrou que há diferenças significativas entre as porcentagens de frações de cada variedade (Figura 2.2). As frações mais abundantes são bagaço e casca, chegando a 19,44% de massa para bagaço da variedade Hamlin e 15,86% de massa para casca da variedade Natal.

Em relação aos dados obtidos da variedade Hamlin observou-se diferenças significativas entre as frações de resíduos geradas, sendo que a fração de resíduo mais abundante é o bagaço, e as menores são de *frit* e polpa, chegando a 6,14% e 6,46% de massa, respectivamente, em relação ao fruto.

Para os resíduos de todas as variedades essas diferenças significativas entre as frações geradas também foram observadas. Para a variedade Pera as frações de resíduos mais abundantes são de bagaço e casca, correspondendo a 13,76% e 14,50% de massa, respectivamente; e a menor de *frit* correspondendo a 4,65% de massa em relação ao fruto. Para a variedade Valência, as frações de resíduos mais abundantes são de bagaço e casca, correspondendo a 14,07% e 15,66% de massa, respectivamente; e a menor de polpa correspondendo a 5,22% de massa em relação ao fruto. Já para a Natal as frações de resíduos

mais abundantes são de bagaço e casca, correspondendo a 14,44% e 15,84% de massa, respectivamente; e a menor de polpa correspondendo a 5,64% de massa em relação ao fruto.

Assim, conclui-se que, a média geral (todas as safras e variedades) de rendimento de suco é de 57% da massa do fruto e, o restante, 43% da massa do fruto é convertido em resíduo; sendo que os resíduos são constituídos por cerca de 37% de bagaço, 35% de casca, 14% de *frit* e 13% de polpa.



*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Skott Knott ($p \leq 0,05$).

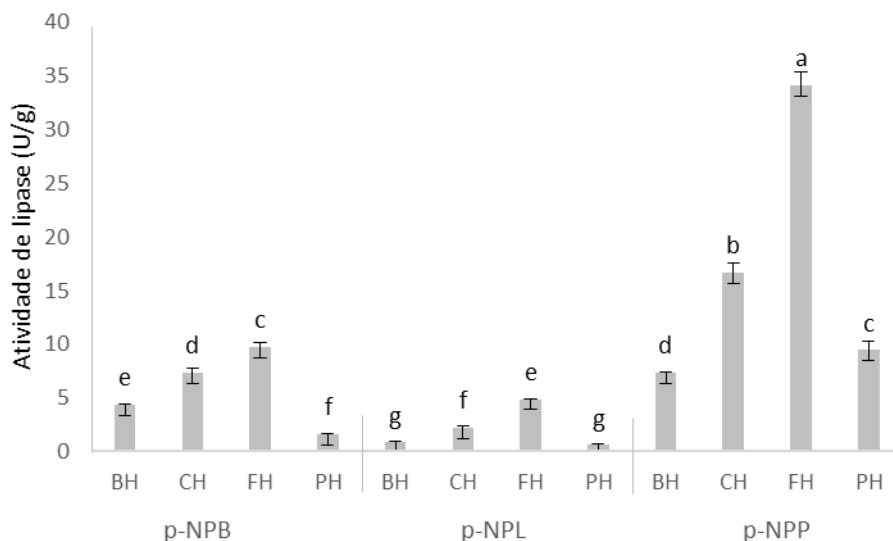
Figura 2.2 Balanço de massas dos resíduos do processamento de suco de laranja de diferentes variedades, safras de 2007/08 a 2015/16, das frações bagaço (B), casca (C), *frit* (F) e polpa (P) das variedades Natal (N), Hamlin (H) e Valência (V) (código formado por letra referente à fração seguida por letra referente à variedade)

2.3.2 Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja

Os extratos obtidos de todas as frações de resíduos de laranja da variedade Hamlin, apresentaram atividade de lipase em azeite de oliva emulsionado, sob condições padrão, isto é, pH 7,0 e 40°C. Durante esta etapa, as atividades médias foram de 25,9 U/g para o *frit*; 38,4 U/g para casca; 41,1 U/g para bagaço e 41,2 U/g para a polpa.

Todos os extratos apresentaram atividade de hidrólise dos substratos sintéticos de diferentes tamanhos de cadeia, porém, houve diferença entre a intensidade da atividade

apresentada pelos diferentes extratos. As lipases de *frit* apresentaram maior atividade quando comparados aos outros extratos na hidrólise dos três substratos sintéticos testados, correspondendo a cerca de 9,46 U/g para p-NPB; 4,88 U/g para p-NPL e 34,12 U/g para p-NPP (Figura 2.3).



* Os valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott Knott test ($p \leq 0,05$).

Figura 2.3 Atividade de lipase de laranja variedade Hamlin em substratos p-NP (para-nitrofenil); frações bagaço (B), casca (C), frit (F) e polpa (P) da variedade Hamlin (H) (código formado por letra referente à fração seguida por letra referente à variedade)

No estudo do pH ótimo a atividade máxima para o *frit*, casca e polpa ocorreu em pH 7 e para o bagaço em pH 6. Sendo que todos os extratos apresentaram maior atividade na faixa de pH entre 5 e 8 (Figura 2.4).

No estudo de pH de estabilidade a atividade máxima para o *frit*, casca e polpa foi em pH 7 e para bagaço em pH 6. Entretanto, houveram diferenças nos perfis apresentados entre as diferentes frações. O *frit* e a casca apresentaram elevada atividade na faixa de pH de 6 a 8, já o bagaço apresentou 3 picos, em pH 5, 7 e 9, enquanto a polpa apresentou atividade em pH 5, queda em pH 6 e pico em pH 7 (Figura 2.5).

Nos estudos de temperatura ótima e de estabilidade os quatro extratos apresentaram maior atividade em 40°C, sendo que foi verificada atividade de lipases em todos os extratos de 30 a 60°C (Figura 2.6 e 2.7).

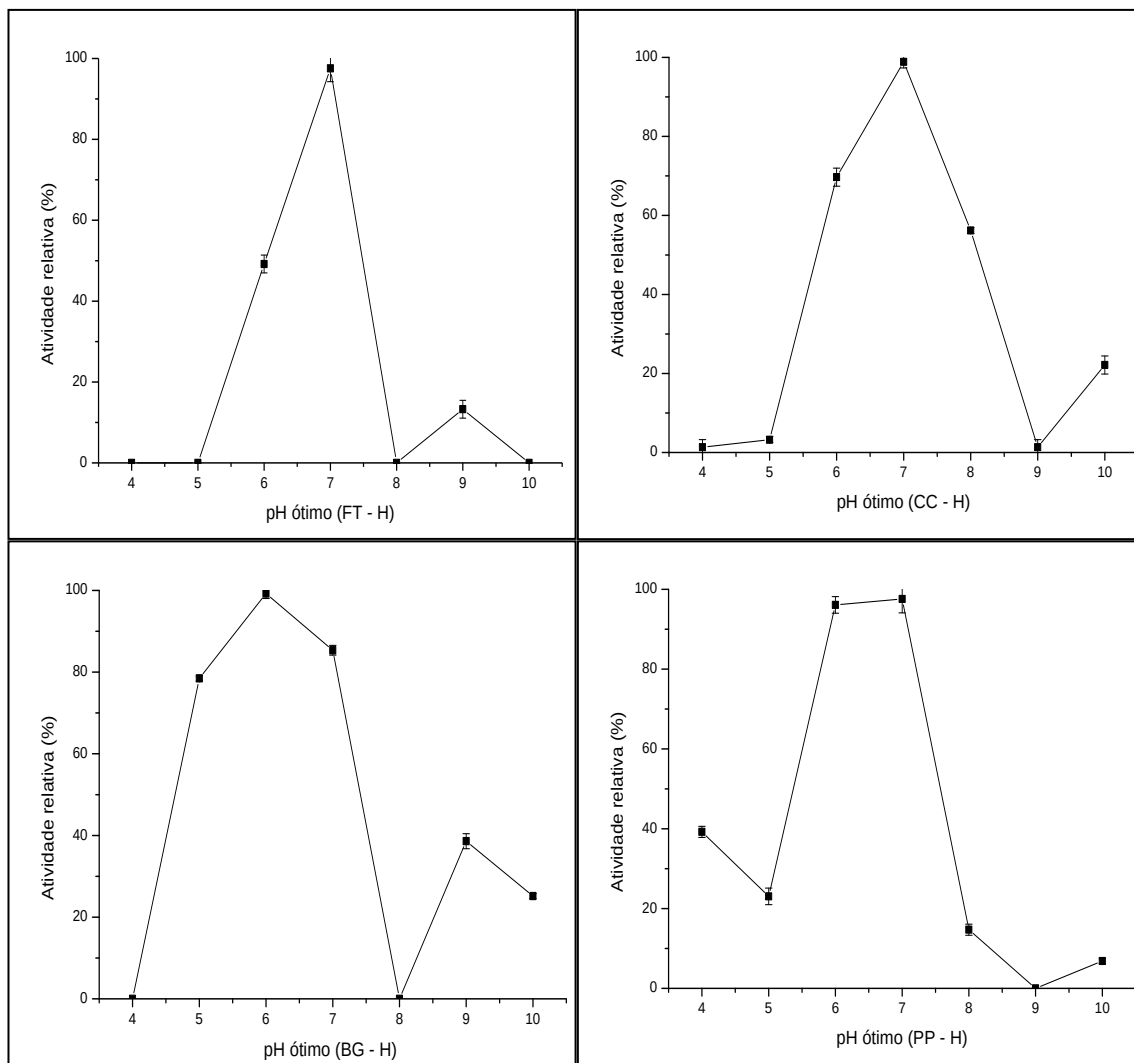


Figura 2.4 Estudo de pH ótimo de extratos resíduos de laranja Hamlin (FT – frit; CC – casca; BG – bagaço; PP – polpa; H – variedade Hamlin)

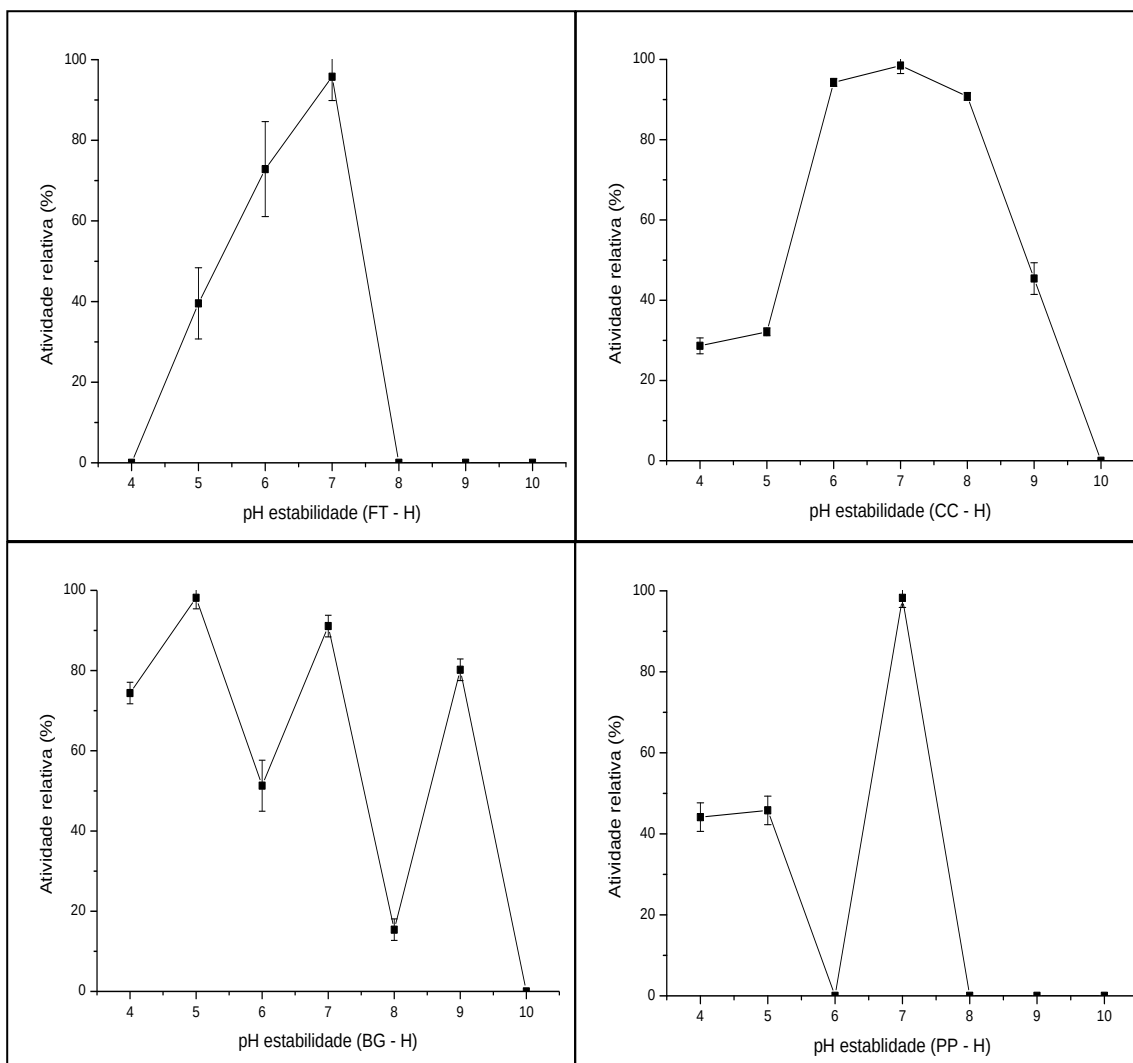


Figura 2.5 Estudo de pH de estabilidade de extratos resíduos de laranja Hamlin (FT – frit; CC – casca; BG – bagaço; PP – polpa; H – variedade Hamlin)

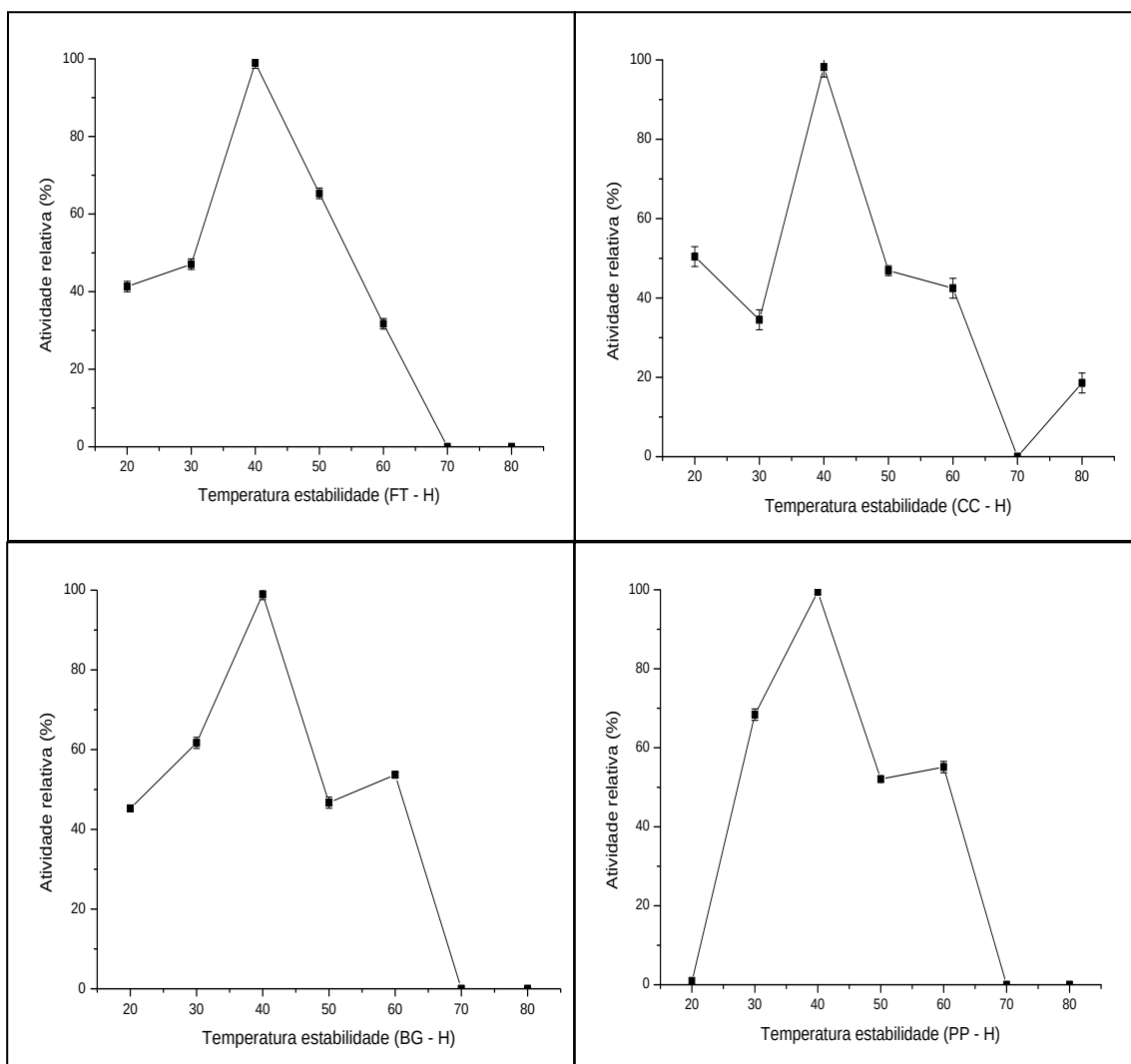


Figura 2.6 Estudo de temperatura ótima de extratos resíduos de laranja Hamlin (FT – frit; CC – casca; BG – bagaço; PP – polpa; H – variedade Hamlin)

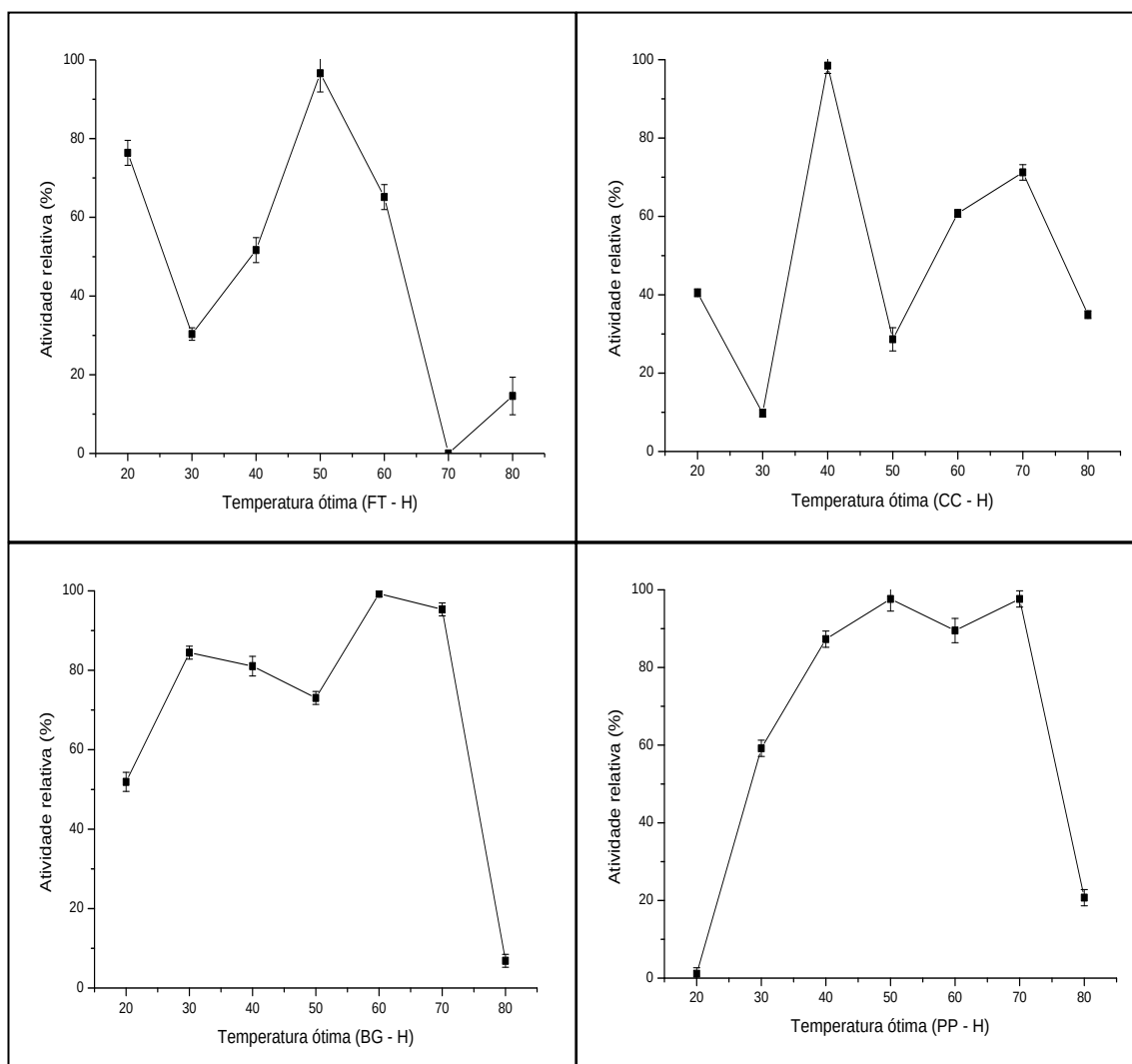


Figura 2.7 Estudo de temperatura de estabilidade de extratos resíduos de laranja Hamlin (FT – frit; CC – casca; BG – bagaço; PP – polpa; H – variedade Hamlin)

2.4 Discussão

2.4.1 Perfil de resíduos gerados no processamento de laranja para suco

Os dados obtidos no balanço de massas do processamento de laranja para suco demonstraram que a proporção média foi de 57,48% de suco em relação à massa do fruto, similar ao descrito por Ladaniya (2009) que descreveu que de 45 a 60% do fruto é convertido em suco. Considerando que na safra de 2015/16 foram processadas cerca de 10 milhões de toneladas de laranja (CITRUS BR, 2017), conclui-se que foram geradas aproximadamente 4,2 milhões de toneladas (Mt) de resíduos do processamento de laranja no Brasil, sendo 1,5 Mt de bagaço; 1,4 Mt de casca; 0,5 Mt de *frit*; e Mt de polpa cítrica.

O bagaço é a fração gerada em maior quantidade, sendo que para a variedade Hamlin a proporção é ainda maior, o que provavelmente, influencia no rendimento de suco, o qual para essa variedade possui menor porcentagem de suco e menor concentração de sólidos solúveis (CITRUS BR, 2015, CITROSUCO, 2016).

A casca é a fração com a segunda maior porcentagem de massa gerada no processamento e é o resíduo de laranja mais estudado. A busca pela expressão "*orange peel*" pelo sistema de arquivos científicos Science Direct registrou 15.605 resultados, entre os quais há diversos exemplos de aplicações biotecnológicas. Boukroufa et al. (2015) utilizou a casca para extração de pectina, polifenóis e óleos essenciais; e Mantzouridou et al. (2015) utilizou esse resíduo como substrato em processos fermentativos utilizando levedura visando à obtenção de aromas. Entretanto, é interessante ressaltar que na maioria dos estudos a expressão "*orange peel*" é utilizada para definir todos os resíduos provenientes da extração de suco cítrico, o que pode interferir na avaliação do potencial dessa e das outras frações de resíduos gerados.

O *frit* é gerado em menor proporção, porém, é considerada a fração de resíduo mais valiosa por ser a mais utilizada para extração de óleo essencial (ASSOCITRUS, 2013). A variedade Pera demonstrou menor porcentagem em relação às demais, entretanto, por ser a

variedade mais utilizada no Brasil, a menor porcentagem dessa fração para essa variedade não influencia sua oferta.

A polpa, assim como o *frit*, é gerada em menor proporção e é a única fração de resíduo analisada neste estudo que não é gerada durante a extração de suco pela extratora *in line*, sendo separada do suco bruto em equipamentos denominados de *finishers* (QUEIROZ E MENEZES, 2005). Dessa forma, constitui o resíduo com características mais semelhantes ao suco, por isso, é a fração de maior palatabilidade sendo utilizada na alimentação humana e animal, como o descrito por Antezana et al. (2015) e Beccaccia et al. (2015).

Assim sendo, o processamento de laranja para suco gera elevada quantidade de resíduos que podem ser utilizados para obtenção de produtos biotecnológicos.

2.4.2 Caracterização de lipases obtidas de resíduos de laranja

Os dados obtidos neste estudo indicam que, em geral, as lipases provenientes de resíduos de laranja respondem de maneira similar às alterações no meio reacional, apresentando maior atividade em faixa de pH de 6 a 8 e em temperaturas até 50°C. Esses dados corroboram com o verificado por Okino-Delgado e Fleuri (2014) sobre lipases obtidas de resíduos da variedade Pera. Dessa forma, as diferentes variedades de laranja podem ser utilizadas como fonte de lipases com características bioquímicas similares, com exceção das lipases de polpa, que apresentaram diferenças nos estudos de influência de pH e temperatura ótimos e de estabilidade.

As lipases pesquisadas neste estudo apresentaram versatilidade hidrolisando substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica com destaque positivo para as lipases de casca e *frit* e negativo para as de polpa. Dessa forma, considera-se que as lipases de polpa e bagaço possuem características diferentes das lipases de casca e *frit*, quanto à especificidade por diferentes cadeias carbônicas. Isso pode ser explicado devido ao fato das frações *frit* e casca possuírem mesma origem anatômica, sendo constituídas pelo epicarpo; enquanto o bagaço é composto pelo mesocarpo e a polpa pelo endocarpo do fruto.

O resumo dos resultados obtidos no presente estudo pode ser verificado na Figura 2.8, na qual verifica-se que os resíduos do processamento de laranja para suco possuem elevado potencial como fonte de lipases, dada a expressividade e longa extensão da produção e processamento dos frutos, bem como devido à elevada proporção de resíduos gerados e pelas características das lipases obtidas das diferentes frações.

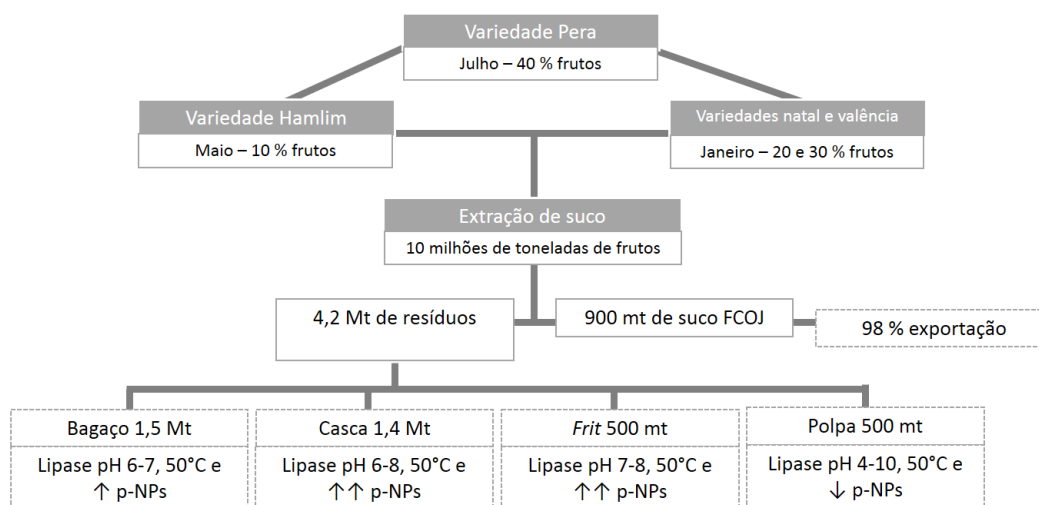


Figura 2.8 Panorama do processamento de laranja para suco no Brasil e análise de seus resíduos como fonte de lipase (FCOJ - frozen concentrate orange juice; p-NP - substratos sintéticos p-nitrofenil)

Se considerada a atividade específica média e os volumes totais de gerados de cada fração de resíduo, pode-se estimar que o potencial de atividade de lipase anual é de $3,5 \times 10^{13}$ U de lipase para bagaço e casca e de $1,1 \times 10^{13}$ U de lipase para frit e polpa, o que evidencia o potencial da aplicação desses resíduos para a obtenção dessas enzimas.

2.5 Conclusão

Os resíduos de laranja das variedades Hamlin processadas para suco podem ser utilizados para obtenção de enzimas lipases. Entretanto, verificou-se que há diferenças entre as lipases de diferentes frações de resíduos e em relação à intensidade de atividade, influência física e química no meio reacional.

2.6 Agradecimentos

À UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / Processos 2014/10962-7 e 2015/01753-8), CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

2.7 Referências bibliográficas

- Antezana, W.; Calvet, S.; Beccaccia, A.; Ferrera, P.; De Blas, C.; García-Rebollar, P.; Cerisuelo, A. (2015) Effects of nutrition on digestion efficiency and gaseous emissions from slurry in growing pigs: III. Influence of varying the dietary level of calcium soap of palm fatty acids distillate with or without orange pulp supplementation. *Animal Feed Science and Technology*, 209: 128–136.
- Aranha C.P.M. (2011) Caracterização de óleos extraídos de sementes de laranjas (*Citrus sinensis*) como aproveitamento de resíduos agroindustriais. 20/12/2011. 76f. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto da Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- ASSOCITRUS - Associação Brasileira de Citricultores (2013) Documentos. Disponível em: www.associtrus.com.br/. Acessado em dezembro de 2016.
- Boukroufa, M.; Boutekedjiret, C.; Petigny, L.; Rakatomanomana, N.; Chemat, T. F. (2015) Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics sonochemistry*, 24: 72–79.
- Beccaccia, A.; Calvet, S.; Cerisuelo, A.; Ferrer, P.; García-Rebollar, P.; De Blasa, C. (2015) Effects of nutrition on digestion efficiency and gaseous emissions from slurry in growing-finishing pigs. I. Influence of the inclusion of two levels of orange pulp and carob meal in isofibrous diets. *Animal Feed Science and Technology*, 208: 158–169.

- Calado, C. R. C.; Monteiro, S. M. S.; Cabrali, J. M. S.; Fonseca L. P. (2002) Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93: 354.
- CITRUS BR – Associação Brasileira de Exportadores de Sucos Cítricos (2017) Dados de rendimento e processamento da safra 2015/2016. Disponível em: www.citrusbr.com.br. Acessado em abril de 2017.
- CITRUS BR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos (2015) O retrato da citricultura brasileira. Disponível em: www.citrusbr.com.br. Acessado em abril de 2017.
- CITROSUCO (2017) Relatório de sustentabilidade safra 2015/2016. Disponível em: www.citrosuco.com.br. Acessado em abril de 2017.
- Fleuri L. F. (2016) Resíduos como fontes diretas e indiretas de enzimas. Tese de livre docência apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da – Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).
- Fleuri L. F.; Novelli P. K.; Delgado C. H. O.; Pivetta M. R.; Pereira M. S.; Arcuri M. L. C.; Capoville B. L. (2014) Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 2585–2591.
- Fleuri L. F.; Oliveira M. C.; Arcuri M. L. C.; Capoville B. L.; Pereira M. S.; Okino-Delgado C. H.; Novelli P. K. (2014b) Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 23(4): 1199–1205.
- Gutarra, M. L. E.; Godoy, M. G.; Maugeri, F.; Rodrigues, M. I.; Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. (2009) Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100: 5249.

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016) Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em: www.ftp.ibge.gov.br. Acessado em abril de 2017.
- Ladaniya M. (2009) Citrus fruit – Biology, technology and evaluation. Elsevier Inc. San Diego, CA.
- Lerma-García, M. J.; D’Amato, A.; Simó-Alfonso, E. F.; Righetti, P. G.; Fasoli, E. (2016) Orange proteomic fingerprinting: From fruit to commercial juices. Food Chemistry 196: 739–749.
- Lopes, D. B.; Fraga, L. P.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. (2011) Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? Ciência e Tecnologia de Alimentos, 31:1.
- Lucera, A.; Costa, C.; Conte, A.; Del-Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. Frontiers in Microbiology, 3: 103–115.
- Macedo, G. A.; Pastore, G. M.; Park, Y. K. (1997). Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. Revista Brasileira de Microbiologia, 28: 90–95.
- Mantzouridou F. T.; Paraskevopoulou A.; Lalou S. (2015) Yeast flavour production by solid-state fermentation of orange peel waste. Biochemical Engineering Journal, 101: 1–8.
- Okino-Delgado C. H.; Fleuri L. F. (2016) Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. Food Reviews International, 32: 1–14.
- Okino-Delgado C. H.; Fleuri L. F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. Food Chemistry, 163: 103–107.

CAPÍTULO 3: Otimização da atividade de lipases obtidas de resíduos laranja por sinergismo com lipases fúngicas e imobilização enzimática.

3.1 Introdução

O mercado mundial de enzimas movimenta bilhões de dólares anualmente, com aplicações para várias finalidades, em especial nos setores de bebidas e alimentos, produtos de limpeza e fármacos. Entretanto, outras áreas, como a produção de biocombustíveis, vêm ganhando destaque e devem impulsionar um crescimento de mercado cerca de 7% até 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

Entre as enzimas mais comercializadas estão as lipases (triacilglicerol acilhidrolases EC 3.1.1.3), capazes de catalisar a hidrólise e síntese de glicerídeos [mono, di e triacilgliceróis (TAGs)] (Barros et al., 2010). São versáteis quanto à aplicação, sendo mais utilizadas na indústria de alimentos e de detergentes, com potencial para muitas outras finalidades como biorremediação e biocombustíveis, tendo como principais entraves, a expansão de uso e o elevado custo das enzimas (BCC RESEARCH, 2016).

As lipases são obtidas, principalmente, de micro-organismos, representando mais de 60% das enzimas comerciais, mas também podem ser obtidas de animais (cerca de 18%), plantas (aproximadamente 11%) e algas (3%) (PATIL et al., 2011). Lipases obtidas de diferentes fontes podem apresentar características totalmente distintas, diferindo no tipo de reação catalisada, afinidade pelo substrato, K_m , $V_{máx}$, temperatura, pH, comportamento frente a solventes orgânicos e ultrassom (KHAN et al., 2015; SETH et al., 2014; PATIL et al., 2011). Assim, a fonte da lipase parece influenciar suas características. As de origem vegetal costumam ser mais estáveis em pH ácido ao básico, temperaturas inferiores a 60°C, apresentam elevada atividade em extratos brutos, mas são mais sensíveis a solventes orgânicos, por isso, geralmente não mantem elevada atividade após processos de purificação (SETH et al., 2014). Já as lipases microbianas como as de *Candida* sp. são mais específicas e tolerantes a solventes orgânicos, e por isso, são a principal fonte dessas enzimas, no entanto

sua aplicação industrial ainda é limitada devido ao elevado custo de produção (GUPTA et al., 2015; SETH et al., 2014).

Nas aplicações, as condições reacionais geralmente não são homogêneas e contínuas, já que, para a produção de um determinado produto podem ser necessários inúmeros processos. Na produção de biodiesel, por exemplo, a matéria-prima mais comum são os óleos vegetais constituídos por glicerídeos de diferentes números e tamanho de cadeias; os quais podem ser convertidos a ésteres de ácidos graxos pelas reações de alcoólise ou hidrólise seguida de esterificação, utilizando diferentes solventes orgânicos (ANGALAJA et al., 2016).

Dessa forma, encontrar uma fonte de lipases que satisfaça todas as condições e que seja economicamente viável pode ser difícil. Assim, a união de lipases de diferentes fontes e características poderia sanar todas as necessidades, maximizando o bioprocessos. Nesse sentido, as diferentes lipases poderiam se complementar e apresentar efeito sinérgico, aumentando a resistência das enzimas vegetais à presença de solventes, por exemplo, ou aumentando a transformação final pelo aumento da esterificação de ácidos graxos previamente hidrolisados por outras lipases.

Outro processo que auxilia a viabilidade da catálise enzimática é a imobilização, pois, além de possibilitar a reutilização por processos simples como filtração ou centrifugação, pode disponibilizar sítios ativos retirando interferentes externos, aumentar a resistência à presença de solventes e a estabilidade térmica (TIAN et al., 2016; AGUIEIRAS et al., 2015).

Neste contexto, o presente trabalho testou o efeito sinérgico de lipases fúngicas e vegetais, bem como, o comportamento da mistura em diferentes condições reacionais, incluindo diferentes solventes orgânicos, presença de ultrassom, glicerídeos de tamanhos de cadeia diferentes e imobilização por adsorção e encapsulação.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Extratos lipolíticos

Foram utilizados extratos de lipases de origem fúngica e vegetal obtidos pelo próprio grupo de pesquisa e os métodos de obtenção e resumo das características estão descritos a seguir.

O extrato fúngico foi obtido do fungo *Aspergillus* sp. 01 por meio de fermentação em estado sólido (FES) utilizando como substrato o farelo de trigo e incubação por 120 h a 30°C. Após esse período, foram adicionados 50 mL de água destilada e o filtrado foi considerado o extrato bruto. Essas lipases, após liofilização, apresentaram atividade de cerca de 68 U/g, estabilidade em pH alcalino (8,0 a 9,0) e pico de temperatura ótima a 50°C. Apresentaram afinidade por substratos de cadeia curta, média e longa e foram capazes de catalisar as reações de hidrólise e alcoólise de óleos vegetais, assim como a esterificação de ácido oleico com etanol (FLEURI et al., 2014a e b).

O extrato vegetal foi obtido da fração do fragmento de casca denominado *frit* no processamento de laranja da variedade Pera para suco. Os resíduos foram coletados, embalados e armazenados por até 2 dias a 5°C. Para as análises foram triturados mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³, seguido de adição de água e o filtrado foi considerado o extrato bruto. Essas enzimas apresentam atividade de cerca de 70 U/g, estabilidade em pH ácido (6,0) e dois picos de temperatura ótima a 20 e 60°C (OKINO-DELGADO e FLEURI, 2014). Quanto à afinidade por substratos, as lipases provenientes do *frit* foram capazes de catalisar a hidrólise de substratos sintéticos de cadeia longa e média, como também a hidrólise e alcoólise de óleos vegetais, bem como a esterificação de ácido oleico com etanol.

Ambos os extratos foram obtidos a partir de resíduos agroindustriais, por métodos simples e pouco onerosos e tóxicos. Além disso, foram selecionados por apresentarem atividades elevadas e semelhantes; e por possuírem características bioquímicas distintas e complementares. Dessa forma, esses extratos foram combinados com o objetivo da mistura apresentar desempenho melhor que os extratos isolados. Assim, hipoteticamente a mistura poderia apresentar atividade em faixa ampliada de pH, maior taxa de atividade em reações em substratos de diferentes tamanhos de cadeia e maior resistência na presença de solventes orgânicos e banho de ultrassom.

3.2.2 Atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada em azeite de oliva emulsionado seguindo a metodologia descrita por Macedo et al. (1997) e Lopes et al. (2011) modificada por Okino-Delgado e Fleuri (2014). Os resultados foram expressos em unidade de atividade de lipase definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto por grama de extrato enzimático. Para a determinação da atividade específica de lipase foi verificada a concentração das proteínas totais no extrato enzimático, conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

3.2.3 Efeito sinérgico

O estudo do efeito sinérgico dos extratos fúngico e vegetal foi delineado em arranjo fatorial duplo (5 x 5), sendo cinco concentrações de extrato fúngico de *Aspergillus* sp. 01 (0, 25, 50, 75 e 100%) e cinco concentrações de extrato vegetal de *frit* de laranja (0, 25, 50, 75 e 100%), totalizando 25 combinações. O experimento foi conduzido em triplicata.

A atividade de lipase foi calculada sobre óleo de oliva comparando os resultados teóricos e observados, sendo essa relação denominada de porcentagem proporcional. Quando a porcentagem proporcional foi maior que 100% foi considerado que houve efeito sinérgico entre os extratos. Para a análise dos dados foi utilizada análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,01$), utilizando o programa Assistat 7.7 beta.

3.2.4 Maximização da atividade lipolítica

A combinação de maior valor experimental observado em relação ao valor experimental teórico foi utilizada nos estudos de maximização de atividade. Em todas as etapas desse estudo foram testados os extratos isolados e a combinação que apresentou efeito sinérgico.

3.2.5 Efeito de solventes orgânicos

Para o estudo do efeito de solventes orgânicos foi analisada a atividade lipolítica em meio reacional semelhante ao utilizado no item 3.2.2, apenas diferenciando na adição de solvente. Foram testadas soluções 30% de acetona, etanol e metanol. A mistura de solvente, extrato enzimático e tampão permaneceu em temperatura ambiente por 24 h e após este período foi mensurada a atividade de lipase. O valor de atividade sem a adição dos solventes foi considerado atividade relativa de 100%.

3.2.6 Efeito do Ultrassom

Para o estudo do efeito de ultrassom foi analisada a atividade lipolítica em meio reacional semelhante ao utilizado no item 3.2.2 diferindo apenas no tratamento com períodos de banho de ultrassom de 10, 20 e 30 segundos na frequência de 50 kHz. A mistura de extrato enzimático e tampão foi submetida em banho de ultrassom, após este período foi mensurada a atividade de lipase. O valor de atividade sem o banho de ultrassom foi considerado atividade relativa de 100%.

3.2.7 Estudo de especificidade

Foi analisada a afinidade dos extratos isolados e combinados por ácidos graxos de cadeia longa utilizando o p-nitrofenil palmitato (p-NPP) (MAHADIK et al., 2002; Lopes et al., 2011]; cadeia média utilizando o p-nitrofenil laurato (p-NPL) (Gutarra et al., 2009); e cadeia curta com p-nitrofenil-butirato (p-NPB) (LOPES et al., 2011; CALADO et al., 2002).

3.2.8 Imobilização

Os extratos isolados e combinados foram testados quanto à imobilização enzimática, por adsorção e por encapsulação.

A imobilização por adsorção foi testada utilizando como suporte celite, sílica, óxido de alumínio e Lewatti, todos da marca Sigma-Aldrich®. Os suportes foram preparados seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi analisada a atividade lipolítica em meio reacional semelhante à utilizada no item de 3.2.2.

O estudo de imobilização por métodos de encapsulação testou alginato de cálcio e gelatina (ANGELOTTI et al., 2013). Para a imobilização das lipases em alginato de cálcio foi preparado solução homogeneizada contendo 2 mL de solução 3% de alginato de sódio em tampão fosfato 0,1M pH 7,0 e 200 μ L da suspensão de 0,1 mL da enzima diluída no mesmo tampão. A mistura foi transferida para seringa com agulha (20Gx2") e gotejada em béquer contendo 10 mL de solução 0,3M de CaCl_2 para a formação das cápsulas que ficaram 2 h sob agitação lenta para a cura. Em seguida as cápsulas foram peneiradas, lavadas com o tampão e armazenadas a 5°C. As enzimas imobilizadas e alíquotas da solução de CaCl_2 e do tampão de lavagem foram recolhidas para a determinação da atividade enzimática e para o cálculo da eficiência de encapsulação.

Para a imobilização das lipases em gelatina foi preparada solução contendo 1g de gelatina e 1 mL de tampão fosfato 0,1M pH 7,0. A solução foi aquecida para a solubilização do agente imobilizador a 40°C. Alíquotas de 2 mL da solução de gelatina foram homogeneizadas com 200 μ L de extrato enzimático e transferidas para placas de petri. As placas foram armazenadas a 5°C por 1 h para solidificação. Em seguida foram adicionados 4 mL de glutaraldeído 10% sobre a camada de gelatina para a reticulação. As placas foram novamente armazenadas a 5°C por 1 h. O sobrenadante foi removido, as amostras de enzima em gelatina foram cortadas em tamanhos homogêneos de 2x2 mm e armazenadas em tampão fosfato 0,1M pH 7,0. As enzimas imobilizadas e alíquotas do tampão de armazenamento foram recolhidas para a determinação da atividade enzimática e para o cálculo da eficiência de encapsulação.

A atividade de lipase sobre óleo de oliva como substrato foi calculada comparando os resultados teóricos e observados, sendo essa relação denominada porcentagem proporcional. Quando a porcentagem proporcional foi maior que 100% foi considerado que houve efeito sinérgico entre os extratos. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e para a análise dos dados foi utilizado o programa Assistat 7.7 beta, análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

3.3 Resultados

3.3.1 Efeito sinérgico

Houve diferença na atividade de lipase entre as diferentes concentrações de extrato fúngico e vegetal. A análise dos dados mostrou que há interação significativa entre os fatores ao nível de 1% de probabilidade. Nas combinações com baixa concentração de extratos fúngicos e vegetais a atividade foi baixa, aumentando conforme o aumento da concentração de extratos. A atividade relativa de lipase permaneceu elevada, acima de 50%, em combinações com mais de 25% de extrato fúngico e vegetal. Entretanto, acima de 75% de extrato fúngico não houve diferenças significativas, demonstrando que a partir deste ponto, o aumento da atividade não correspondeu ao aumento na concentração de extratos enzimáticos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 Efeito sinérgico de extratos lipolíticos fúngico e vegetal na atividade de lipase utilizando o óleo de oliva como substrato

% de extrato vegetal →	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %
% de extrato fúngico ↓					
0 %	0,00 bC	14,72 bC	68,50 aB	104,17 aA	99,36 aA
25 %	20,94 bB	88,32 aA	68,31 aA	62,56 cA	65,90 bA
50 %	110,96 aA	100,40 aAB	56,90 aC	65,90 bcC	82,28 abBC
75 %	109,83 aA	99,03 aA	67,03 aB	103,98 aA	93,98 aA
100 %	117,76 aA	85,15 aB	83,22 aB	91,55 abAB	107,71 aAB

Letras minúsculas comparam médias na coluna e letras maiúsculas comparam médias na linha. Médias seguidas pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativas pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,01$).

Os valores experimentais observados apresentados na Tabela 3.1 foram comparados aos valores experimentais teóricos, essa comparação pode ser verificada na Tabela 3.2, na qual, verifica-se o efeito sinérgico nas combinações de 25% de extrato fúngico e 25% de extrato vegetal, correspondendo a 223% de atividade proporcional. Na combinação de 50% de extrato fúngico e 25% de extrato vegetal, correspondendo a 155% de atividade proporcional; e na combinação de 75% de extrato fúngico e 25% de extrato vegetal, correspondendo a 120% de atividade proporcional. Nas combinações com maiores concentrações do extrato vegetal, a atividade observada foi menor que a teórica, indicando que o efeito sinérgico ocorre em baixa concentração de extrato vegetal.

Tabela 3.2 Efeito sinérgico de extratos fúngico e vegetal na atividade de lipase utilizando o óleo de oliva como substrato (comparação entre valores teóricos e observados)

Tratamentos	Extrato fúngico (%)	Extrato Vegetal (%)	% proporcional
1	0	0	0
2	0	25	100,00
3	0	50	100,00
4	0	75	100,00
5	0	100	100,00
6	25	0	100,00
7	25	25	223,26*
8	25	50	73,19
9	25	75	48,49
10	25	100	53,06
11	50	0	100,00
12	50	25	155,90*
13	50	50	48,14
14	50	75	42,83
15	50	100	55,21
16	75	0	100,00
17	75	25	75,81
18	75	50	46,87
19	75	75	58,19
20	75	100	54,05
21	100	0	100,00
22	100	25	74,64
23	100	50	49,58
24	100	75	44,98
25	100	100	54,20
14	50	75	45,78
16	75	0	109,41
17	75	25	120,86*
19	75	75	53,44
20	75	100	61,03
24	100	75	58,46
25	100	100	50,29

*valores acima de 100% representam efeito sinérgico

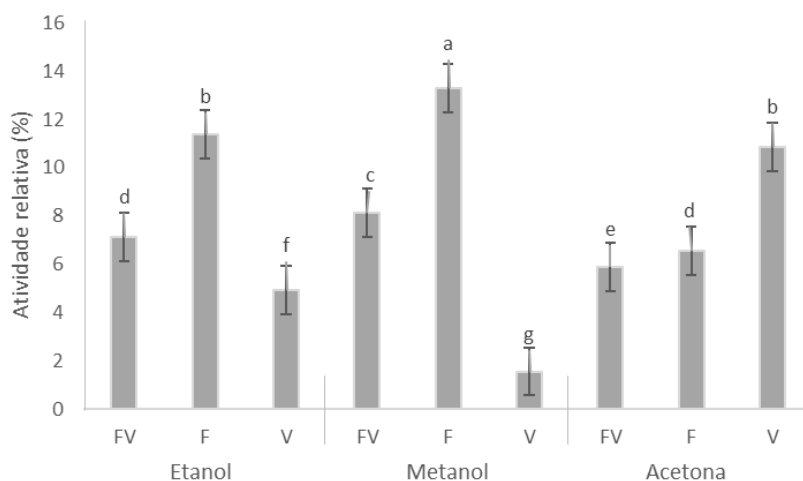
Apesar da % de atividade proporcional ser maior para a combinação 25% de extrato fúngico (F)/25% de extrato vegetal (V) a atividade real foi menor que nas duas outras

combinações que apresentaram efeito sinérgico. Dessa forma, foi selecionada a combinação de 50% F/25% V para os estudos de maximização de atividade.

3.3.2 Maximização da atividade lipolítica com a combinação de extratos 50%F/25% V

Foram realizados testes simulando situações comuns aos meios reacionais de diversas aplicações com o intuito de verificar se a combinação de extratos 50% F/25% V, o qual apresentou efeito sinérgico em reação de hidrólise de azeite de oliva, mantém sua atividade em condições adversas. Foram também analisados os extratos isolados para comparação. O resumo dos resultados destes testes pode ser verificado nas Figuras 3.1, 3.2 e 3.3.

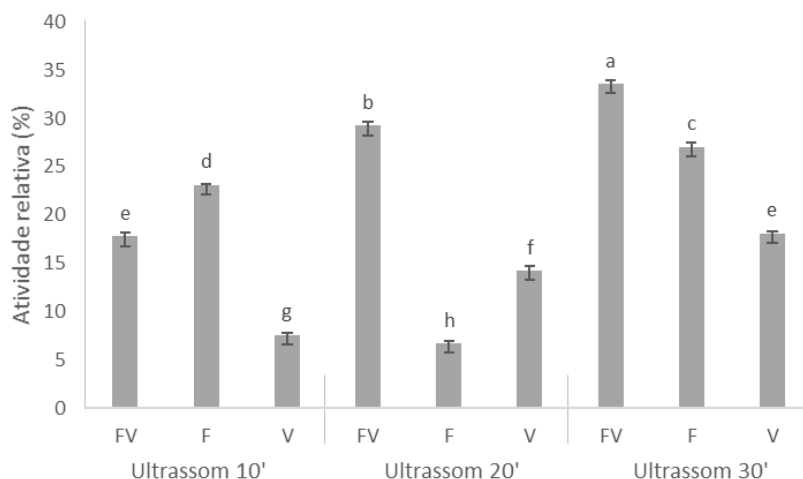
A atividade de lipase diminuiu em todas as combinações de extratos e solventes, ficando abaixo do valor experimental teórico, correspondendo a cerca de 11,3% de atividade relativa para lipase fúngica em etanol; 13,3% de atividade relativa para lipase fúngica em metanol; e 10,8% de atividade relativa para lipase vegetal em acetona. Esses resultados indicam que as lipases contidas nesses extratos não são estáveis nos solventes testados. Não foi observado efeito sinérgico, pois a atividade da combinação de extrato fúngico e vegetal foi menor que os extratos isolados para os três solventes (Figura 3.1).



*Os valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 3.1 Efeito de solventes na atividade de lipase de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato (FV – 50% lipase fúngica/25% lipase vegetal; F-100% lipase fúngica; V 100% lipase vegetal).

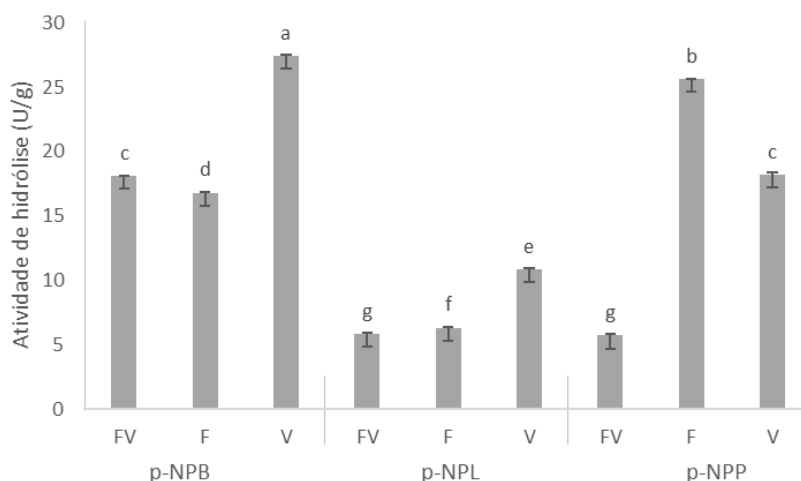
A atividade de lipase dos extratos combinados e isolados também diminuiu na presença de ultrassom em relação à atividade mensurada na ausência deste tratamento. Porém, foi verificado efeito sinérgico após os tratamentos de 20 e 30', correspondendo a cerca de 29,5% e 33,4% de atividade relativa, respectivamente (Figura 3.2).



*Os valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 3.2 Efeito de ultrassom na atividade de lipase de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato (FV – 50% lipase fúngica/25% lipase vegetal; F-100% lipase fúngica; V 100% lipase vegetal).

Foram observadas atividade de hidrólise de p-NPP, p-NPB e p-NPL em todas as combinações de extratos e substratos testados, indicando que as lipases fúngica e vegetal possuem afinidade por diferentes substratos. Houve efeito sinérgico em p-NPP e p-NPL, já que a % de atividade proporcional da combinação de extratos foi maior que a dos extratos isolados. Entretanto, para p-NPB a combinação de extratos implicou em % de atividade proporcional de cerca de 1/3 do esperado, indicando efeito antagônico (Figura 3.3).



*Os valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 3.3 Atividade de lipase em substratos sintéticos de extratos fúngico e vegetal combinados e isolados utilizando o óleo de oliva como substrato (FV – 50% lipase fúngica/25% lipase vegetal; F-100% lipase fúngica; V 100% lipase vegetal).

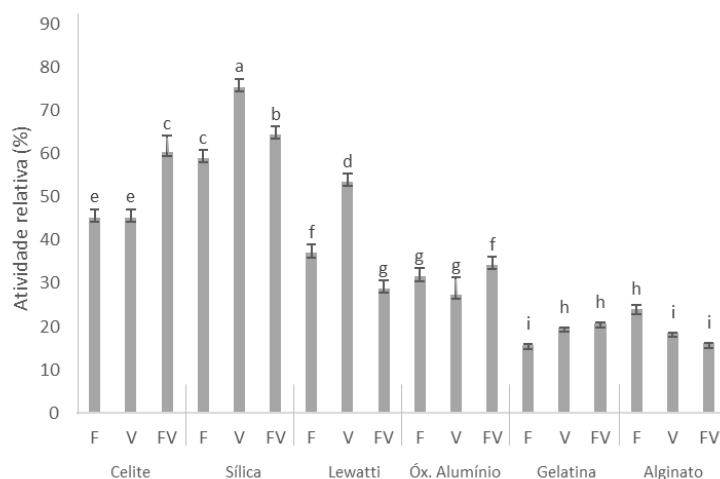
Foram realizados testes de imobilização de lipases dos extratos fúngico e vegetal isolados e combinados na proporção de 50% F/25% V. O resumo dos resultados obtidos pode ser verificado na Figura 3.4.

Os extratos fúngico e vegetal não apresentaram bons resultados para a imobilização por encapsulamento (Figura 3.4). A imobilização de lipases de extrato vegetal e fúngico por alginato de cálcio diminuiu em comparação com a atividade do extrato bruto inicial, sendo que no primeiro ciclo de atividade as lipases imobilizadas apresentaram cerca de 15% da atividade do extrato inicial. Houve migração das lipases da solução de alginato para o cloreto de cálcio (aproximadamente 35% de atividade relativa). Dessa forma, verificamos que o alginato de cálcio fixou pequena porcentagem de lipases. Porém, foi observado que as lipases fúngicas imobilizadas com alginato permaneceram com atividade após o segundo ciclo de atividade, o que demonstrou que após a fixação no alginato de cálcio as lipases se mantêm imobilizadas e com atividade.

Já a imobilização de lipases de extrato vegetal e fúngico isolados e combinados por gelatina também diminuiu significativamente em comparação com a atividade do extrato bruto inicial, sendo que, no primeiro ciclo de atividade as lipases imobilizadas apresentaram

cerca de 15% para o extrato fúngico, 19% para o vegetal e 20% para a mistura de % de atividade proporcional. Houve migração das lipases da solução de gelatina para o glutaraldeído (aproximadamente 50% de atividade relativa). Conclui-se, portanto, que as técnicas não retêm eficientemente as lipases testadas, mas as lipases retidas mantêm a atividade. Assim, estas técnicas poderiam ser utilizadas em conjunto com a imobilização por adsorção, pois com este tipo os resultados são promissores, como descrito a seguir.

O extrato vegetal e fúngico isolados mantiveram atividade elevada para lipases imobilizadas por celite, sílica e Lewatti; enquanto que a mistura de extratos apresentou melhores resultados em celite e sílica, acima de 60% da atividade inicial. O suporte que apresentou melhor desempenho para imobilização de todos os extratos testados foi a sílica, mantendo até cerca de 85% da atividade do extrato bruto vegetal. Dessa forma, conclui-se que a imobilização por adsorção é o método mais indicado para a imobilização das lipases contidas nos extratos testados, principalmente utilizando como suporte a sílica, que conseguiu manter cerca de quatro vezes mais atividade que nas técnicas de imobilização por encapsulamento.



*Os valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 3.4 Imobilização por adsorção e encapsulamento de extratos fúngico e vegetal isolados e combinados

3.4 Discussão

As lipases são serina hidrolases que necessitam da interface orgânica aquosa para catalisarem a hidrólise de ligações éster carboxílicas, entretanto, em meios com teor de água reduzido outras reações são preferenciais como a transesterificação (LOPES et al., 2011; FREIRE E CASTILHO, 2008; PEREIRA et al., 2003). Nessa reação é necessário o uso de solventes para a formação ésteres, por isso, para que as lipases possam catalisar reações de síntese as enzimas devem manter sua atividade na presença de solventes. As lipases testadas neste estudo não mantiveram elevada atividade na presença de solventes orgânicos, corroborando com Mounquengui et al. (2013) e Marchetti et al. (2007) que verificaram que a produção de biodiesel utilizando lipases vegetais é limitada, entre outros fatores, pela sensibilidade das lipases na presença de álcoois. Isso também limita a aplicação dessas enzimas em outros processos utilizando solventes orgânicos, indicando que a mistura possui maior potencial para aplicação em reações de hidrólise e para reações de síntese que utilizem baixo percentual de solvente ou mantenham maior proporção de água em relação ao solvente.

Os extratos isolados apresentaram comportamento diferente em relação aos solventes: o extrato fúngico manteve melhor atividade que o vegetal na presença de etanol e metanol, enquanto, que o extrato vegetal apresentou maior atividade em acetona e menor em metanol. Esses resultados sugerem que as lipases fúngicas testadas possuem maior estabilidade em etanólise.

Apesar da atividade de todas as lipases testadas ter decaído na presença de solventes, observa-se que ela não cessou totalmente, exceto para a mistura de extratos em metanol. Assim, presume-se que essas enzimas não são totalmente desestruturadas e sua atividade na presença de solventes poderia ser aumentada pela manutenção da atividade utilizando estratégias analíticas que diminuam o tempo de contato entre enzima e solvente ou que aumentem sua resistência à presença destes.

O teste de atividade após banho ultrassônico indicou que as lipases testadas mantiveram atividade após o banho de ultrassom, o que demonstra o efeito sinérgico entre as lipases fúngica e vegetal na mistura após 20 e 30 segundos. Dessa forma, esse método poderia ser utilizado para maximizar as reações, diminuindo o tempo de reação, temperatura e concentração de solvente com mesma taxa de conversão, como o apresentado por Khan et al.

(2015) para esterificação de ácido oleico por lipases de *C. antarctica*. Assim, o uso de banho de ultrassom poderia auxiliar a sanar o entrave da sensibilidade das lipases a solventes orgânicos, já que possibilita a diminuição da proporção de solvente no meio reacional, por aumentar a interação entre as fases pela cavitação e diminuição de bolhas, aumentando também o contato entre enzima e substrato devido ao aumento da emulsificação do meio reacional; e o tempo de contato com a enzima por diminuir o tempo de reação (MARTINS et al., 2013; ROKHINA et al., 2009). Além disso, o banho ultrassônico foi utilizado com o intuito de aumentar o poder catalítico das lipases, uma vez que Zhao et al. (2016) verificou que o ultrassom em baixa frequência (menor que 60 kHz) não modificou a estrutura secundária de lipases microbianas, promovendo apenas alterações na estrutura terciária e aumentando a atividade catalítica para reações de hidrólise e síntese. Entretanto, como foi demonstrado no presente estudo esse aumento do poder catalítico não foi verificado, pois houve redução da atividade lipolítica.

No estudo de afinidade por diferentes substratos houve efeito sinérgico entre as lipases fúngica e vegetal para a hidrólise de p-NPP e p-NPL, indicando maior afinidade pela hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa e média. Esses resultados evidenciam a presença de lipases verdadeiras devido à hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa e indicam que a mistura de extratos possui aptidão para a aplicação na modificação de óleos vegetais, que são constituídos majoritariamente por triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa.

A imobilização enzimática aumenta a estabilidade das enzimas devido à proteção contra a ação de solventes, alterações de pH e temperatura; além de possibilitar seu reuso e facilitar a retirada das enzimas do meio reacional após a reação (AN et al., 2015). Entretanto, em geral, apresentam desvantagens como elevada queda de atividade enzimática devido ao bloqueio do sítio ativo da enzima, restrição da flexibilidade e limitação da transferência da massa entre enzima e substrato (DATTA et al., 2012). Por isso, desenvolver o método adequado é indispensável para garantir suas vantagens mantendo a atividade enzimática elevada.

As técnicas de imobilização por encapsulação consistem em confinar as enzimas em polímeros insolúveis, sendo apenas físico não envolvendo interações químicas entre enzima e

suporte, mas limitam a transferência de massa, pois o contato entre enzima e substrato depende da taxa de difusão do substrato no polímero utilizado para aprisionar a enzima (FALKEBORG et al., 2015). As lipases testadas neste estudo apresentaram baixo desempenho para as técnicas de encapsulação utilizando gelatina e alginato como suporte, corroborando com os estudos de Toscano et al. (2014) que verificaram queda na atividade após mobilização. Dessa forma, devido ao baixo desempenho das lipases imobilizadas por encapsulamento, conclui-se, que essa técnica não retém eficientemente as lipases testadas, mas as lipases retidas mantêm a atividade. Assim, poderia ser utilizada em conjunto com outras técnicas que consigam aderir a enzima, como a imobilização por adsorção avaliada neste estudo.

As lipases testadas neste estudo mostraram bom desempenho em imobilização por adsorção mantendo a atividade catalítica elevada, até 85% de atividade em sílica, quando comparado à outras técnicas e suportes de imobilização, como de Lei et al. (2009) e Li et al. (2016). Os primeiros autores obtiveram 63% de atividade em lipases de pâncreas de porco imobilizadas em microesferas magnéticas e os segundos observaram 79% de atividade de lipases microbianas produzidas por *Malassezia globosa* e imobilizadas em epóxi resina. As técnicas de imobilização por adsorção envolvem interações químicas entre enzima e adsorvente, envolvendo diferentes tipos de interações químicas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações covalentes (AN et al., 2015). Estudos recentes vêm demonstrando que a porosidade dos materiais utilizados como suporte está entre os fatores de maior influência na atividade das enzimas imobilizadas, pois, implicam diretamente na capacidade de transferência de massas. As lipases testadas nesse estudo apresentaram resultados promissores para os suportes celite e sílica por terem mantido a atividade das lipases elevadas após imobilização, corroborando com os estudos de Chang et al. (2007) e Li et al. (2016). Esse fato pode ser explicado, provavelmente, devido a esses materiais apresentarem macro e mesoporosidade, possibilitando a rápida transferência de massa; enquanto o Lewatti que é microporoso conferiu menor atividade. Além disso, o celite e a sílica são materiais inertes, não tóxicos e de baixo custo; assim, constituem boas opções de suporte a imobilização das enzimas testadas e poderiam ser utilizadas nas mais diversas áreas como indústria de alimentos, farmacêutica, biodiesel, entre outras.

3.5 Conclusão

Conclui-se que as lipases fúngica e vegetal testadas possuem potencial para aplicação em reações de hidrólise de glicerídeos de diferentes tamanhos de cadeia de ácidos graxos, isolados ou combinados, livres ou imobilizados por adsorção. O efeito sinérgico ocorreu em formulações com maior concentração de extrato fúngico e que também favoreceu o aumento da resistência às alterações no meio reacional em relação aos extratos isolados.

3.6 Referências bibliográficas

- Aguiaras E.C.G.; Cavalcanti-Oliveira E.D.; Freire D.M.G. (2015) Current status and new development of biodiesel production using fungal lipases. *Fuel*, 159: 52–67.
- An N.; Zhou C.H.; Zhuang X.Y.; Tong D.X.; Yu W.H. (2015) Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors. *Applied Clay Science*, 114: 283–296.
- Angalaja G.; Pavan P.; Subashini R. (2016) Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 257–270.
- Barros M.; Fleuri L.F.; Macedo G.A. (2010) Seed Lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27: 15-20.
- BCC Research (2016). Global market for industrial enzymes to be worth \$ 4.4 billion in 2015 (free partial text). Disponível em: <http://www.bccresearch.com/>. Acessado em abril de 2017.
- Calado C.R.C.; Monteiro S.M.S.; Cabrali J.M.S.; Fonseca L.P. (2002) Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(3): 354-359.
- Chang S.F.; Chang S.W.; Yen Y.H. (2007) Shieh CJ Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Applied Clay Science*, 37: 67–73.

- Datta S.; Christena L.R.; Rajaram Y.R.S. (2012) Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotechnology*, 1-9.
- Falkeborg M.; Paitaid P.; Shu A.N.; Pérez B.; Guo Z. (2015) Dodecenyl succinylated alginate as a novel material for encapsulation and hyperactivation of lipases. *Carbohydrate Polymers*, 133(20): 194-202.
- Fleuri L.F.; Cassani M.; Arcuri M.; Capoville B.L.; Pereira M.S.; Delgado C.O.; Novelli P.K. (2014a) 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*, 1:1-15.
- Fleuri L.F.; Novelli P.K.; Delgado C.O.; Pivetta M.R.; Pereira M.S.; Arcuri M.; Capoville B.L. (2014b) Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. *International Journal of Food Science & Technology*, 1:1-18.
- Grand View Research (2016) Enzymes market by type (industrial, specialty), by product (carbohydrases, proteases, lipases, polymerases & nucleases), by application (food & beverages, detergents, animal feed, textile, paper & pulp, nutraceutical, personal care & cosmetics, wastewater, research & biotechnology, diagnostics, biocatalyst) and segment forecasts to 2024 (free partial text). Disponível em: <http://www.grandviewresearch.com>. Acessado em abril de 2017.
- Gupta A.K.; Singh A.K.; Bhatia R.B.; Brinker C.J. (2000) Aqueous Sol-Gel Process for Protein encapsulation. *Chemical Material*, 12: 24-34.
- Gutarra M.L.E.; Godoy M.G.; Maugeri F.; Rodrigues M.I.; Freire D.M.G.; Castilho L.R. (2009) Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100: 21:5249.
- Lei L.; Bai Y.; Li Y.; Yi L.; Yang Y.; Xia C. (2009) Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321: 252–258.

- Li J.; Li L.S.; Xu L. (2016) Hierarchically macro/mesoporous silica sphere: A high efficient carrier for enzyme immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 231: 147-153.
- Li X.; Li D.; Wang W.; Durrani R.; Yang Y.; Wang Y. (2016) Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin: Characterization and its application in synthesis of partial glycerides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133: 154–160.
- Lopes D.B.; Fraga L.P.; Fleuri L.F.; Macedo G.A. (2011) Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Food Science and Technology*, 31: 3-1.
- Khan N.R.; Jadhav S.V.; Rathod V.K. (2015) Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: optimisation and kinetic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27: 522–529.
- Macedo G.A.; Pastore G.M.; Park Y.K. (1997) Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista Brasileira de Microbiologia*, 28: 90-98.
- Mahadik N.D.; Putambekar U.S.; Bastawde K.B.; Khire J.M.; Gokhale D.V. (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 38:5: 715-721.
- Martins A.B.; Schein M.F.; Friedrich J.L.R.; Fernandez-Lafuente R.; Ayub M.A.Z.; Rodrigues R.C. (2013) Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(5): 1155–1160.
- Marchetti J.M.; Miguel V.U.; Errazu A.F. (2007) Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11: 1300-1311.
- Mounguengui R.W.M.; Brunschwig C.; Barea B.; Villeneuve P.; Blin J. (2013) Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? *Progress in Energy and Combustion Science*, 39: 441-456.

- Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163:103-107.
- Patil K.J.; Chopda M.Z.; Mahajan R.T. (2011) Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4:8: 971-982.
- Rokhina E.V.; Lens P.; Virkutyle J. (2009) Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends Biotechnology*, 27: 298–306.
- Seth S.; Chakravorty D.; Dubey V.K.; Patra S. (2014) An insight into plant lipase research – challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, 95: 13–21.
- Tian X.; Dai L.; Liu M.; Liu D.; Du W.; Wu H. (2016) Lipase-catalyzed methanolysis of microalgae oil for biodiesel production and PUFAs concentration. *Catalysis Communications*, 84: 44–47.
- Toscano L.; Montero G.; Stoytcheva M.; Cervantes L.; Gochev V. (2014) Comparison of the performances of four hydrophilic polymers as supports for lipase immobilisation. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28: 52–60.
- Zhao X.; Bansode S.R.; Ribeiro A.; Abreu A.S.; Oliveira C.; Parpot P.; Gogate P.R.; Rathod V.K.; Cavaco-Paulo A. (2016) Ultrasound enhances lipase-catalyzed synthesis of poly (ethylene glutarate). *Ultrasonic Sonochemistry*, 31: 506–511.

CAPÍTULO 4: Biorremediação de resíduos de óleo de cozinha por lipases obtidas de resíduos de laranja – Modificação por hidrólise e alcoólise e análise de citotoxicidade.

4.1 Introdução

Lipídeos e carboidratos são os principais constituintes de resíduos da indústria de alimentos, responsáveis por elevados danos ao meio ambiente devido à formação de filmes oleosos nas superfícies aquáticas que impedem a difusão de oxigênio; aos entupimentos causados pela emulsificação com matéria orgânica; e metanização de óleos que elevam o efeito estufa (BROWN et al., 2016; KUMAR et al., 2012). Segundo Hocevar et al. (2012) cada litro de resíduo lipídico é capaz de comprometer cerca de 1 milhão de litros de água, principalmente, quando os óleos passam por temperaturas elevadas, já que até óleos considerados saudáveis a temperatura ambiente, podem tornar-se tóxicos quando aquecidos (NWOBI et al., 2006). Assim sendo, o estudo da alteração de óleos após aquecimento e possibilidades de redução de sua toxidez, são essenciais para a indústria de alimentos, pois, referem-se a uma situação frequente no processamento dos mesmos.

Entre os processos capazes de alterar a estrutura dos óleos e aumentar sua toxidez estão os de fritura de alimentos, sendo os compostos resultantes vêm sendo associados às doenças como câncer, Alzheimer e Parkinson (GUILLÉN E URIARTE, 2012). Desta forma, a compreensão da alteração da estrutura dos óleos após aquecimentos, bem como, seu comportamento em modelos biológicos pode indicar soluções que minimizem o efeito negativo do consumo destes alimentos e do impacto ambiental dos resíduos gerados.

Neste contexto, estudos como os conduzidos por Kanmani et al. (2015), Kumar et al. (2012), Mita et al. (2010) e Rigo et al. (2008) têm testado a aplicabilidade do uso de lipases (EC 3.1.1.3 triacilglicerol acilhidrolases) na biorremediação de resíduos lipídicos e citam como vantagens, em relação aos métodos convencionais, a especificidade, o que permite a conversão a subprodutos não tóxicos; maior rendimento; possibilidade de uso em resíduos com alto ou baixo teor de poluentes; operação em condições brandas e, consequente, diminuição de gastos com energia. Nos referidos estudos foi evidenciado que a composição

de ácidos graxos foi alterada por reações catalisadas por lipases, entretanto, não indicaram se essa alteração causou efeitos na toxidez desses resíduos. Assim, ensaios sobre a citotoxicidade dos óleos antes e após a biorremediação complementariam a investigação sobre o papel deste processo na influência na toxidez dos resíduos lipídicos gerados.

Os seres vivos estão expostos a inúmeras substâncias nocivas capazes de causar danos celulares, por isso, a capacidade de neutralizar tais moléculas é essencial ao bom funcionamento metabólico, sendo que o próprio metabolismo desenvolveu mecanismos de identificação e degradação ou transformação em compostos inertes. A biorremediação é a aplicação biotecnológica desses processos que visa neutralizar moléculas alvo; e que podem ser realizados pelo emprego de micro-organismos em processos fermentativos ou pelo uso direto de enzimas na catálise da reação de transformação do elemento tóxico (SIVAPERUMAL et al., 2017; BROWN et al., 2016).

A modificação de óleos por lipases pode ser realizada, entre outras, pela reação de hidrólise, na qual a ligação éster do triglicerídeo é rompida na presença de água, produzindo glicerol e ácidos graxos (PAQUES E MACEDO, 2006). Em condições com baixo conteúdo de água as lipases são também capazes de catalisar reações de transesterificação. Nessa reação ocorre a troca de radicais acil entre compostos e resulta em um glicerídeo diferente do inicial, sendo que a denominação da reação varia de acordo com a substância utilizada, sendo denominada de alcoólise quando o éster é substituído por um álcool (CARVALHO et al., 2003; PEREIRA et al., 2003).

Desta forma, o presente trabalho analisou o efeito da biorremediação de resíduos de óleo de fritura por reações de hidrólise e alcoólise catalisadas por lipases obtidas de resíduos de laranja e comerciais. Foram analisadas as alterações na composição e citotoxidez do óleo e de seu resíduo antes e após o tratamento enzimático.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Obtenção, concentração, determinação e identificação de lipases

Foram utilizadas lipases vegetais obtidas de resíduos de laranjas processadas para suco concentrado, variedade Pera, cultivadas no estado de São Paulo. Foram obtidos extratos a partir de três frações de resíduos, a saber: *frit* (fragmento de casca), casca e bagaço. As amostras foram processadas pelo método utilizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014).

Os extratos brutos foram concentrados por diferentes métodos. Após o processamento inicial, os extratos enzimáticos foram concentrados por precipitação com sulfato de amônio (60% de saturação) seguido por centrifugação, diálise e liofilização; concentração com acetona (acetona: amostra, na proporção de 1:4, v/v, respectivamente) seguido por centrifugação e evaporação; e microfiltração utilizando membrana de 10 KDa Centrifugal filter (Millipore®) no processo de centrifugação.

Antes e após cada etapa, as atividades das lipases de laranja foram mensuradas seguindo o método titulométrico descrito por Macedo et al. (1997) para atividade de hidrólise utilizando como substrato óleo de oliva emulsionado.

As lipases foram identificadas em zimograma utilizando o substrato MUF-butirato (Sigma Aldrich®) realizado seguindo o método descrito por Teo et al. (2003). O preparo das amostras seguiu o método descrito por Lerma-García et al. (2016) modificado. Para isso, as amostras foram ressuspensas em tampão Tris (0,05 M, pH 7,4) contendo CHAPS e inibidor de protease, homogeneizadas em probe e centrifugadas. Para o preparo do gel nativo utilizado no zimograma foram testadas diferentes concentrações de poliacrilamida, variando de 5 a 15%. O zimograma foi realizado em gel nativo de poliacrilamida a 10%, preparado com 4 mL de água destilada; 2,5 mL de tampão tris HCl (0,5 M, pH 8,8); 3,35 mL de acrilamida / bis-acrilamida (30/0,8 %); 5 µL de TEMED; e 50 µL persulfato de amônio. 20 µL de cada amostra foi aplicada em cada poço do gel e a corrida ocorreu a 150 volts. Após a eletroforese, o gel foi acondicionado em recipiente contendo 100 mL tampão tris (50 mM, pH 8,0) com triton X-100 2% e 10 µM metilumbeliferil (MUF)-butirato por 15 min a 37°C. As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta (UV) para verificar a presença de lipase nos extratos.

Os resultados foram representados como média $\pm$ desvio padrão (DP) e analisados pelo teste de Tukey, a fim de comparar todos os pares de grupos utilizando One-Way ANOVA (não paramétrico), com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo e $p < 0,0001$ considerado altamente significativo. A quantificação das bandas foi realizada pelo software Image J 1.15. e a análise estatística pelo software GraphPad Prism 6.

4.2.2 Preparo do resíduo de óleo

O resíduo de óleo foi obtido em condições controladas com o intuito de garantir a reprodutibilidade do experimento seguindo o método descrito por Stacke et al. (2009) com modificações. Foi utilizado óleo de soja de uso culinário convencional, o qual foi submetido a ciclos de aquecimento a 200°C totalizando 35 h de aquecimento. O resíduo de óleo sem tratamento foi analisado para comparação em relação aos tratamentos enzimáticos. O óleo sem aquecimento, o óleo cru, também foi avaliado com e sem tratamentos enzimáticos, com o intuito de garantir que as diferenças encontradas reflitam o tratamento enzimático no resíduo de óleo, evitando falsos positivos devido à reação enzima-óleo normais.

4.2.3 Tratamento do óleo de soja cru e seu resíduo

As lipases de resíduos de laranja foram testadas em duas reações de modificação com dois substratos, o resíduo de óleo de soja e o óleo de soja cru (sem aquecimento). Também foi testada a lipase comercial de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) e a lipase de *Candida antarctica* (Novozymes®) para análise de desempenho e à título de comparação. Os tratamentos foram organizados como descrito na Tabela 4.1. Desta forma, cada tipo de reação apresentou 10 diferentes tratamentos.

Tabela 4.1 Tratamentos para o estudo de biorremediação utilizados nos ensaios titulométricos, na identificação de compostos por cromatografia gasosa e cultivo celular.

Tratamento	Extrato enzimático	Substrato	Reação
1	Casca, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Alcoólise
2	Casca, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Alcoólise
3	Frit, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Alcoólise
4	Frit, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Alcoólise
5	Bagaço, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Alcoólise
6	Bagaço, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Alcoólise
7	Lipase Sigma	Óleo cru	Alcoólise
8	Lipase Sigma	Resíduo	Alcoólise
9	Lipase Novozyme	Óleo cru	Alcoólise
10	Lipase Novozyme	Resíduo	Alcoólise
11	Casca, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Hidrólise
12	Casca, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Hidrólise
13	Frit, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Hidrólise
14	Frit, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Hidrólise
15	Bagaço, variedade Pera, [60%]	Óleo cru	Hidrólise
16	Bagaço, variedade Pera, [60%]	Resíduo	Hidrólise
17	Lipase Sigma	Óleo cru	Hidrólise
18	Lipase Sigma	Resíduo	Hidrólise
19	Lipase Novozyme	Óleo cru	Hidrólise
20	Lipase Novozyme	Resíduo	Hidrólise

4.2.4 Hidrólise

Os extratos de resíduos de laranja variedade Pera e lipases comerciais de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) e de *Candida antarctica* (Novozymes®) foram utilizadas na hidrólise de óleos de soja cru e resíduo de óleo de soja pelo método utilizado por Fleuri et al. (2014), com conteúdo de água de 30% e de 5% de extrato de lipase em relação ao volume do meio reacional. Foram preparados brancos de reagente do óleo cru e do resíduo. A porcentagem de hidrólise foi calculada considerando o volume de NaOH utilizado na titulação (mL), multiplicado pela concentração e massa molar da base. O valor obtido foi então dividido pela massa do óleo (g) e multiplicado pelo índice de saponificação do óleo; e o resultado multiplicado por 100 para que fosse expresso em porcentagem.

As análises foram realizadas em duplicata e os dados de hidrólise analisados por titulação de acidez foram comparados pela análise de variância (ANOVA) e submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade utilizando o software Assistat 7.7 beta. Os ésteres de ácidos graxos formados foram analisados por cromatografia gasosa como descrito a seguir.

4.2.5 Alcoólise

Os extratos de resíduos de laranja variedade Pera e as lipases comerciais de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) e de *Candida antarctica* (Novozymes®) foram utilizadas na alcoólise dos óleos de soja cru e resíduo de óleo de soja pelo método descrito por Fleuri et al. (2014), utilizando etanol na razão molar com óleo de 1:1 (m/m) e 5 % de extrato de lipase em relação ao volume do meio reacional. O sistema foi incubado por 72 h. Foram preparados brancos de reagente do óleo cru e do resíduo. As análises foram realizadas em duplicata e a identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas como descrito a seguir.

4.2.6 Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por cromatografia gasosa

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) com o intuito de verificar se houve alteração no perfil de ácidos graxos nos diferentes tratamentos. Dessa forma, é possível verificar se houve diferença entre o óleo cru e aquecido (resíduo); se os processos de biorremediação do óleo realmente modificaram os óleos, e finalmente, qual a reação e extrato enzimático que mais alterou os resíduos de óleo.

Para isso, as amostras provenientes da reação de hidrólise foram preparadas utilizando o método descrito por O'Fallon et al. (2007) com modificações. A reação foi conduzida em tubo falcon de 25 mL, no qual foram adicionados 100 µL de amostra e 1,5 mL de NaOH 0,5 M (diluído em metanol) e a mistura submetida a 100°C por 5 min. O tubo foi resfriado e foram adicionados 4 mL de esterificante BF₃-MeOH 14% - Trifluoreto de boro em metanol (Sigma-Aldrich®), e a mistura foi novamente submetida 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 NaCl, sendo que a mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 min e após a separação de fases o sobrenadante foi encaminhado para análise em cromatografia gasosa de alta eficiência.

A caracterização do perfil de ésteres de ácidos graxos nas amostras foi realizada em equipamento Shimadzu GC-2010 por: CG/DIC Shimadzu (GC-2010) e CG/EM Shimadzu (QP-500), dotados com coluna capilar de sílica fundida OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc. ; 30.0m x 0.25mm x 0.25 μ m). O programa de temperatura iniciou em 180°C por 10 min, com rampa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ até temperatura de 280°C, permanecendo por 10 min. A temperatura do injetor foi de 230°C, do detector de 280°C, hélio como gás de arraste, vazão do gás de arraste 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de amostra de 1 μ L, split 1/20 (Ebrahimi et al., 2012).

A quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada no CG/DIC pelo método de normalização de área. A identificação realizada pela comparação dos tempos de retenção das substâncias com os de padrões comerciais de ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos, Supelco 37 FAME (Sigma-Aldrich®) no GC/DIC e análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist62.lib e Wiley139.lib) e NIST WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Os resultados obtidos na análise do perfil de ésteres de ácidos graxos foram comparados em análise multivariada de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (Cluster) foi realizada utilizando o software XLSTAT – 2017.3 version (Addinsoft, France).

4.2.7 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido seguindo o método descrito na ISO 10993-12:2009. As células de fibroblastos (NIH-3T3) foram incubadas por 24 h a 37°C. Cada tratamento foi testado em três diferentes dosagens, com cinco repetições cada. Após o período de incubação as células foram contadas, os resultados foram comparados entre os diferentes tratamentos com o intuito de verificar se a inibição do desenvolvimento celular foi menor nos

tratamentos com resíduos de óleo após a biorremediação. O conjunto de reação e extrato enzimático mais adequado para a diminuição de citotoxicidade dos resíduos de óleo foi considerado o que apresentou maior atividade celular (% MTT) após o período de incubação. Para os ensaios com lipases de *frit* e casca da laranja e lipase Sigma, a porcentagem de redução de MTT do controle (CTRL) foi considerada como 100%, assim, os demais tratamentos foram comparados a esta, sendo expressas em % de redução de MTT.

4.2.8 Adequação do meio reacional

As amostras provenientes dos experimentos de biorremediação foram constituídas por lipídeos e como o meio de cultivo celular é aquoso o contato entre esses foi apenas superficial, o que poderia comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios de cultivo celular. Por isso, foram testadas diferentes substâncias com o intuito de diminuir a tensão superficial do meio de cultivo: Tween 20 (1% em relação ao volume do meio de cultivo), Triton-X (1% em relação ao volume do meio de cultivo) e goma arábica (3% em relação ao volume do meio de cultivo), nos mesmos parâmetros utilizados no ensaio de citotoxicidade descrito anteriormente. Foi selecionada a substância que promoveu maior contato entre meio reacional (amostras de óleo) e menor citotoxicidez.

4.2.9 Planejamento dos blocos experimentais

Os experimentos foram conduzidos em placas de cultivo de tecidos contendo 96 poços (8x12) utilizando os 60 poços centrais com inclusão de bordadura. Cada placa foi dividida em 10 colunas contendo 6 poços, sendo que cada tratamento foi alocado em uma coluna contendo 6 repetições. O volume de meio reacional total de cada poço foi fixado em 250 µL.

Em cada placa foi testado apenas um tratamento composto por extrato enzimático x reação, ou seja, foram utilizadas 8 placas, a saber: Placa 1 – Lipase de *frit* / Alcoólise; Placa 2 – Lipase de casca / Alcoólise; Placa 3 – Lipase de bagaço / Alcoólise; Placa 4 - Lipase comercial Sigma / Alcoólise; Placa 5 – Lipase de *frit* / Hidrólise; Placa 6 – Lipase de casca / Hidrólise; Placa 7 – Lipase de bagaço / Hidrólise; Placa 8 - Lipase comercial Sigma / Hidrólise.

Dentro de cada placa foram testados os dois substratos, óleo cru e resíduo de óleo, cada um em 3 diferentes concentrações. Foram também incluídos 3 controles em cada placa; portanto, cada placa foi constituída por 9 tratamentos, a saber:

Controle 1 (CTRL): Branco reagente, constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro e 150 μ L de meio reacional sem soro, para garantia da viabilidade do soro;

Controle 2 (BTC): Óleo cru, constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro, 25 μ L de goma arábica (10%), 10 μ L de óleo cru e 110 μ L de meio reacional sem soro, para comparação entre o óleo cru com e sem tratamento enzimático e comparação entre óleo cru e resíduo de óleo;

Controle 3 (BTR): Resíduo de óleo, constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro, 25 μ L de goma arábica (10%), 10 μ L de resíduo de óleo e 110 μ L de meio reacional sem soro, para comparação entre o resíduo de óleo com e sem tratamento enzimático e comparação entre óleo cru e resíduo de óleo;

Extrato enzimático X, reação X em óleo cru – volume 1 (TC1): constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro, 25 μ L de goma arábica (10%), 5 μ L de extrato enzimático X, reação X em óleo cru e 120 μ L de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com óleo cru não tratado enzimaticamente;

Extrato enzimático X, reação X em óleo cru – volume 2 (TC2): constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro, 25 μ L de goma arábica (10%), 10 μ L de extrato enzimático X, reação X (óleo cru) e 115 μ L de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com óleo cru não tratado enzimaticamente;

Extrato enzimático X, reação X em óleo cru – volume 3 (TC3): constituído por 100 μ L de meio de cultivo de tecido com soro, 25 μ L de goma arábica (10%), 15 μ L de extrato enzimático X, reação X (óleo cru) e 120 μ L de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com óleo cru não tratado enzimaticamente;

Extrato enzimático X, reação X em resíduo de óleo – volume 1 (TR1): constituído por 100 µL de meio de cultivo de tecido com soro, 25 µL de goma arábica (10%), 5 µL de extrato enzimático X, reação X (resíduo de óleo) e 120 µL de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com resíduo de óleo não tratado enzimaticamente;

Extrato enzimático X, reação X em resíduo de óleo – volume 2 (TR2): constituído por 100 µL de meio de cultivo de tecido com soro, 25 µL de goma arábica (10%), 10 µL de extrato enzimático X, reação X (resíduo de óleo) e 115 µL de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com resíduo de óleo não tratado enzimaticamente;

Extrato enzimático X, reação X em resíduo de óleo – volume 3 (TR3): constituído por 100µL de meio de cultivo de tecido com soro, 25 µL de goma arábica (10%), 15 µL de extrato enzimático X, reação X (resíduo de óleo) e 120 µL de meio reacional sem soro, para comparação entre as diferentes concentrações, diferentes substratos e com resíduo de óleo não tratado enzimaticamente.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Obtenção, concentração, determinação e identificação de lipase

O estudo sobre diferentes métodos para a concentração de lipases presentes nos extratos vegetais demonstrou que a concentração por precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise e liofilização foi a que demonstrou as maiores atividades em U/g, chegando a 50,86 U/g para o extrato de frit. Já a concentração com acetona e por microfiltração reduziram drasticamente a atividade das lipases contidas nos extratos (Tabela 4.2).

As baixas atividades de lipase obtidas com a concentração por acetona corroboram outros estudos de lipases vegetais, como os descritos por Seth et al. (2014) em que as lipases vegetais, em geral, não suportam elevadas concentrações de solventes orgânicos. Já as baixas atividades de lipase obtidas com a concentração por microfiltração podem ser explicadas pela porosidade da membrana que pode não ter sido adequada às lipases, uma vez

que essas enzimas são novas e não havia informações sobre seu tamanho, sendo a seleção realizada de acordo com o indicado para enzimas diversas. Dessa forma, o método selecionado para concentração dos extratos de lipases utilizados neste estudo foi a precipitação com sulfato de amônio seguido diálise e liofilização. Assim, todos os demais experimentos foram conduzidos utilizando os extratos concentrados com o sal a 60% de saturação.

Tabela 4.2 Concentração de extratos de lipase obtidos de resíduos de laranja

Amostra	Método	U de lipase/g de extrato	PT mg/g	U/mg de PT
<i>Frit</i>	Extrato bruto	6,31±0,17	5,87	1,075±0,02
<i>Frit</i>	Precipitação/liofilização	50,86±1,45	54,31	0,936±0,02
<i>Frit</i>	Acetona 80%	4,97±0,29	38,36	0,129±0,01
<i>Frit</i>	Microfiltração	16,91±0,57	48,67	0,347±0,01
<i>Casca</i>	Extrato bruto	5,57±0,35	5,93	0,940±0,05
<i>Casca</i>	Precipitação/liofilização	19,42±0,30	27,48	0,706±0,01
<i>Casca</i>	Acetona 80%	3,52±0,35	31,57	0,111±0,01
<i>Casca</i>	Microfiltração	0	36,46	0
<i>Bagaço</i>	Extrato bruto	4,23±0,35	3,76	1,125±0,05
<i>Bagaço</i>	Precipitação/liofilização	29,29±0,59	55,75	0,525±0,01
<i>Bagaço</i>	Acetona 80%	2,19±0,15	28,95	0,075±0,01
<i>Bagaço</i>	Microfiltração	0		0

*Os resultados foram apresentados como médias ± desvio padrão **PT = proteínas totais

Para o preparo do zimograma das lipases foram realizados testes com geis de poliacrilamida em diferentes concentrações e a de 10% mostrou-se a mais eficaz para a separação das lipases contidas nessas amostras, apresentando melhor separação de bandas.

No zimograma apresentado na Figura 4.1 podem ser visualizadas as bandas correspondentes às lipases contidas nos extratos obtidos de resíduos de laranja. A fração casca apresentou 5 diferentes bandas com pesos variando de 10 a 250 kDa; a fração bagaço apresentou apenas uma banda de 10 kDa; e a fração *frit* apresentou 6 bandas de pesos variando de 10 a 250 kDa. Os extratos das frações *frit* e casca apresentaram perfil mais semelhante e o bagaço mais distinto, o que pode ser explicado morfológicamente, pois o *frit* e a casca correspondem ao epicarpo do fruto, enquanto, o bagaço corresponde ao mesocarpo (Okino-Delgado e Fleuri, 2015). Já a presença de diferentes bandas nos extratos de *frit* e

casca corroboram o verificado na caracterização bioquímica realizada por Okino-Delgado e Fleuri (2014) sobre a presença de isoformas de lipases nesses extratos. Em comparação com outras fontes vegetais de lipases, as de laranja diferem no peso e variedade de isoformas, já que, na maioria das pesquisas já descritas as lipases vegetais possuem de 36 a 40 kDa (lipases obtidas de arroz, pinhão manso e *Arabidopsis* ssp.) a até 60 kDa (lipases obtidas de mamona e nabo) (SETH et al., 2014; XIAOXING et al., 2006; EL-KOUHEN et al., 2005; EASTMONT, 2004). Deve-se ainda considerar que as lipases detectadas no zimograma são aquelas de maior afinidade por ácidos graxos de cadeia curta, pois foi utilizado o MUF-butirato. Dessa forma, há a possibilidade de existirem outras lipases com afinidade por outros ácidos graxos, como os de cadeia média e longa. Dessa forma, a presença de lipases com afinidade por substratos diferentes poderia ser investigada em zimogramas realizados seguindo metodologias como a descrita por Duarte et al. (2016), na qual os zimogramas de lipase foram realizados utilizando substratos de diferentes tamanhos de cadeia em reações de hidrólise e síntese.

Além disso, no preparo do zimograma, foram utilizadas amostras concentradas por precipitação com sulfato de amônio a 60%, centrifugação e por liofilização, assim, foi evidenciado que as lipases contidas nesses extratos mantêm atividade catalítica após esses processos, reafirmando que esses métodos de concentração proteica são adequados para a concentração dessas enzimas.

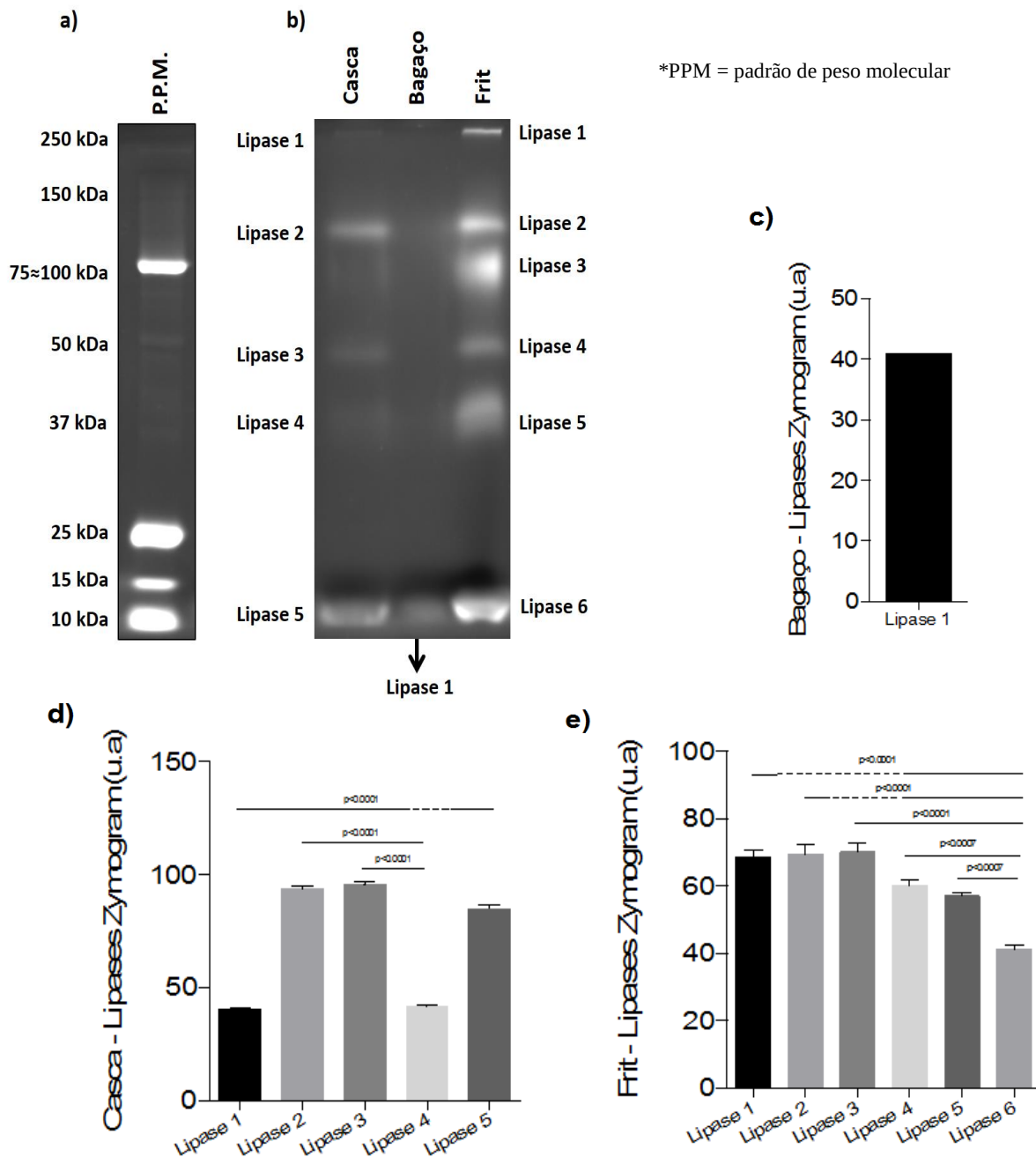
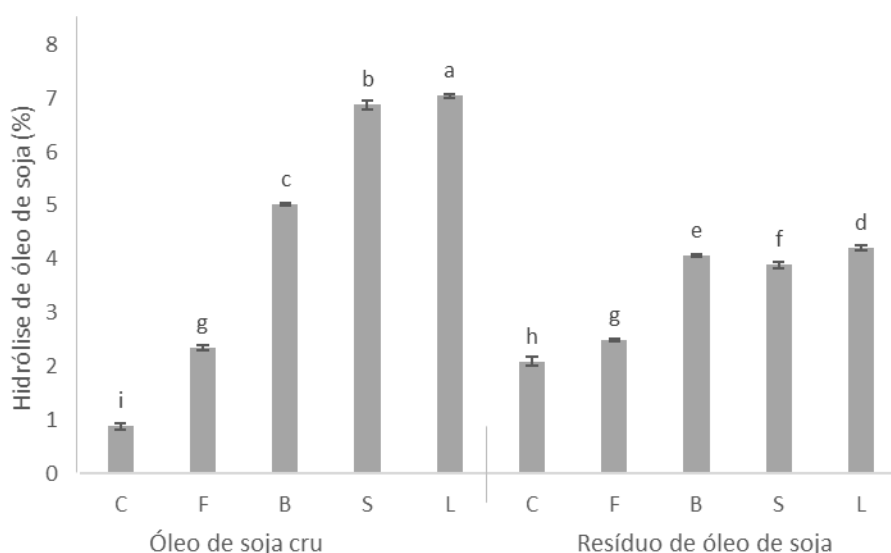


Figura 4.1 Zimograma de lipases contidas nos extratos obtidos de resíduos de laranja; a) zimograma do padrão de peso molecular; b) zimograma das lipases de casca, bagaço e frit de laranja; c), d) e e) quantificação da intensidade das bandas das lipases de bagaço, casca e frit, respectivamente

4.3.2 Tratamento do óleo de soja cru e seu resíduo

As lipases de resíduos de laranja e lipase comercial da Sigma apresentaram maior liberação de ácidos graxos quando comparados com as amostras referências: branco de óleo de soja cru e branco de resíduo de óleo de soja (Figura 4.2). Além disso, verificou-se que houve diferença na liberação de ácidos graxos entre os experimentos com óleo de soja cru e resíduo de óleo de soja para os tratamentos com lipase de bagaço, casca e comerciais. Esses resultados indicam que os extratos lipolíticos são capazes de modificar o óleo de soja, tanto quando este está cru como após o aquecimento prolongado. Assim, considerou-se que as lipases de laranja possuem potencial para modificação de óleos vegetais para biorremediação e que os compostos decorrentes do aquecimento do óleo não influenciaram no poder de catálise das lipases vegetais.



*Os valores seguidos por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott e Knott ($p \leq 0,05$)

Figura 4.2 Hidrólise de óleo de soja catalisado por lipases de resíduos de laranja e comercial sigma (extratos lipolíticos: F - frit; C - casca; B - bagaço; S – sigma; L - Lipozyme), as combinações seguem a codificação das letras individualizadas.

4.3.3 Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por CG

As análises de perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa demonstraram que todos os extratos de lipases foram capazes de catalisar a reação de alcoólise do óleo de soja

cru e de seu resíduo utilizando o etanol como solvente, pois, verificou-se a formação de ésteres de ácidos graxos em todas as amostras tratadas com lipases.

A análise de Componentes Principais (PCA) aplicada à composição química dos ésteres etílicos de ácidos graxos expressou 99,87% da variância nas duas primeiras componentes principais, sendo a PCA1 (F1) responsável em descrever 78,10% e a PCA2 (F2) 21,78% da variância total. As variáveis fornecidas pela PCA permitiram separar as amostras em três grupos estabelecidos a partir dos ésteres de ácidos graxos oleico (C18:1) (grupo A); ésteres dos ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e elaídico (C18:1n9t) (grupo B), e um grupo (C) que não apresentou correlação com nenhum dos ésteres de ácidos graxos identificados (Figura 4.3).

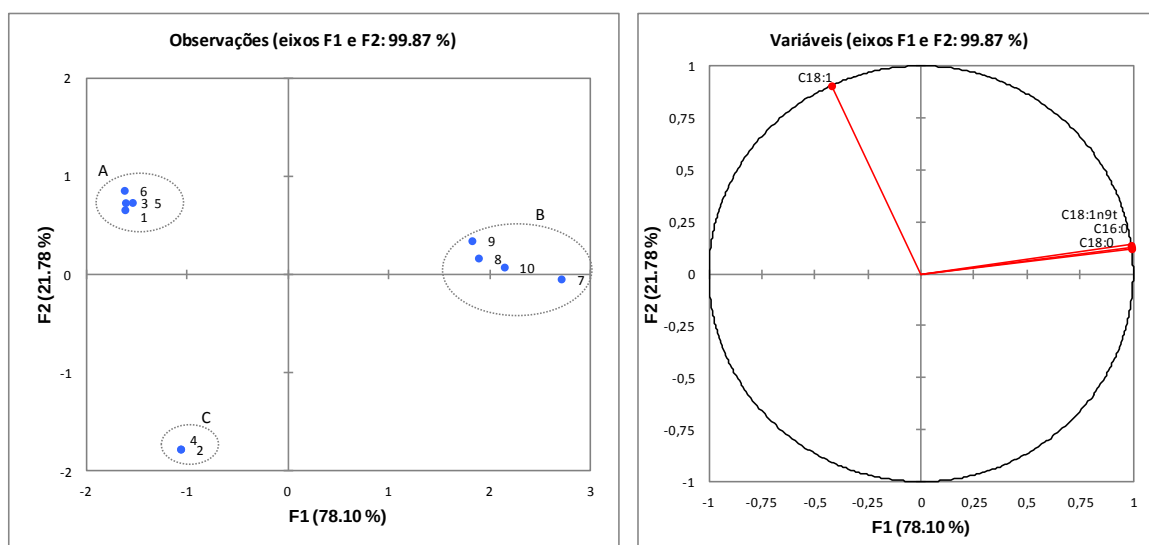


Figura 4.3 PCA aplicada à composição química (ácidos graxos) das amostras da reação de alcoólise. Onde 1 = tratamento 1/Bagaço/Soja cru; 2 = Tratamento 2/Bagaço/Soja resíduo; 3 = tratamento 3/Casca/Soja cru; 4 = Tratamento 4/Casca/Soja resíduo; 5 = tratamento 5/Frit/Soja cru; 6 = tratamento 6/Frit/Soja resíduo; 7 = tratamento 7/Lipozyme/Soja cru; 8 = tratamento 8/Lipozyme/Soja resíduo; 9 = tratamento 9/Sigma/Soja cru; e, 10 = tratamento 10/Sigma/Soja resíduo.

Resultados semelhantes foram obtidos pela análise de agrupamento hierárquico (Cluster). O dendograma (Figura 4.4) construído pela análise de Cluster da matriz de dissimilaridade (coeficiente de correlação de Pearson) mostrou três clusters principais (Cluster 1, 2 e 3). De acordo com a Figura 4.4, o Cluster 1, representado pelas amostras 1, 3,

5 e 6 (tratamento 1/Bagaço/Soja cru, tratamento 3/Casca/Soja cru, tratamento 5/Frit/Soja cru e tratamento 6/Frit/Soja resíduo, respectivamente), foi caracterizado pela maior proporção relativa do éster de ácido oleico (C18:1) (Figura 4.5, a). O Cluster 2, representado pelas amostras 2 (Tratamento 2/Bagaço/Soja resíduo) e 4 (Tratamento 4/Casca/Soja resíduo), não apresentaram ésteres de ácidos graxos em sua composição química (Figura 4.5, b). O Cluster 3, representado pelas amostras 7, 8, 9 e 10 (tratamento 7/Lipozyme/Soja cru; tratamento 8/Lipozyme/Soja resíduo; tratamento 9/Sigma/Soja cru; e, tratamento 10/Sigma/Soja resíduo, respectivamente), destaca-se pela maior produção dos ésteres etílicos de ácidos palmítico (C16:0), esteárico(C18:0) e elaídico (C18:1n9t) (Figura 4.5, c).

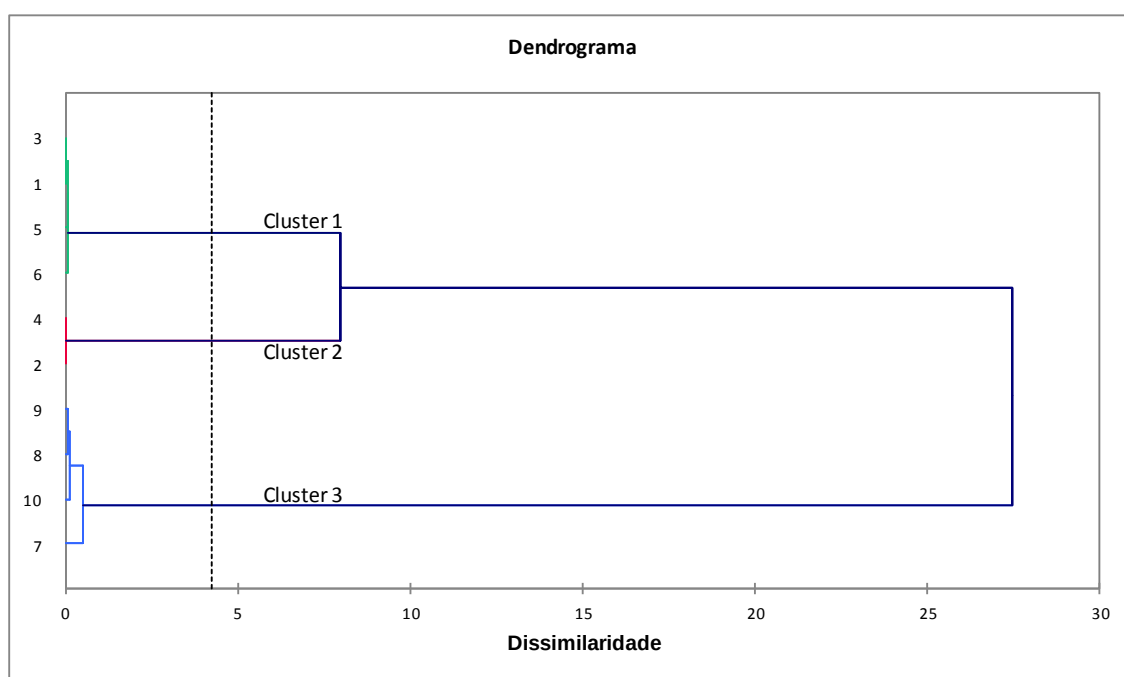


Figura 4.4 Dendrograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster) das amostras de alcoólise catalisada por lipases. Onde 1 = tratamento 1/Bagaço/Soja cru; 2 = Tratamento 2/Bagaço/Soja resíduo; 3 = tratamento 3/Casca/Soja cru; 4 = Tratamento 4/Casca/Soja resíduo; 5 = tratamento 5/Frit/Soja cru; 6 = tratamento 6/Frit/Soja resíduo; 7 = tratamento 7/Lipozyme/Soja cru; 8 = tratamento 8/Lipozyme/Soja resíduo; 9 = tratamento 9/Sigma/Soja cru; e, 10 = tratamento 10/Sigma/Soja resíduo

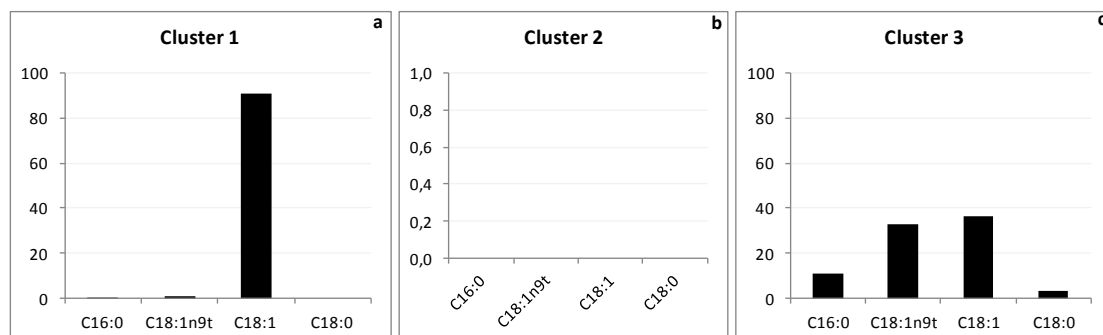


Figura 4.5 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 3 das amostras de alcoólise catalisada por lipases.

Em relação aos resultados obtidos na reação de hidrólise, verifica-se que todos os extratos de lipase foram capazes de catalisar a reação de hidrólise de óleo de soja cru e seu resíduo, pois, verificou-se a liberação de ácidos graxos em todas as amostras tratadas com enzimas. A PCA aplicada à composição química dos ésteres metílicos expressou 81,21% da variância nas duas primeiras componentes principais, sendo a PCA1 (F1) responsável em descrever 56,27% e a PCA2 (F2) 24,94% da variância total. As variáveis fornecidas pela PCA permitiram separar as amostras em três grupos distintos, sendo grupo A (amostra 10) estabelecido pelos ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), grupo B (amostra 9) pelo ácido cis-10-heptadecanóico (C17:1) e o grupo C (amostras: 1,2,3,4,5,6,7,8) pelos demais ácidos (Figura 4.6).

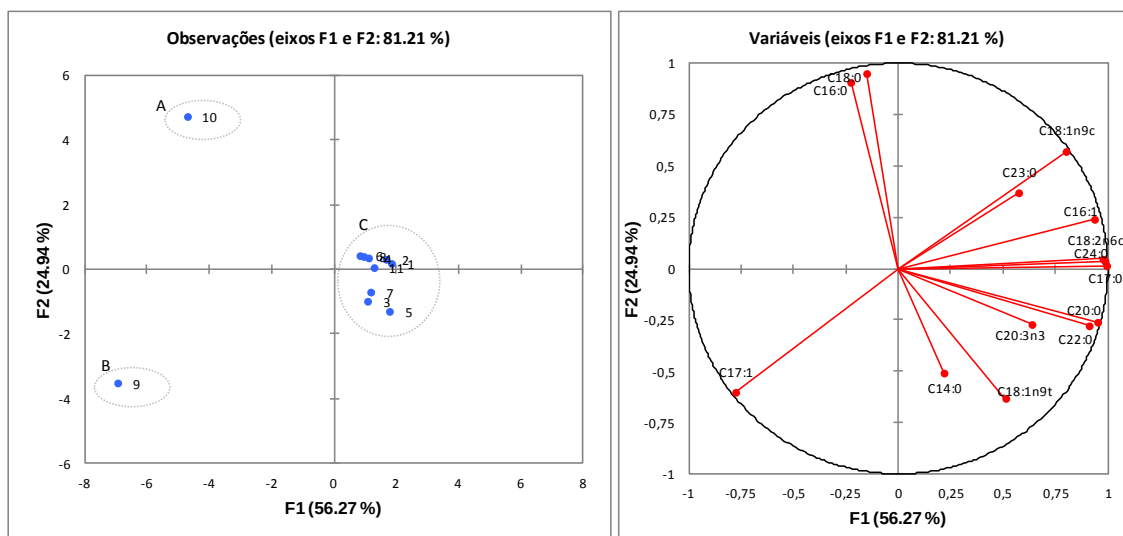


Figura 4.6 PCA aplicada à composição química (ácidos graxos) das amostras da reação de hidrólise catalisada por lipases. Onde 1 = tratamento 1/Químico/Soja cru; 2 = tratamento 2/Bagaço/Soja cru; 3 = Tratamento 3/Bagaço/Soja resíduo; 4 = tratamento 4/Casca/Soja cru; 5 = Tratamento 5/Casca/Soja resíduo; 6 = tratamento 6/Frit/Soja cru; 7 = tratamento 7/Frit/Soja resíduo; 8 = tratamento 8/Lipozyme/Soja cru; 9 = tratamento 9/Lipozyme/Soja resíduo; 10 = tratamento 10/Sigma/Soja cru; e, 11 = tratamento 11/Sigma/Soja resíduo.

A análise de agrupamento hierárquico (Cluster) produziu cinco agrupamentos principais (Figura 4.8), sendo que o terceiro e quarto (Cluster 3 e 4) apresentaram uma maior dissimilaridade (diferença) em relação aos demais (Clusters 1, 2 e 5). Essa diferença ocorreu devido ao Cluster 3, representado pela amostra 9 (tratamento 9/Lipozyme/Soja resíduo) apresentar maior proporção relativa (4,23%) do ácido cis-10-heptadecanóico (C17:1) (Figura 4.8, c), quando comparado com as demais amostras (proporção relativa variando de 0 a 0,09%); enquanto o Cluster 4, representado pela amostra 10 (tratamento 10/Sigma/Soja cru) apresentou maior proporção (20,93%) do ácido palmítico (C16:0) (Figura 4.8, d). Os demais Clusters (1, 2 e 5) representados pelas demais amostras (1 a 8 e 11), caracterizam-se por apresentarem composições químicas similares (Figuras 4.7 e 4.8, a, b e e).

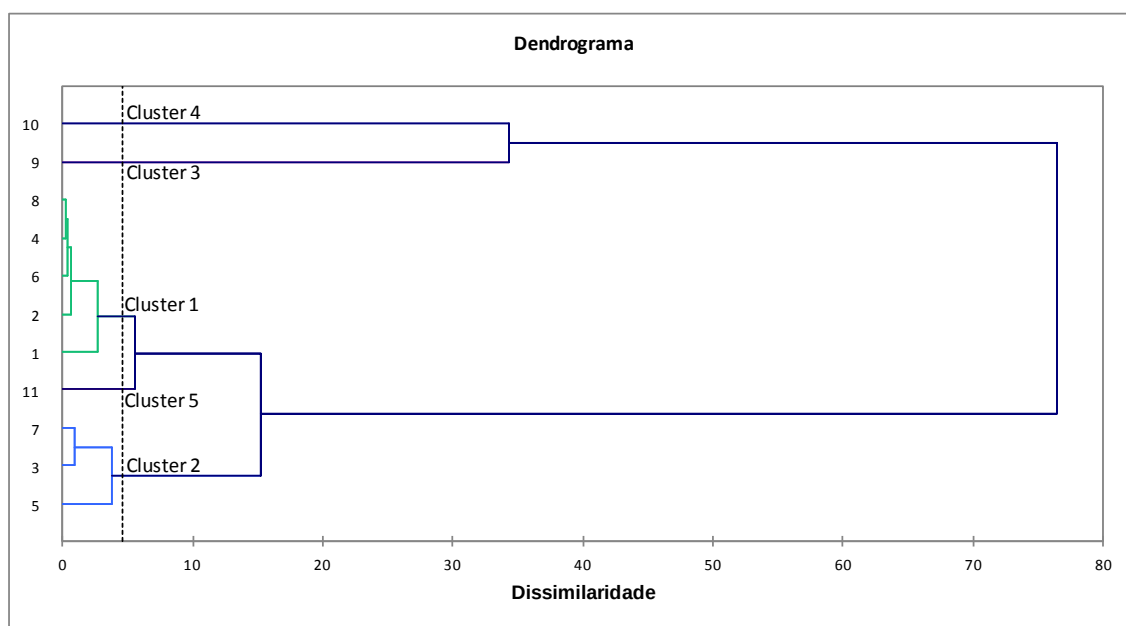


Figura 4.7 Dendrograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster) das amostras da reação de hidrólise catalisada por lipases. Onde 1 = tratamento 1/Químico/Soja cru; 2 = tratamento 2/Bagaço/Soja cru; 3 = Tratamento 3/Bagaço/Soja resíduo; 4 = tratamento 4/Casca/Soja cru; 5 = Tratamento 5/Casca/Soja resíduo; 6 = tratamento 6/Frit/Soja cru; 7 = tratamento 7/Frit/Soja resíduo; 8 = tratamento 8/Lipozyme/Soja cru; 9 = tratamento 9/Lipozyme/Soja resíduo; 10 = tratamento 10/Sigma/Soja cru; e, 11 = tratamento 11/Sigma/Soja resíduo.

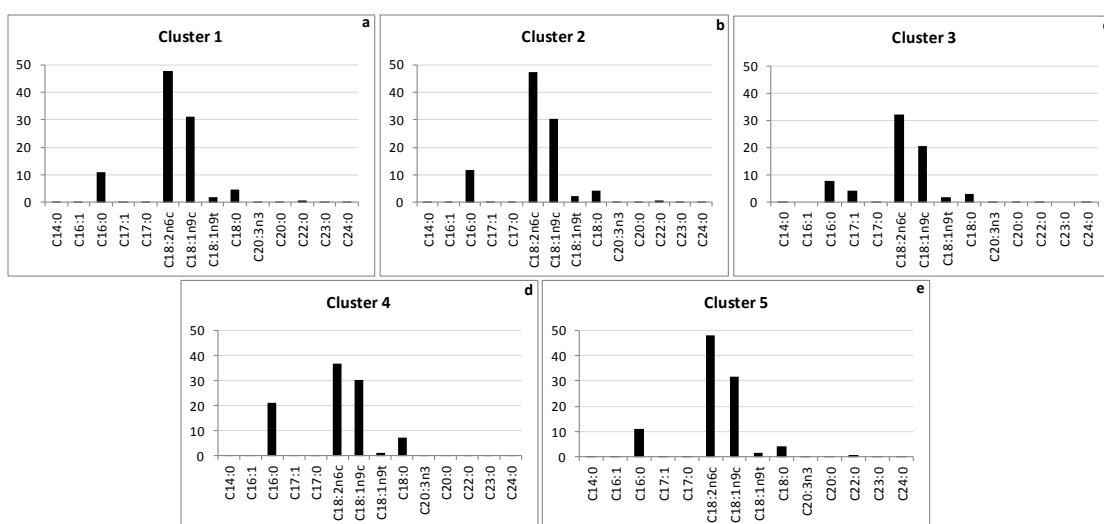


Figura 4.8 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 5, das amostras de hidrólise catalisada por lipases.

Conclui-se que as lipases comerciais e *home-made* obtidas de resíduos de laranja testadas podem ser utilizadas para a modificação do óleo de soja cru e de seu resíduo pelas reações de hidrólise e alcoólise.

4.3.4 Citotoxicidade

Os resíduos lipídicos dispersos no meio ambiente entram em contato com os seres vivos primeiramente pela epiderme, dessa forma, os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos *in vitro* utilizando células de fibroblastos com o intuito de simular o efeito das amostras na irritação dérmica, além de ser o tipo celular mais utilizado para analisar a interação e efeitos tóxicos da derme (BASON et al., 1991). Ensaios com fibroblastos têm sido úteis e confiáveis para analisar a irritação de pele por inúmeros agentes, como o descrito por Lee et al. (2000) que analisaram surfactantes na irritação dérmica, indicando que os ensaios *in vitro* foram capazes de reproduzir os resultados *in vivo*.

Os testes para adequação do meio de cultivo foram realizados com o intuito de aumentar o contato entre o meio de cultivo celular e as amostras devido à redução na tensão superficial do conteúdo aquoso. Os três reagentes tornaram o meio de cultivo visualmente mais homogêneo, aumentando, assim, o contato entre amostra-meio. Entretanto, os três reagentes apresentaram efeito citotóxico, sendo que os cultivos celulares com adição de Tween 20 e Triton-X apresentaram viabilidade celular cerca de 30% menor em comparação com o tratamento com goma arábica. Por isso, a goma arábica foi a selecionada para utilização, pois apresentou menor efeito citotóxico quando comparada aos outros reagentes testados.

Foram realizados testes com diferentes concentrações da goma arábica com o intuito de identificar a concentração com menor efeito citotóxico, mas que ainda possibilitasse o efeito de aumento de homogeneidade do meio reacional. Foi verificado que a concentração que melhor atendeu aos requisitos foi de 1% de goma em relação ao volume do meio de cultivo. Dessa forma, em todos os ensaios de citotoxicidade foi utilizada a goma arábica nessa concentração.

A Figura 4.9 apresenta os resultados obtidos para avaliação da citotoxicidade do óleo e resíduo de óleo de soja, modificados pelas reações de alcoólise e hidrólise. O controle de branco reagente CTRL apresentou maior atividade de MTT, indicando maior porcentagem de células viáveis, validando assim os ensaios. A porcentagem de viabilidade celular do controle branco de óleo de soja (BTC) foi maior que o do controle branco de resíduos de óleo de soja (BTR), por isso, conclui-se que o resíduo de óleo de soja é mais citotóxico do que o óleo de soja cru.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade por alcoólise, verificou-se que os tratamentos de óleo de soja com lipase de bagaço (TC1, TC2 e TC3) apresentaram maior viabilidade celular em relação ao BTC, assim como os tratamentos de resíduo de óleo de soja com lipase de bagaço (TR1, TR2 e TR3) apresentaram maior viabilidade celular comparando-os ao BTR (Figura 4.9, A). Os tratamentos de óleo de soja e seu resíduo com lipase de casca não apresentaram diferenças na viabilidade celular em comparação com os brancos (Figura 4.9, B). Já os tratamentos de óleo de soja com lipase de *frit* apresentaram maior viabilidade celular em relação ao BTC e os tratamentos de resíduos de óleo de soja com lipase de *frit* apresentaram maior viabilidade celular que BTR, porém as diferenças não foram significativas (Figura 4.9, C). Os tratamentos de óleo de soja e seu resíduo com lipases comerciais (Sigma e Novozymes) apresentaram menor viabilidade celular em relação ao BTC e BTR (Figura 4.9, D e E), indicando que a modificação por alcoólise catalisada por lipases de bagaço e *frit* diminuíram a citotoxicidade do óleo de soja e seu resíduo, enquanto, a modificação por alcoólise catalisada por lipases comerciais aumentou a citotoxicidade do óleo de soja e seu resíduo.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade por hidrólise, verificou-se que os tratamentos de óleo de soja com lipase de bagaço (TC2 e TC3) apresentaram maior viabilidade celular em relação ao BTC, assim como os tratamentos de resíduo de óleo de soja com lipase de bagaço (TR1, TR2 e TR3) apresentaram maior viabilidade celular em comparação ao BTR (Figura 4.9, F). Os tratamentos de óleo de soja e seu resíduo com lipase de casca não apresentaram diferenças na viabilidade celular em comparação com os brancos (Figura 4.9, G). Já o tratamento de óleo de soja com lipase de *frit* (TC1) apresentou maior viabilidade celular em relação ao BTC e os tratamentos de resíduos de óleo de soja com lipase de *frit* não

apresentaram diferenças na viabilidade celular em comparação com BTR (Figura 4.9, H). Os tratamentos de óleo de soja e seu resíduo com lipases comerciais (Sigma e Novozymes) apresentaram menor viabilidade celular em relação ao BTC e BTR (Figura 4.9, I e J), indicando que a modificação por hidrólise catalisada por lipases de bagaço diminuiu a citotoxicidade do óleo de soja e seu resíduo, enquanto, a modificação por hidrólise catalisada por lipases comerciais aumentou a citotoxicidade do óleo de soja e seu resíduo.

Dessa forma, avalia-se que a modificação por alcoólise catalisada por lipases de bagaço e *frit* diminuíram a citotoxicidade do resíduo de óleo de soja. Já a modificação por alcoólise e hidrólise catalisada por lipases comerciais não se mostrou eficaz para a biorremediação de resíduos de óleo de soja; pois a porcentagem de células viáveis do resíduo tratado foi igual ou menor que a do resíduo não tratado.

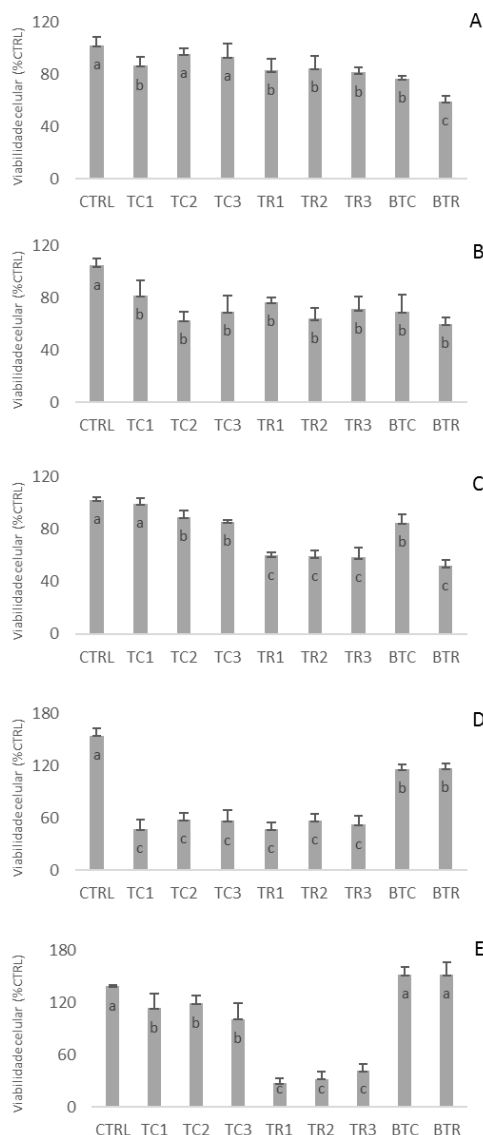
Conclui-se, portanto, que as lipases de bagaço e *frit* mostraram-se eficazes para a biorremediação de resíduos de óleo de soja pela alcoólise (Figura 4.9, A e C). Os resultados obtidos nessa reação corroboram com os obtidos por Gioda et al. (2016), em que foram analisadas amostras de óleo de soja modificado por alcoólise com etanol capazes de aumentar a proliferação celular de BEAS-2B (células epiteliais de brônquios humanos). Porém, para que a diminuição do efeito tóxico de resíduos de óleo de soja pela modificação catalisada por lipases seja confirmada, são necessários testes *in vitro* com a célula estudada e outras linhagens celulares, e *in vivo*, dada a diversidade celular presente na derme em um mesmo indivíduo e em entre indivíduos.

Além disso, os resultados obtidos no estudo de citotoxicidade apresentaram coerência em relação aos dados da análise do perfil de ésteres de ácidos graxos formados. Pois, as amostras tratadas com lipases de resíduos de laranja que apresentaram diminuição da citotoxicidade (alcoólise catalisada por lipases de bagaço e *frit*, Figura 4.9, A e C) foram classificadas no mesmo grupo estatístico de acordo com a PCA (grupo A com maior concentração de ácido oleico, Figura 4.3). Já as amostras tratadas com as lipases comerciais apresentaram aumento da citotoxicidade (alcoólise catalisada por lipases Sigma e Lipozyme, Figura 4.9, D e E) foram classificadas no mesmo grupo estatístico de acordo com a PCA (grupo B com maior concentração de ácido palmítico, esteárico e elaídico, Figura 4.3).

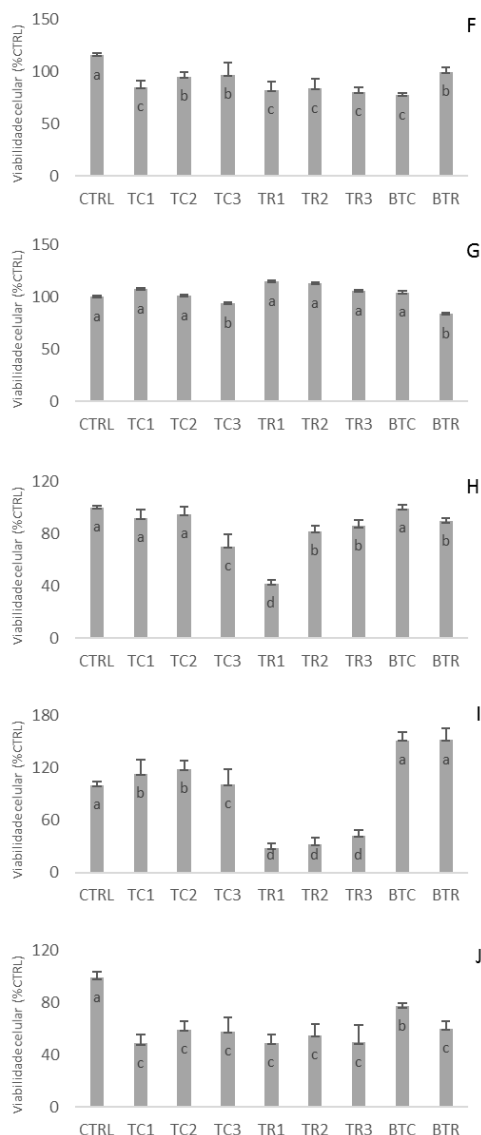
Ainda, sobre esses ensaios, verifica-se que assim como ocorreu para os ensaios de citotoxicidade, o perfil de ésteres de ácidos graxos verificados para os tratamentos por alcoólise diferiu do verificado para os tratamentos por hidrólise, confirmando que a modificação por essas reações formam produtos distintos.

A indústria de alimentos tem procurado cada vez mais soluções menos impactantes ambientalmente para o descarte de resíduos, entre as quais se destacam a biorremediação, na qual elementos biológicos são empregados para neutralizar ou diminuir a toxidez (SIVAPERUMAL et al., 2017). Assim, resíduos com elevados conteúdos lipídicos biorremediados por lipases microbianas vêm sendo reportados. Kumar et al. (2014) pesquisaram a biorremediação de resíduos de óleo de cozinha por lipases produzidas por *Penicillium chrysogenum*, assim como Salgado et al. (2016) que estudaram a biorremediação de resíduos da extração de óleo de oliva por lipases produzidas por *Aspergillus ibericus* e *Aspergillus uvarum*. Entretanto, pela primeira vez esse processo é descrito utilizando lipases obtidas de resíduos vegetais, evidenciando um processo inovador devido à possibilidade de utilização de um resíduo para solucionar o problema gerado por outro resíduo, contribuindo para a sustentabilidade da cadeia produtiva de alimentos.

Ensaio de Citotoxicidade – Alcoólise



Ensaio de citotoxicidade – Hidrólise



* Os valores com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Skott Knott test ($p \leq 0,05$).

Figura 4.9 Ensaio de citotoxicidade por alcoólise (Lipases: A - bagaço; B - casca; C - frit; D - Novozymes; E - Sigma) e por hidrólise (Lipases: F - bagaço; G - casca; H - frit; I - Sigma; J - Novozymes); CTRL - controle meio de cultivo; TC1-3: óleo cru tratado com enzima, de 5 a 15 μ L; TR1-3: resíduo de óleo tratado com enzima, de 5 a 15 μ L; BTC - controle de óleo de soja; BTR - controle de resíduo de óleo de soja)

4.4 Conclusão

Conclui-se que as lipases de resíduos de laranja e comerciais testadas podem ser utilizadas para a modificação de óleo de soja cru e seu resíduo por reações de hidrólise e alcoólise. Os resíduos de óleo de soja tratados com lipases de bagaço e *frit* mostraram-se menos tóxicos em comparação com os óleos não tratados, confirmando que esses resíduos podem ser biorremediados por lipases de laranja.

4.5 Agradecimentos

À UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / Processos 2014/10962-7 e 2015/01753-8), CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

4.6 Referências bibliográficas

- Basso R.C.; Meirelles A.J.A.A.; Batista E.A.C. (2012) Liquid-liquid equilibrium of pseudoternary systems containing glycerol + ethanol + ethylic biodiesel from crambe oil (*Crambe abyssinica*) at T/K = (289.2, 318.2, 338.2) and thermodynamic modeling. Fluid phase equilibria, 333:55-62.
- Bason M.M.; Gordon V.; Maibach H.I. (1991) Skin irritation *in vitro* assays. International Journal of Dermatology, 30:623-626.
- Brown L.D.; Cologgi K.F.; Ulrich A.C. (2016) Capítulo 12: Bioremediation of oil spills on land. Em: Oil Spill Science and Technology. Elsevier Inc., 699-729.
- Duarte J.G.; Leone-Ignacio L.; Silva J.A.C.; Fernandez-Lafuente R.; Freire D. M. G. (2016) Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. Fuel, 177: 123–129.

- Eastmond P.J. (2004) Cloning and chaacterization of the acid lipase from Castor Beans, *Journal of Biology and Chemistry*, 279: 45540–45545.
- Ebrahimi M. (2012) 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*, 96(6): 962-969.
- El-Kouhen K.; Blangym S.; Ortiz E.; Gardies A.M.; Ferte N.; Arondel V. (2005) Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in *Arabidopsis homologous* to mammalian acid lipases, *FEBS Letters*, 579: 6067–6073.
- EPA - United States Environmental Protection Agengy (2013) Land, waste and cleanup science. Disponível em: www.epa.gov/, acessado em Agosto de 2013.
- Fleuri L.F.; Cassani M.; Arcuri M.; Capoville B.L.; Pereira M.S.; Delgado C.O.; Novelli P.K. (2014a) 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*, 1:1-15.
- Fleuri L.F.; Novelli P.K.; Delgado C.O.; Pivetta M.R.; Pereira M.S.; Arcuri M.; Capoville B.L. (2014b) Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus sp.* on solid-state fermentation using three substrates. *International Journal of Food Science & Technology* (Print), 1:1-18.
- Garcia A.P., Benaches G.M.J., Primo E. M. (1992) Lipid mobilization in Citrus cotyledons during germination, v. 140, p. 1-7.
- Gornall A.G.; Bardawill C.J.; David M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177(2): 51-66.
- Gutarra M.L.E.; Godoy M.G.; Maugeri F.; Rodrigues M.I.; Freire D.M.G.; Castilho L.R. (2009) Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100:21:5249.

- Hocevar L., Soares V. R. B., Oliveira F. S., Korn M. G. A., Teixeira L. S. G. (2012) Application of Multivariate Analysis in Mid-Infrared Spectroscopy as a Tool for the Evaluation of Waste Frying Oil Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89:781-786.
- ISO 10993-12:2009(2009) Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
- Guillén M.D.; Uriarte P.S. (2012) Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated α,β unsaturated aldehydes. *Food Chemistry*, 131:3:915-926.
- Kumar S.; Mathur A.; Singh V.; Nandy S.; Kumar K.; Negi S. (2012) Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*, 120:300–304.
- Lee J.K.; Kim D.B.; Kim J.J.; Kim P.Y. (2000) Assay *in vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. *Toxicology in vitro*, 14(4): 345–349.
- Lopes D.B.; Fraga L.P.; Fleuri L.F.; Macedo G.A. (2011) Lipase and esterase to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31(1).
- Macedo G.A.; Pastore G.M.; Park Y.K. (1997) Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista Brasileira de Microbiologia*, 28:90.
- Mita L.; Sicac V.; Guidad M.; Nicoluccia C.; Grimaldia T.; Caputoe L.; Biancoa M.; Rossie S.; Bencivengae U.; Eldinf M.S.M.; Tufano M. A.; Mita D. G. (2010) Employment of immobilised lipase from *Candida rugosa* for the bioremediation of waters polluted by dimethylphthalate, as a model of endocrine disruptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62:133–141.

- Murugesan A.; Umarani C.; Subramanian R.; Nedunchezian N. (2009) Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 653–662.
- Nwobi B.E.; Ofoegbu O.; Adesina O.B. (2006) Extraction and qualitative Assessment of african sweet orange seed oil. *African Journal of Food Agriculture and Nutrition*, 6:1–11.
- O’Fallon J. V.; Busboom J.R.; Nelson M.L.; Gaskins C.T. (2007) A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science*, 85(6): 1511-1521.
- Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2016) Orange and mango byproducts: agro-industrial waste as source of bioactive compounds and botanical versus commercial description - A review. *Food Reviews International* (Print), v. 1, p. 15-20.
- Okino-Delgado C.H.; Fleuri L.F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163:103-107.
- Paques F.W.; Macedo G.A. (2006) Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, 29(1): 93–99.
- Pozzi C.M.C.; Braga C.P.; Vieira J.C.S.; Cavecci B.; Queiroz J.V.; Barbosa H.S.; Arruda A. Z.; Gozzo F.C.; Padilha P.M. (2015). Metal ions bound to the human milk immunoglobulin A: Metalloproteomic approach. *Food chemistry*, 166-492-497.
- Rigo E., Rigoni R.E., Lodea P., Oliveira D., Freire D.M.G., Luccio M.D. (2008) Application of Different Lipases as Pretreatment in Anaerobic Treatment of Wastewater. *Environmental Engineering Science*, 25:1243-1248.
- Salgado J.M.; Abrunhosa L.; Venância A.; Domínguez J.M.; Belo I. (2014) Integrated use of residues from olive mill and winery for lipase production by solid state fermentation with *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 172(4):1832-1845.
- Seth S.; Chakravorty D.; Dubey V.K.; Patra S. (2014) An insight into plant lipase research - challenges encountered. *Protein Expression and Purification*, 95: 13–21.

- Stacke J.; Graff T.; Rempel C.; Dal-Bosco S.M. (2009) Perfil de ácidos graxos no óleo de soja, após diferentes tempos de uso, no processo de fritura. *Revista de Destaque Acadêmico*, 1(3): 71-79.
- Sivaperumal P.; Kamal K.; Rajaram R. (2017) Capítulo 8 – Bioremediation of industrial waste through enzyme producing marine microorganisms. Em *Advances in Food and Nutrition Research, Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part III - Application of Marine Enzymes*, 80: 165–179.
- Su E.; Wei D. (2008) Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerol for biodiesel production using a solvent engineering method. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 55:3-4:118-125.
- Talukder M.M.R.; Tamalampudy S.; Li C.J.; Le Y.L.; Wu J.C.; Kondo A. (2007) An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. *Biochemistry Engineer*, 33:60–65.
- Teo J.W.P.; Zhang L.H.; Poh C.L. (2003) Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain. AP6. *Gene*, 312:181-188.
- Xiaoxing X.; Feng P.; Dongyun N.; Gang L.; Fang C. (2006) Cloning and expression of lipase gene JcLIP in *Jatropha curcas* and its protein structure prediction, *Chinese Bull Botany*, 23: 634–641.



CAPÍTULO 5: Produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise enzimática e química: análise da viabilidade reacional e estimativa de custo.

5.1 Introdução

A busca por alternativas renováveis, menor dependência do petróleo e incentivos governamentais vem impulsionando a produção de biodiesel nos últimos anos. Entre esses, as políticas de obrigatoriedade da adição de biodiesel ao diesel estão entre as que têm proporcionado maior impacto ao aumento da produção desses biocombustíveis. Em países de elevada produção agrícola e industrial o percentual adicionado de biodiesel ao diesel vem aumentando gradativamente, sendo de 10% de biodiesel adicionado nos EUA, China e Argentina. No Brasil a taxa de obrigatoriedade é de 8%, com a expectativa de chegar a 10% em 2019, sendo que na última década a produção brasileira passou de cerca de 750 mil litros para aproximadamente 3,5 bilhões de litros (ANP, 2017; OLIVEIRA E COELHO, 2016).

O Brasil possui elevada variedade de oleaginosas cultivadas, embora, o biodiesel seja majoritariamente produzido a partir de óleo de soja por catálise alcalina. Dessa forma, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) foi implementado no país no ano de 2005 com o intuito de promover a diversificação das matérias-primas utilizadas e descentralização das regiões produtoras, com incentivo à agricultura familiar, formação de demanda com medidas à adição de biodiesel no diesel e redução tributária (SOUZA et al., 2016). Assim, há o interesse crescente em explorar matrizes alternativas disponíveis nas diferentes regiões do país, como a mamona no Nordeste; a palma no Norte; o algodão e o girassol no Centro-oeste e Sudeste; e a uva e o girassol no Sul (BARROS et al., 2009); já que com isso haveria diminuição dos custos logísticos, incentivo à agricultura familiar e exploração da biodiversidade.

Outro fator que contribuiria para o aumento da sustentabilidade da produção de biodiesel é a substituição do processo químico pelo enzimático. Este pode ser realizado por lipases, com vantagens como maior especificidade, reação em condições amenas, menor geração de resíduos tóxicos e elevados rendimentos, mesmo em materiais com elevada concentração de ácidos graxos livres e água (SOARES et al., 2013). A viabilidade reacional da produção de biodiesel de óleos vegetais alternativos por catálise



enzimática vem sendo comprovada, pois elevadas taxas de conversão podem ser atingidas (DABDOUD et al., 2009; LIMA et al., 2007; PIGHINELLI et al., 2007). No entanto, em geral, cada óleo é analisado utilizando parâmetros, como catalisador, razão molar e álcool em estudos específicos, dificultando a comparação entre os diferentes óleos e tipos de catálises. Além disso, o principal entrave para a catálise enzimática continua sendo o elevado custo das enzimas, por isso, a bioprospecção por fontes de lipases com elevada atividade e baixo custo de obtenção mostra-se interessante.

Como acontece para a análise de viabilidade reacional, a análise de custos da produção de biodiesel vem sendo realizada de maneira segmentada, comparando as diferentes culturas utilizando o processo catalítico químico, como descrito por Barros et al. (2009); ou comparando a catálise química e enzimática utilizando o mesmo óleo como matéria-prima, como descrito por Sotoft et al. (2010).

Dessa forma, a análise da viabilidade reacional e estimativa de custo da produção de biodiesel a partir de diferentes óleos por catálise química e enzimática, utilizando os mesmos parâmetros de comparação, pode auxiliar a identificar as matérias-primas de maior potencial. Assim, o presente trabalho analisou a viabilidade enzimática da produção de biodiesel catalisada por lipases comerciais e *home-made* obtidas de resíduos de laranja em comparação com a catálise química alcalina; bem como, estimou o preço final do biodiesel produzido a partir dos óleos de soja, mamona, palma, girassol, caroço de algodão, amendoim, semente de uva e resíduo de óleo de cozinha, analisando os itens necessários para a extração de óleo e para a conversão deste em biodiesel.

5.2 Material e métodos

Os dados apresentados no estudo de viabilidade reacional foram obtidos experimentalmente; já os dados sobre produção, agrícola, rendimento de extração de óleo e conversão de óleo em biodiesel utilizados no estudo de estima de custo foram retirados de referências bibliográficas.



5.2.1 Viabilidade reacional - modificação de óleos vegetais visando à produção de biodiesel

A produção de biodiesel por catálise enzimática foi analisada quanto à viabilidade reacional utilizando lipases comerciais e *home-made* obtidas de resíduos de laranja. Para isso, foram avaliadas a modificação dos óleos de mamona, semente de uva, palmiste, palma e babaçu por catálise química, utilizando NaOH; e enzimática, utilizando seis diferentes extratos enzimáticos, pela reação de alcoólise. Além disso, como o ácido oleico está entre os componentes majoritários da maioria dos óleos vegetais utilizados para a produção de biodiesel, foi realizada a esterificação do ácido oleico por catálise enzimática utilizando os mesmos seis extratos enzimáticos com o intuito de avaliar o processo em relação ao ácido graxo livre.

5.2.2 Catálise enzimática

Os estudos de alcoólise por catálise enzimática foram conduzidos com as lipases comerciais de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) e lipases de *Candida antarctica* (Novozyme); e as *home-made* obtidas de resíduos do processamento de laranja para suco da variedade Pera.

As lipases *home-made* foram obtidas pelo método utilizado por Okino-Delgado e Fleuri (2014), e concentradas por precipitação com sulfato de amônio, diálise, centrifugação e liofilização como realizado por Okino-Delgado e Fleuri (2015). Foram obtidos três extratos de diferentes frações dos resíduos do processamento de laranja, os quais são denominados de bagaço, frit e casca.

Foi realizada titulação de ácidos após a hidrólise dos óleos de milho, soja e girassol pelas lipases *home-made* de laranja para verificação da atividade enzimática.

As reações de alcoólise dos óleos vegetais por catálise enzimática foram conduzidas seguindo o método utilizado por Fleuri et al. (2014), utilizando os óleos vegetais e etanol na proporção 1:1 (v/v) e 5% de extrato enzimático. As análises foram realizadas em duplicata e a identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram realizadas como descrito a seguir.



As reações de esterificação de ácido graxo livre foram conduzidas seguindo o método utilizado por Fleuri et al. (2014), utilizando ácido oléico e etanol na proporção 1:5 (v/v) e 5% de extrato enzimático.

5.2.3 Catálise química

As reações de alcoólise por catálise química foram conduzidas seguindo o método descrito por Hartmann e Lago (1973), com modificações, utilizando hidróxido de sódio como agente catalisador e etanol como solvente.

5.2.4 Identificação e quantificação de ésteres de ácidos graxos por CG

As amostras foram preparadas seguindo o método descrito por O'Fallon et al. (2007) com modificações. Os ésteres formados foram obtidos a partir de uma alíquota de 1 mL de cada amostra, os quais foram extraídos adicionando 2 mL de heptano e 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 2 min e, após a separação de fases, o sobrenadante foi encaminhado para análise por cromatografia gasosa.

A caracterização do perfil de ésteres de ácidos graxos nas amostras foi realizada em equipamento Shimadzu GC-2010" por: CG/DIC Shimadzu (GC-2010) e CG/EM Shimadzu (QP-500), dotados com coluna capilar de sílica fundida OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30.0m x 0.25mm x 0.25µm). Foi realizada a otimização da programação da corrida cromatográfica para cada tipo de óleo analisado, seguindo as configurações para cada óleo/ácido como descritas a seguir.

Configurações para ácido oleico: 180°C (10 min-1), 180°C - 280°C, 5°C min-1, injetor a 280°C e detector a 300°C;

Configurações para óleo de mamona: 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;

Configurações para óleo de uva: 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.



Configurações para óleo de babaçu e palmiste: 150°C (1 min⁻¹), 150°C - 240°C, 10°C (min⁻¹), 240°C (2 min⁻¹), 240°C - 300°C, 15°C (min⁻¹), 300°C (20 min⁻¹), injetor a 290°C e detector a 300°C;

Configurações para óleo de palma: 170°C (1 min⁻¹), 170°C - 300°C, 3°C (1 min⁻¹), 300°C (1 min⁻¹), injetor a 230°C e detector a 300°C.

A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos e a identificação realizada pela comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os de padrões comerciais de ésteres etílicos de ácidos graxos.

O cálculo de rendimento de reação foi calculado relacionando o valor inicial de ácidos graxos de cada óleo e o valor de ésteres de ácidos graxos formados. O valor de ésteres de ácidos graxos formados foi calculado utilizando curva de padrão de oleato de etila (Sigma-Aldrich) analisada nas mesmas configurações das análises.

Os resultados obtidos na análise do perfil de ésteres de ácidos graxos foram comparados em análise multivariada de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (Cluster) foi realizada utilizando o software XLSTAT – 2017.3 version (Addinsoft, France).

5.2.5 Estimativa de custos

Foi realizada a estimativa de custo de biodiesel obtidos dos óleos de soja, mamona, palma, babaçu, girassol, caroço de algodão, amendoim, semente de uva e resíduo de óleo de cozinha; por catálise química e enzimática, utilizando informações de estudos recentes e das condições atuais destes combustíveis no mercado brasileiro.

5.2.6 Disponibilidade das matérias primas, rendimento e custo do óleo

Para a estimativa de custo do óleo bruto foram analisados os dados da produção de semente de mamona, grãos de soja, semente de uva, fruto de palma, fruto de babaçu, semente de girassol, grãos de amendoim, caroço de algodão, além da geração de resíduos de óleo de cozinha.

Os dados de produção agrícola e rendimento de óleo foram obtidos dos bancos de dados geridos pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Centro de



Estudo em Economia Aplicada (CEPEA) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), referentes às safras de 2014/2015 para as culturas de soja, babaçu, girassol e uva; e às safras de 2015/2016 para mamona, palma, algodão e amendoim. O potencial de oferta de óleo foi calculado multiplicando a produção agrícola pelo rendimento de óleo.

Os valores utilizados como base para o custo dos óleos de soja e algodão foram obtidos da cotação realizada pela CONAB utilizando a política de garantia de preços mínimos (PGPM), a qual possui menor oscilação em relação aos outros indicadores. Para as culturas de amendoim, babaçu, girassol e palma, os valores dos óleos foram calculados considerando a cotação dos produtos agrícolas e o rendimento da extração de óleo; enquanto que os valores do óleo de semente de uva foram calculados considerando a produção agrícola de semente de uva como 5% do total de uvas processadas no ano de 2015 multiplicados pelo valor de rendimento da extração de óleo. Para os cálculos de biodiesel de resíduo de óleo de cozinha foram utilizados dados de valor de venda e produção desses resíduos descritos pela revista BiodieselBR (2017) que incluíram os gastos com coleta, transporte e armazenamento.

O valor dos subprodutos de todas as culturas foi subtraído da estimativa do custo do óleo, sendo que para cada cultura a quantidade de subproduto gerada foi calculada como sendo 70% da massa da matéria prima menos a massa referente ao óleo extraído. Os cálculos dos custos com a extração de óleo foram baseados na estimativa realizada por Barros et al. (2009).

5.2.7 Estimativa de custos para o processamento de óleos em biodiesel por catálise química e enzimática

A estimativa de custos para o processamento de óleos em biodiesel por catálise química e enzimática foi realizada para o cálculo de custo final de 1 litro de biodiesel para cada matéria prima analisada. Os cálculos de estimativa de custo foram baseados nos itens descritos por Mankiw (2014) para o análise do custo, sendo que os custos fixos foram considerados os mesmos para todas as matérias primas e os custos variáveis foram obtidos para cada matéria prima. Os itens que compuseram o cálculo estão descritos na Equação 1 e a descrição dos cálculos de cada item considerado consta a seguir.



Equação 1. Cálculo do custo de 1 litro de biodiesel do óleo X

$$CB\ X = (CO/ROX) + CS + CC + CP1 - SE - SG$$

Sendo:

CB X = estimativa de custo para 1 litro de biodiesel do óleo X em reais

CO = custo do óleo X (R\$/t)

ROX = rendimento da conversão do óleo X em biodiesel (kg de biodiesel/t de óleo)

CS = custo do solvente (calculado em relação a razão molar de cada óleo)

CC = custo do catalisador (80 reais considerando 9,5 kg de NaOH e 2788 reais considerando 1kg de lipase)

CP1 = custo do processamento do óleo em biodiesel (autor 1 ou 2)

SE – valor gerado pelo subproduto etanol recuperado (considerando 90% de recuperação)

SG – valor gerado pelo subproduto glicerina bruta recuperada (considerando 10% de recuperação)

O custo do óleo (R\$/t) (CO) foi o calculado como descrito no item anterior sobre o custo da extração de cada óleo a partir da matéria prima agrícola. O CO foi dividido pelo valor de rendimento do processamento do óleo em biodiesel, baseado em referências específicas para cada matéria prima. O valor do solvente foi calculado em relação a razão molar multiplicado pelo valor do etanol anidro de R\$1,61 (cotação CEPEA de maio de 2017). Os dados de razão molar foram obtidos em referências específicas para matéria prima.

A estimativa de custo do processamento do óleo (CP1) em biodiesel sem matérias primas (óleo, solvente e catalisador) foi calculada utilizando dois estudos (descritos a seguir) que utilizaram a cultura de soja como referência e incluíram valores referentes a custos fixos, variáveis e semi-variáveis. Sotoft et al. (2010) pesquisaram a simulação do processo e estimativa de custo da produção de biodiesel de óleo de soja por catálise química e enzimática na escala de 8 mil toneladas processados por ano. Já Santos



(2008) analisou os custos econômicos da produção de biodiesel por diferentes óleos vegetais por catálise química.

Para a catálise enzimática foi considerado 85% do valor de CP1, devido à redução dos gastos com energia elétrica e estrutura, sendo essa estimativa baseada no estudo descrito por Sotoft et al. (2010).

O custo do catalisador (CC), para a catálise química, foi calculado considerando o uso de 10 kg de NaOH por tonelada de óleo processado, cotado a R\$ 8,00 / kg, assim foi considerado o valor de R\$ 80,00 de catalisador por tonelada de óleo processado por catálise química; enquanto que para a catálise enzimática, foi considerado o uso de 1 kg de lipase por tonelada de óleo processado, considerando o valor referente a 1 kg de lipase comercial de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) cotado a R\$ 2.788,00, dessa forma, foi considerado esse mesmo valor do catalisador por tonelada de óleo processado por catálise enzimática.

Foi considerado o aproveitamento de subprodutos nos cálculos de estimativa de custos do biodiesel, via catálise química e enzimática.

O valor gerado pelo subproduto glicerina (SG) foi calculado considerando-se a recuperação de glicerina de 10% em relação ao volume de biodiesel gerado no processamento de 1 tonelada de óleo, multiplicado pelo valor da cotação da glicerina bruta de R\$ 450,00 / t 61 (cotação CEPEA de maio de 2017). A taxa de recuperação foi baseada no estudo descrito por Carvalho et al. (2017).

O valor gerado pelo subproduto solvente recuperado (SS) foi calculado considerando-se a recuperação de etanol de 80% do volume inicial, já que cerca de 10% é consumido na reação e a taxa de recuperação é de 90% do volume excedente. Esse valor foi multiplicado pela cotação do etanol anidro de R\$ 1,61 o litro (cotação CEPEA de maio de 2017). A taxa de recuperação foi baseada no estudo descrito por Ferrari et al. (2010).

Para a conversão de moedas considerou-se um dólar americano como R\$ 3,11 e o euro como R\$ 3,43, baseados na taxa de câmbio vigente em maio de 2017.

O presente estudo não considerou isoladamente os custos inerentes das transações financeiras como juros, taxas e impostos, bem como, os custos com logística e desenvolvimento tecnológico. Isso porque esses parâmetros possuem elevada variação



de acordo com a matéria prima e tecnologias empregadas o que limitaria a comparação entre as diferentes culturas.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Viabilidade reacional

Os resultados do estudo de modificação de óleos vegetais via catálise química e enzimática demonstraram que as lipases comerciais de pâncreas de porco (Sigma-Aldrich®) e de *Candida antarctica* (Novozymes®) foram capazes de catalisar as reações de alcoólise dos óleos de mamona, babaçu, semente de uva e palmiste e palma, utilizando etanol como solvente, chegando a 60,67% de rendimento para óleo de babaçu modificado por alcoólise catalisada pela lipase Lipozyme; e esterificação de ácido oleico utilizando etanol como solvente, chegando a 81,02% de rendimento para ácido oleico modificado por esterificação catalisada por lipase Sigma. Esses resultados demonstram que os catalisadores reagem de maneira distinta em diferentes substratos, sendo que para a transformação de cada óleo/ácido é necessário analisar o catalisador mais indicado.

Já em relação às lipases home-made obtidas de resíduos de laranja, verificou-se que foram capazes de catalisar a reação de esterificação de ácido oleico utilizando o etanol como solvente, chegando a 41,55% de rendimento para lipase de casca, porém, não foram capazes de catalisar a reação de alcoólise de óleos vegetais nas condições reacionais testadas (Tabela 5.1). Isso indica que esses biocatalisadores poderiam ser utilizados na produção de biodiesel subdividida em duas etapas, no qual, o óleo é primeiramente hidrolisado e em seguida os ácidos graxos livres são esterificados.

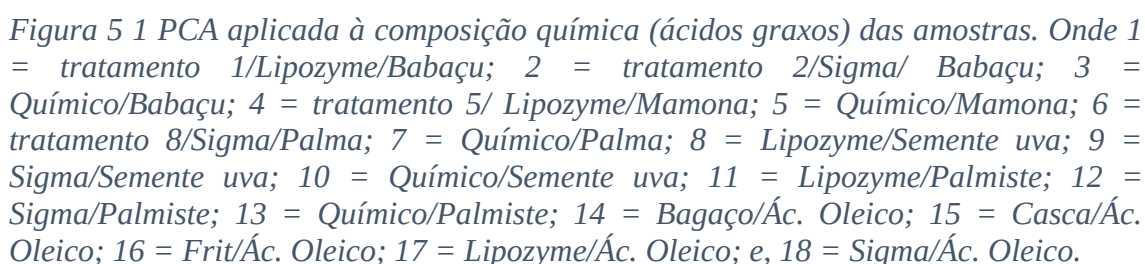
Em relação à reação de alcoólise dos óleos vegetais, verifica-se que os catalisadores apresentaram rendimento diferenciado entre os óleos testados. A Lipozyme apresentou maiores rendimentos para os óleos de babaçu, mamona e palmiste, correspondendo a 60,67%, 28,03% e 42,87%, respectivamente; a lipase Sigma apresentou maiores rendimentos para ácido oleico (81,02%); e a catálise química mostrou-se mais eficaz para os óleos de palma, uva e palmiste, correspondendo a 52,53%, 56,64% e 43,44%, respectivamente. Observou-se também, que as lipases de

resíduos de laranja apresentaram rendimento similar à lipase Lipozyme para a esterificação de ácido oleico com etanol (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Rendimento da modificação de óleos vegetais por catálise química e enzimática

Substrato (óleo)	Catalisador	Razão molar (óleo:etanol, m/m)	Rendimento (%)
<i>Babaçu</i>	Referência - Lima et al. (2007)	1:6	62,0
	Lipozyme	1:1	60,67
	Sigma	1:1	20,83
	Químico	1:1	39,45
<i>Mamona</i>	Referência – Santana (2010)	1:10	84,0
	Lipozyme	1:1	28,03
	Químico	1:1	13,68
<i>Palma</i>	Referência – Silva et al. (2011)	1:18	62,0
	Sigma	1:1	6,11
	Químico	1:1	52,53
<i>Uva</i>	Referência – Rossi (2014)	1:6	96,0
	Lipozyme	1:1	30,29
	Sigma	1:1	28,95
	Químico	1:1	56,64
<i>Palmiste</i>	Referência – Suwanno et al. (2017)	1:6	92,1
	Lipozyme	1:1	42,87
	Sigma	1:1	8,27
	Químico	1:1	43,44
<i>Ácido oleico</i>	Referência – Tian et al. (2016)	1:10	82,0
	Bagaço	1:5	15,68
	Casca	1:5	41,55
	Frit	1:5	37,29
	Lipozyme	1:5	37,55
	Sigma	1:5	81,02

A análise de Componentes Principais (PCA) aplicada à composição química dos ácidos graxos expressou 46,48% da variância para as duas primeiras componentes principais, sendo a PCA1 (F1) responsável em descrever 27,28% e a PCA2 (F2) 19,20% da variância total. As variáveis fornecidas pela PCA permitiram identificar a separação das amostras em três grupos distintos, sendo grupo A (amostra 6) estabelecido a partir dos ácidos graxos capríco (C6:0) e caprílico (C8:0), grupo B (amostra 7) a partir dos ácidos palmitoleico (C16:1), margárico (C17:0) e elaídico (C18:1n9t), e o grupo C (amostras: 1 a 5 e 8 a 18) a partir dos demais ácidos graxos identificados (Figura 5.1).



126

(C16:0), linoleico (C18:2n6c) e oleico (C18:1n9c), não sendo uma substância em especial a responsável por agrupar este cluster (Figura 5.3-e). Já o Cluster 6, representado pelas amostras 10 (Químico/Semente uva/ Alcoólise) e 14 a 18 (amostras esterificadas), caracterizaram-se por apresentarem em sua composição uma maior proporção do ácido oleico, comparada as demais amostras (Figura 5.3-f).

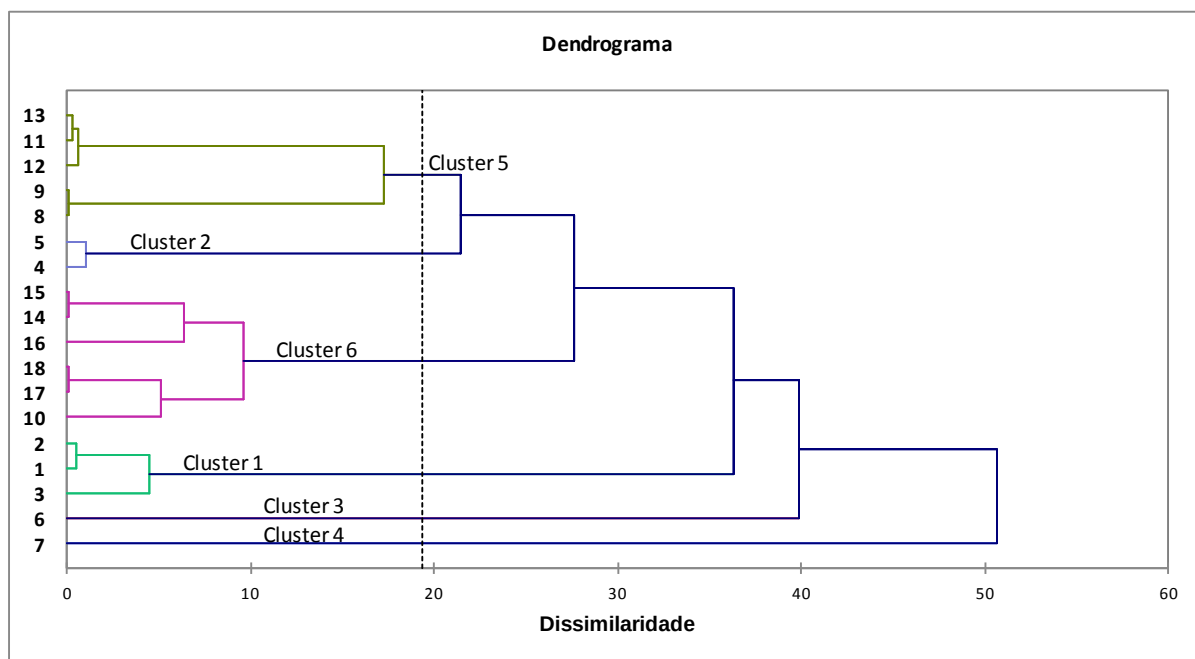


Figura 5 2 Dendrograma de dissimilaridade construído através da análise de agrupamento hierárquico (análise de cluster). Onde 1 = tratamento Lipozyme/Babaçu; 2 = tratamento Sigma/ Babaçu; 3 = Químico/Babaçu; 4 = tratamento 5/ Lipozyme/Mamona; 5 = Químico/Mamona; 6 = tratamento 8/Sigma/Palma; 7 = Químico/Palma; 8 = Lipozyme/Semente uva; 9 = Sigma/Semente uva; 10 = Químico/Semente uva; 11 = Lipozyme/Palmiste; 12 = Sigma/Palmiste; 13 = Químico/Palmiste; 14 = Bagaço/Ác. Oleico; 15 = Casca/Ác. Oleico; 16 = Frit/Ác. Oleico; 17 = Lipozyme/Ác. Oleico; e, 18 = Sigma/Ác. Oleico;

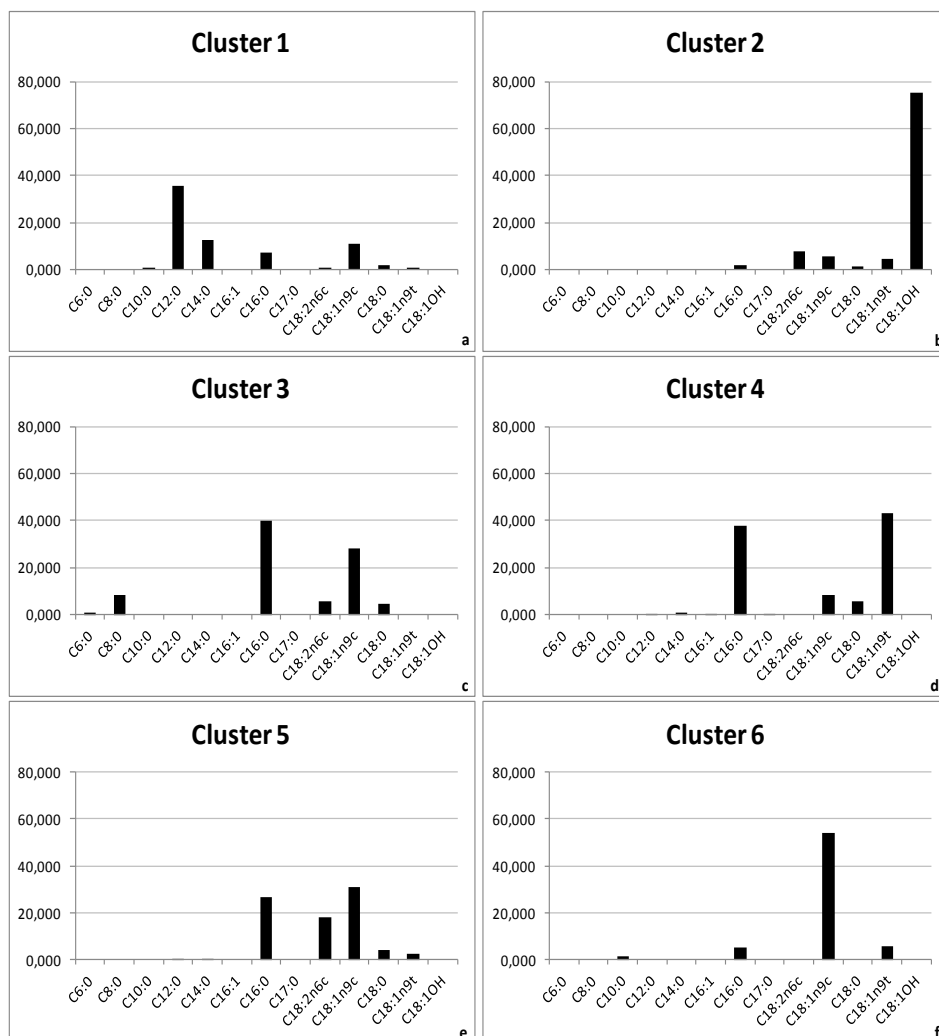


Figura 5 3 Significância dos ácidos graxos mais importantes para os agrupamentos de cluster 1 a 6.

Dessa forma, observa-se que as modificações dos óleos vegetais por catálise química e enzimática apresentaram perfis de ésteres de ácidos graxos similares, pois, foram classificados nos mesmos grupos estatísticos, com exceção do óleo de palma modificado por alcoólise química. Isso demonstra que os produtos obtidos pela catálise química e enzimática são similares e, portanto, a catálise enzimática mostra-se viável do ponto de vista reacional.

Entretanto, em geral, as taxas de rendimento ficaram abaixo do observado em estudos específicos, nos quais foram atingidas taxas próximas a 95% em condições reacionais ótimas. Porém, no presente estudo foram utilizadas condições reacionais padronizadas para todos os catalisadores e substratos.



Entre as principais diferenças está a razão molar, que para óleo de mamona foi de 28,03% contra a 84% obtido por Santana (2010); de babaçu foi de 60,67% contra 62% obtido por Lima et al. (2007); de palma foi de 6,11% contra 90% obtido por Silva et al. (2011); e de uva foi de 30,29% contra 96% obtido por Rossi e Santos (2014). A razão molar utilizada neste estudo também foi menor, de 1:1 (m/m) para este estudo chegando a 1:18 (m/m) para a alcoólise de óleo de palma descrito por Silva et al. (2011). Essas diferenças são relevantes, visto que o custo com solvente foi considerado um dos fatores de maior impacto na variação do valor final do biodiesel estimado. Dessa forma, pondera-se que é possível obter taxas de rendimento aceitáveis utilizando razão molar entre óleo e etanol menos onerosa. Essa elevação do conteúdo de solvente mostra-se eficaz para o aumento do rendimento na catálise química, já que conduz a reação na direção da esterificação. Entretanto, na catálise enzimática isso é limitado uma vez que a atividade enzimática é reduzida em meios reacionais com elevada concentração de solvente, sendo que outras estratégias vêm sendo utilizadas para aumento do rendimento, como o proposto por Da-Rós et al. (2014). Estes autores verificaram o aumento do rendimento de biodiesel de babaçu de cerca de 13% para 74% com o uso de lipases imobilizadas e micro-ondas.

Outros recursos podem ser utilizados para a maximização da catálise enzimática como a imobilização, a qual possibilita o reaproveitamento das enzimas e que foi proposto por Sangaletti (2012). A pesquisa consistiu na produção de biodiesel de óleo de soja utilizando lipases Novozyme 435 imobilizadas, as quais mantiveram elevada atividade até o terceiro ciclo de uso, diminuindo o gasto com as enzimas. Outra forma de aumentar o rendimento na produção de biodiesel por catálise enzimática seria a adição de um co-solvente no meio reacional, como descrito por Knothe et al. (2006) que adicionaram metil terc-butil éter (MTBE) e tetrahidrofurano (THF) para produção de biodiesel de soja e que implicaram no aumento na velocidade de reação.

Em relação às lipases obtidas de resíduos de laranja, concluiu-se que não foram eficazes na catálise da alcoólise dos óleos vegetais analisados, entretanto, catalisaram a esterificação de ácido oleico que é o composto majoritário de óleos como o de soja e palma. Assim, outra forma de aumentar o rendimento, seja pela catálise química ou enzimática, seria a divisão do processo em duas etapas. Esta divisão é interessante, pois o conteúdo final de ésteres de ácido graxo é mais elevado em comparação com a



alcoólise clássica e é possível utilizar catalisadores mais adequados em cada etapa (ELSHEIKH et al., 2011; BERCHMANS e HIRATA, 2008; ANTOLÍN et al., 2002). Essa ideia foi corroborada no presente estudo para as lipases Sigma e de laranja que apresentaram desempenho superior na esterificação do ácido graxo livre em relação aos óleos, chegando a 81% de rendimento para a lipase comercial.

5.3.2 Estimativa de custos

5.3.3 Disponibilidade das matérias primas, rendimento e custo do óleo

Os dados agrícolas sobre as matérias-primas utilizadas na extração de óleos vegetais indicam que, entre as culturas analisadas, a soja apesar de possuir menor rendimento (cerca de 20% de óleo em relação à massa do grão) é a cultura com maior potencial de oferta de óleo devido à sua elevada produção agrícola (Tabela 5.2). A mamona possui relevância especialmente nos estados da região nordeste do país devido à sua resistência ao estresse hídrico, o que permite seu cultivo em áreas com restrição de água (SANTANA, 2010). A palma está entre as culturas oleaginosas mais cultivadas no mundo e no Brasil e, apesar de sua baixa produção nacional, possui relevância nos estados da região norte (SILVA et al., 2011). O óleo de semente de algodão, semente de uva e resíduo de cozinha são provenientes de resíduos, dessa forma, foram analisados neste estudo com o intuito de aumentar a sustentabilidade dos processos geradores de biodiesel.

Os valores considerados com a venda dos subprodutos da extração foram cruciais para reduzir o valor final do óleo para todos os materiais vegetais, enfatizando a importância do aproveitamento dos resíduos durante esse processo.

Tabela 5.2 Estimativa de custo da extração de óleos vegetais

Óleos vegetais → Variáveis↓	Soja	Mamona	Babaçu	Girassol	Amendoim	Algodão (caroço)	Uva (semente)
Potencial de oferta de óleo (t)	1.912.620,00	47.241	58.330	406.494	12.195	13.233	5.800
Estados produtores	MT, PR, GO, RS, MS, MG, BA, SP, MA, TO, SC, PA	PI, BA, PA, PE e CE	MA, TO, PI, CE	AM, PA, BA	AM, PA, BA	MT, MG, GO, RS, MS, RO, PR, BA e CE	SP, PA, SE, BA e CE
Perfil produtor	grande	pequeno	extrativismo	pequeno	pequeno	grande	pequeno
Matéria prima R\$/t (média nacional) ¹	975	1058	2490	1078	5880	821	1512
Rendimento o kg óleo/t de MP ²	0,2	0,486	0,65	0,37	0,45	0,076	0,15
Rendimento o kg subproduto o/t de MP	0,56	0,4112	0,245	0,4725	0,44	0,5544	0,595
Custo processamento t/MP	100	100	100	100	100	100	100
Valor venda subproduto	478,8	394,752	196	378	365,2	435,204	476
Custo de 1 tonelada de óleo (R\$)	2114,20	1570,13	3683,08	2163,06	12477,33	5474,80	7573,33
Custo de 1 tonelada de óleo (US\$)	680,77	505,58	1185,95	696,51	4017,70	1762,88	2438,61

5.3.4 Estimativa de custos para o processamento de óleos em biodiesel por catálise química e enzimática

Os resultados da estimativa de custos de produção de biodiesel de óleos vegetais via catálise química e enzimática estão apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4. No estudo de



estimativa de custo de biodiesel de diferentes óleos vegetais verifica-se que o valor final por litro variou de R\$ 1,47 para o biodiesel de resíduo de óleo de cozinha a R\$ 14,38 para biodiesel de óleo de amendoim, considerando a recuperação e retorno financeiro com os subprodutos etanol e glicerina. Essa variação ocorreu devido às diferenças no custo da matéria-prima, no rendimento de biodiesel formado e na razão molar considerada adequada para cada cultura.

Os valores estimados para biodiesel de óleo de soja, mamona, girassol, palma e resíduo de óleo de cozinha, via catálise química, ficaram abaixo do valor máximo estipulado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) que foi de R\$ 3,20/litro de biodiesel em 2016 e é utilizado como referência nos leilões desse biocombustível no país (Tabela 5.3). Já os valores estimados para biodiesel de óleo de babaçu, amendoim, caroço de algodão e semente de uva via catálise química e biodiesel de todos os óleos por catálise enzimática, ficaram acima do preço máximo estipulado pela ANP. Dessa forma, conclui-se que utilizando a tecnologia existente e considerando os valores atuais das matérias-primas, a produção utilizando os óleos de amendoim, semente de uva e caroço de algodão não são viáveis economicamente no Brasil, assim como a produção de biodiesel por catálise enzimática utilizando as lipases disponíveis no mercado também mostra-se impraticável.

Na catálise química os itens que mais influenciaram no custo final do biodiesel foram o preço do óleo e o rendimento de extração do óleo. Isso pode ser verificado para a estimativa do biodiesel de mamona (cerca de R\$ 2,25/litro) que demonstrou valores abaixo do biodiesel de soja (cerca de R\$ 2,85/litro) devido, principalmente, ao maior rendimento na extração de óleo. O rendimento na extração de óleo foi determinante no preço do biocombustível, mesmo com o valor da mamona (R\$ 1058,00 / t de frutos) superior ao da soja (R\$ 975,00 / t de grãos) (Tabela 5.3).

Outro fator que altera o valor final do biodiesel é a razão molar entre óleo e solvente, a qual em média é na proporção de 1:3, respectivamente. No entanto, o solvente dever ser adicionado em excesso para deslocar o equilíbrio da reação para a formação dos estéres de ácido graxo. Dessa forma, a razão molar varia de acordo com o óleo utilizado como matéria-prima, como de 1:4 de óleo de girassol:solvente (SALLES et al., 2006) até 1:18 de óleo de palma:solvente (SILVA et al., 2011). O custo do biodiesel de girassol, por exemplo, foi estimado em R\$ 2,81/litro, estimativa esta



próxima ao do biodiesel de soja. Na produção deste houve a necessidade de maior quantidade de solvente que implicou no aumento do valor operacional do processo, já que para obter o mesmo rendimento de ésteres de ácidos graxos foram necessários mais ciclos de reação com o solvente. Isso é mais evidente para o biodiesel de óleo de palma (cerca de R\$ 2,65/litro) que necessita de razão molar de 1:18, para qual o valor gasto com solvente foi praticamente o dobro do gasto para o biodiesel de soja: R\$ 351,95 para biodiesel de palma e R\$ 175,98 para biodiesel de soja (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Estimativa de custo da produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise química

Óleos vegetais → Variáveis↓	Soja ³	Mamona ⁴	Babaçu ⁵	Girassol ⁶	Amendoim ⁷	Algodão ⁷ (caroço)	Uva ⁸ (semente)	Palma ⁹	Resíduo de cozinha ¹⁰
Matéria prima R\$/t (média nacional)	2114,20	1570,13	3683,08	2163,06	12477,33	5474,80	7573,33	1800,00	1000,00
Rendimento biodiesel/óleo	0,90	0,84	0,62	0,97	0,97	0,82	0,96	0,98	0,85
Quantidade de etanol	546,51	591,30	400,00	242,89	597,52	364,34	364,34	1093,02	130,00
Custo solvente por t de óleo	879,88	951,99	644,00	391,06	962,01	586,59	586,59	1759,77	209,30
Custo catalisador	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00	80,00
Processamento t/biodiesel ¹	293,55	293,55	293,55	293,55	293,55	293,55	293,55	293,55	293,55
Processamento t/biodiesel ²	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52	1385,52
Subproduto etanol recuperado	791,90	856,79	579,60	351,95	865,81	527,93	527,93	1583,79	188,37
Subproduto glicerina bruta recuperada	50,00	53,57	72,35	46,63	46,39	54,88	46,88	45,92	52,94
Estimativa para 1 tonelada de biodiesel (R\$)	2760,65	2159,76	4457,91	2769,43	14287,06	6460,44	8800,15	2503,61	1452,65
Estimativa para 1 tonelada de biodiesel (US\$)	883,41	691,12	1426,53	886,22	4571,86	2067,34	2816,05	801,15	464,85
Estimativa para 1 tonelada de biodiesel (R\$)	3852,62	3296,34	7298,92	3619,51	14298,56	8065,88	9286,19	3352,31	2529,98
Estimativa 1 tonelada de biodiesel (US\$)	1232,84	1054,83	2335,65	1158,24	4575,54	2581,08	2971,58	1072,74	809,59
Valor médio biodiesel (R\$/litro)	2,76	2,16	4,46	2,77	14,29	6,46	8,80	2,50	1,45
Valor médio biodiesel (US\$/litro)	0,88	0,69	1,43	0,89	4,57	2,07	2,82	0,80	0,46

*Fontes: Santos (2008)¹; Sotoft et al. (2010)²; Dabdoud et al. (2009)³; Santana (2010)⁴; Lima et al. (2007)⁵; Salles et al. (2011)⁶; Pighinelli (2007)⁷; Rossi e Santos (2014)⁸; Silva et al. (2011)⁹; Kulkarni e Dalai (2006)¹⁰.

Tabela 5.4 Estimativa de custo da produção de biodiesel de óleos vegetais por catálise enzimática

Óleos vegetais → Variáveis ↓	Soja ³	Mamona ⁴	Babaçu ⁵	Girassol ⁶	Amendoim ⁷	Algodão ⁷ (caroço)	Uva ⁸ (semente)	Palma ⁹	Resíduo de cozinha ¹⁰
Matéria prima R\$/t (média nacional)	2114,20	1570,13	3683,08	2163,06	12477,33	5474,80	7573,33	1800,00	1000,00
Rendimento biodiesel/óleo	0,82	0,76	0,54	0,89	0,89	0,74	0,88	0,90	0,77
Quantidade de etanol	546,51	591,30	400,00	242,89	597,52	364,34	364,34	1093,02	130,00
Custo solvente por t de óleo	879,88	951,99	644,00	391,06	962,01	586,59	586,59	1759,77	209,30
Custo catalisador	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00	2788,00
Processamento t/biodiesel ¹	249,52	249,52	249,52	249,52	249,52	249,52	249,52	249,52	249,52
Processamento t/biodiesel ²	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69	1177,69
Subproduto etanol recuperado	791,90	856,79	579,60	351,95	865,81	527,93	527,93	1583,79	188,37
Subproduto glicerina bruta recuperada	54,88	59,21	83,03	50,85	50,56	60,81	51,14	50,00	58,44
Estimativa para 1 tonelada de biodiesel (R\$)	5419,74	4818,09	7111,20	5429,18	16946,86	9118,48	11459,85	5163,49	4111,12
Estimativa para 1 tonelada de biodiesel (US\$)	1734,32	1541,79	2275,58	1737,34	5423,00	2917,91	3667,15	1652,32	1315,56
Valor médio biodiesel (R\$/litro)	5,42	4,82	7,11	5,43	16,95	9,12	11,46	5,16	4,11
Valor médio biodiesel (US\$/litro)	1,73	1,54	2,28	1,74	5,42	2,92	3,67	1,65	1,32
Relação c/ via química	1,96	2,23	1,60	1,96	1,19	1,41	1,30	2,06	2,83

*Fontes: Santos (2008)¹; Sotoft et al. (2010)²; Dabdoud et al. (2009)³; Santana (2010)⁴; Lima et al. (2007)⁵; Salles et al. (2011)⁶; Pighinelli (2007)⁷; Rossi e Santos (2014)⁸; Silva et al. (2011)⁹; Kulkarni e Dalai (2006)¹⁰.



Em relação ao valor considerado para os subprodutos do processamento de biodiesel, considera-se que os valores obtidos pela recuperação de glicerina representaram 0,1% de redução no valor do biodiesel de amendoim por catálise enzimática e até 4% de redução no valor final do biodiesel de resíduos de óleo de cozinha. Dessa forma, quanto menor o valor final do biodiesel obtido, maior a necessidade e relevância da recuperação dos seus resíduos, visando manutenção e sustentabilidade financeira do processo de produção. Sotoft et al. (2010) demonstraram um elevado gasto com energia para o processo de recuperação da glicerina e sugerem que mais estudos sobre o custo/benefício da recuperação desse subproduto são necessários para a verificação de seu impacto no preço final do biodiesel. A recuperação de solventes representou reduções consideráveis no valor final do biodiesel, principalmente para matrizes que necessitam de elevada razão molar para atingir elevadas taxas de rendimento. A recuperação do solvente correspondeu a cerca de 25% do valor final do biodiesel de soja por catálise química e 15% do obtido por via enzimática. No caso do biodiesel de palma, esses valores corresponderam a 53% no obtido por álcalis e 31% por enzimas, evidenciando a necessidade da recuperação de solventes para a viabilidade do processo produtivo de biodiesel (Tabelas 5.3 e 5.4).

Apesar do biodiesel de caroço de algodão e semente de uva não serem, inicialmente, considerados financeiramente viáveis neste estudo, é interessante observar que são resíduos e, dessa forma, seu uso para a produção de biodiesel agregam sustentabilidade ao processo. Além disso, a produção de biodiesel por essas matrizes poderia ser inserida em outros processos de aproveitamento de resíduos em conceitos de biorrefinarias.

Outra matriz considerada resíduo estudada como matéria-prima para a produção de biodiesel foi o óleo de cozinha, sendo o biodiesel deste o mais barato, cerca de R\$ 1,47 via catálise química e R\$ 4,11 via catálise enzimática (Tabelas 5.3 e 5.4). Esses dados corroboram com estudos de Wang et al. (2017) e Christoff (2006) de que esses óleos constituem boa matéria-prima para produção de biodiesel, entretanto, há gastos consideráveis com coleta e transporte que são difíceis de serem contabilizados devido à elevada variação. No presente trabalho considerou o valor estimado pela instituição Biodiesel BR (2017) para a coleta e transporte, ou seja, R\$ 1,00 / litro de resíduo. Além disso, é interessante ressaltar que estudos sobre a implantação de unidades



processadoras de biodiesel a partir de resíduos de óleo de cozinha têm mostrado que sua viabilidade depende de sistemas eficientes de coleta e armazenamento; e o valor final do biodiesel é proporcionalmente diminuído quanto maior for a capacidade da planta processadora, requerendo assim um elevado volume de matéria prima. Rodrigues (2011), por exemplo, considerou inviável a implantação de produção de biodiesel, a partir de resíduos de óleo de cozinha, na cidade de Campo de Goyatacazes – RJ, pelo fato do volume de resíduo gerado ser inferior ao necessário para alimentar a planta processadora. Opostamente, Castellani (2008) considerou viável a implantação na cidade de Santa Maria – RS, devido ao sistema de coleta eficiente que permitiu que o volume de resíduo de óleo necessário para alimentar a planta processadora de biodiesel fosse atingido.

A produção de biodiesel brasileira é gerenciada pelo Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) e consideram aspectos socioeconômicos que visam minimizar as questões ambientais, econômicas e sociais inseridas na cadeia produtiva de biodiesel no país. Contemplam ainda, a concessão de subsídios tributários ao biodiesel produzido a partir de matérias-primas oriundas de agricultura familiar ou de espécies que exploram a biodiversidade brasileira (SILVA et al., 2014). O biodiesel de babaçu é um exemplo claro dessas premissas, pois apesar de não ter se mostrado viável financeiramente no presente estudo está incluído nos programas governamentais brasileiros de incentivo à agricultura familiar. Além disso, o biodiesel de mamona e palma produzido nas regiões norte e nordeste, também têm sido incorporados na política de agricultura familiar recebendo o selo de combustível social.

Comparando-se as estimativas do processamento de biodiesel via catálise enzimática e química, nota-se que a primeira corresponde de 1,19 a 2,83 vezes os valores obtidos na segunda (Tabela 5.4). Essa diferença deve-se ao elevado custo das enzimas comerciais disponíveis. Esses resultados corroboram aos obtidos por Sotoft et al. (2010), no qual os custos com enzimas totalizaram cerca de 50% dos custos com matérias primas. Dessa forma, conclui-se que os valores das lipases comerciais atuais inviabilizam o processo de produção enzimática de biodiesel; no entanto, enfatizam a necessidade de estudos sobre a obtenção de lipases a baixo custo, como a de lipases obtidas de resíduos de laranja.

5.3.5 Discussão geral



O cenário atual brasileiro de produção de biodiesel ainda é composto majoritariamente por óleo de soja convertido por catálise química, correspondendo a cerca de 75% do biodiesel brasileiro, sendo que, aproximadamente 83% da produção dessa oleaginosa concentra-se nas regiões sul e centro-oeste (SOUZA et al., 2015). Porém, observa-se que a produção de biodiesel cresceu substancialmente desde a implementação do PNPB, chegando a cerca de 3,5 bilhões de toneladas em 2016. Além disso, diferentes oleaginosas e biocatalisadores vêm se destacando como possíveis substitutos ao sistema dominante (óleo de soja convertido por catálise alcalina), com destaque para as provenientes de agricultura familiar em regiões menos exploradas, as quais têm recebido incentivos tributários (MATTEI, 2007). Outro fator impactante é o aproveitamento de resíduos, tanto em relação à comercialização dos resíduos gerados na extração de óleo, bem como pela utilização de resíduos de outras indústrias como fonte de óleo e biocatalisadores, devido ao aumento da rentabilidade e sustentabilidade (SHAH et al., 2018).

Entre os fatores que mais contribuíram para elevar o valor final do biodiesel, além do custo da matéria prima, é a quantidade de solvente utilizado, já que, em sua maioria, os processos químicos necessitam de elevada razão molar (álcool:óleo) para obter rendimentos satisfatórios, já que a produção de biodiesel utiliza majoritariamente o metanol como solvente. Neste contexto, o Brasil se destaca por sua expressiva produção de bioetanol, o que pode representar menores gastos com logística, uma vez que grande parte do metanol utilizado no país é importado. Além disso, o etanol é obtido de fontes vegetais, portanto renováveis, enquanto, o metanol possui origem mineral (USDA, 2016). Assim, o emprego do etanol na produção de biodiesel gera um biocombustível totalmente obtido de fontes renováveis (SOUZA et al., 2016).

Outro ponto apresentado no presente estudo é produção de biodiesel por catálise enzimática, cujo principal entrave é o elevado custo das lipases comerciais, o que foi corroborado no presente estudo de estimativa de custo. Entretanto, é possível utilizar lipases obtidas de resíduos para modificar óleos, seja de maneira direta como demonstrado neste estudo para lipases obtidas de resíduos de laranja e de resíduos de palma como descrito por Ebongue et al. (2006); bem como, de maneira indireta, pelo uso dos resíduos da extração de óleo como substrato para a produção de lipases por processos fermentativos, como descrito por Aguiéiras et al. (2017) que utilizou

Rhizomucor miehei em torta de babaçu; Selvakumar e Sivashanmugan (2017) que utilizou diferentes micro-organismos em resíduos de romã, laranja e abacaxi; Abdelmoez et al. (2013) sobre Candida rugosa ATCC 14830 em resíduos de girassol; Amara e Salem (2013) que utilizou Pseudomonas aeruginosa em torta de mamona; e Neethu et al. (2015) sobre Stenotrophomonas maltophilia em resíduos de amendoim, coco, arroz, neem e trigo.

Assim sendo, pondera-se que lipases home-made obtidas de resíduos poderiam ser utilizadas na produção de biodiesel, o que poderia reduzir significativamente o custo com os biocatalisadores. Nesse sentido, o uso dos resíduos gerados na etapa de extração de óleo para a obtenção direta ou indireta de lipases mostra-se uma solução potencial para a viabilização da catálise enzimática. Assim sendo, os custos com o biocatalisador seriam reduzidos, bem como contribuiria para tornar o processo mais sustentável devido à utilização dos resíduos gerados na extração do óleo e diminuição de resíduos gerados na conversão do óleo em biodiesel, inerentes ao processo enzimático em detrimento do químico.

Dessa forma, a Figura 5.4 apresenta o resumo dos resultados apresentados no presente estudo, na qual estão descritas as matérias-primas mais promissoras para cada região e as vantagens associadas ao processo.

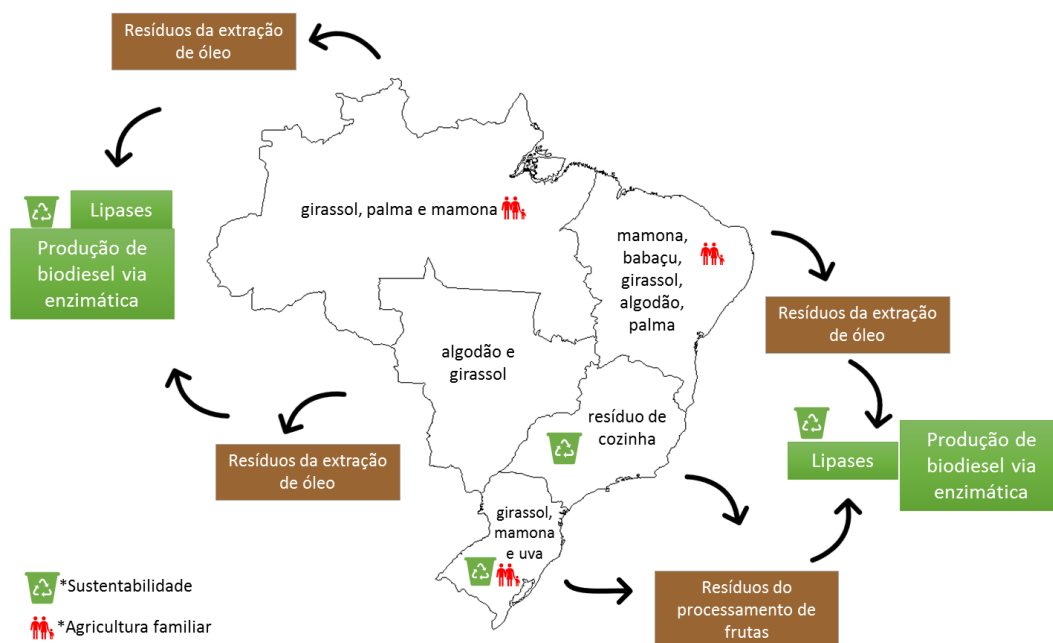


Figura 5.4 Oleaginosas alternativas para produção de biodiesel nas diferentes regiões do Brasil



Assim, as culturas de mamona, palma e girassol possuem maior potencial nas regiões norte e nordeste do país; já que os valores finais por litro de biodiesel produzido ficaram próximos ao de biodiesel de soja; e nessas regiões, essas culturas, assim como o babaçu, podem ser incluídas no programa do selo de combustível social emitido pelo PNPB. Esse programa possui como objetivos garantir inserção da agricultura familiar no mercado de combustíveis do país, promovendo a inclusão social e o desenvolvimento regional. Assim grupos de agricultores familiares foram organizados em projetos pólos em cada região produtora com o intuito de estruturar e padronizar a produção. Neste contexto, a região nordeste foi a que apresentou o maior número de polos, totalizando 32 abrangendo 462 municípios em 2010 (PNPB, 2011).

A região sudeste possui a maior densidade demográfica, concentrando cerca de 42% da população brasileira, sendo que corresponde a aproximadamente 11% da extensão territorial do país. Dessa forma, essa região concentra grande parte das indústrias e grandes centros urbanos (IBGE, 2016). Por isso, entre as matérias-primas analisadas o resíduo de óleo de cozinha possui elevado potencial, já que nessa região o grande volume de resíduo gerado é compatível com o requerido para alimentar as plantas industriais com elevada capacidade de processamento. O aproveitamento de resíduos de óleo de cozinha contribui para o aumento da sustentabilidade devido ao reaproveitamento de um resíduo com elevado risco biológico devido à sua toxidez e capacidade de causar danos ambientais.

As regiões sul e centro-oeste destacam-se pela elevada produção de grãos, sendo grandes produtores de soja. Porém, apesar de financeiramente a soja ser a matéria-prima mais favorável, possui desvantagens para a produção de biodiesel por ser uma *commodity* alimentícia (CASTANHEIRA et al., 2014). Além disso, a região possui forte presença de agricultura familiar estruturada em cooperativas, já que 325 municípios foram concentrados em apenas 8 polos, ou seja, cerca de 40 municípios por polo em comparação com 14 municípios por polo para a região nordeste (PNPB, 2011). Essa situação significa elevada representatividade no projeto vinculado ao selo de combustível social do PNPB.

A região norte possui a maior produção de óleo de palma (dendê) do país, entretanto, o avanço da produção de biodiesel de palma ainda é restrito. Diferentemente das outras regiões, nessa o sistema extrativista é frequente, no qual, além da agricultura



familiar outras práticas estão vinculadas, como pesca e coletas de outros itens da floresta nativa, acabando por dificultar a implementação dos projetos propostos pelo PNPB (CENTRO DE MONITORAMENTO DE AGROCOMBUSTÍVEIS, 2010).

Conclui-se, portanto, que no país o biodiesel é majoritariamente de óleo de soja convertido por catálise química. Entretanto, há incentivos à diversificação tanto da matéria-prima oleaginosa quanto ao uso de biocatalisadores. O uso de resíduos atrelado ao desenvolvimento das culturas alternativas de maior potencial para cada região do país pode auxiliar a viabilizar a produção enzimática utilizando fontes oleaginosas alternativas como substrato reacional. No entanto, para que isso ocorra é necessário que as políticas de incentivo à diversificação, inclusão social e o desenvolvimento regional sejam continuadas e expandidas.

5.4 Conclusão

Conclui-se que a produção de biodiesel por catálise enzimática é viável do ponto de vista reacional, afinal elevadas taxas de rendimento podem ser obtidas, entretanto, o elevado custo das enzimas comerciais tornam o valor final do biodiesel impraticável até o presente momento; sendo que o uso de resíduos para a obtenção direta e indireta de lipase pode auxiliar na redução de custos. Já em relação à catálise química, a produção de biodiesel de soja, mamona, girassol, palma e resíduo de óleo de cozinha pode ser realizada nas condições reacionais descritas a valores compatíveis com os valores estabelecidos pela ANP, sendo que os fatores de maior influência no preço final do biodiesel são o valor das matérias-primas agrícolas, a razão molar entre óleo e solvente e a recuperação de subprodutos.

5.5 Agradecimentos

À UNESP (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / Processos 2014/10962-7 e 2015/01753-8), CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).



5.6 Referências bibliográficas

- Antolín G.; Tinaut F.V.; Briceno Y.; Castano V.; Pérez C.; Ramírez A. I. (2002) Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology*, 83(2): 111-114.
- Berchmans H.J.; Hirata S. (2008) Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology*, 99(6): 1716-1721.
- Castellanelli C.A. (2008) Estudo da viabilidade de produção de biodiesel, obtido através do óleo de fritura usado, na cidade de Santa Maria – RS. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em engenharia de produção da Universidade Federal de Santa Maria – RS.
- Centro de monitoramento de agrocombustíveis (2010) A agricultura familiar e o programa nacional de biodiesel: retrato do presente, perspectivas de futuro. Disponível em: http://reporterbrasil.org.br/documentos/AgriculturaFamiliar_Biodiesel2010.pdf. Acessado em Agosto de 2017.
- CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento (2016) Dendeicultura na Bahia. Disponível em: www.conab.org.br
- CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento (2015) Produção de soja safra 2014/2015. Disponível em: www.conab.org.br
- CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento (2016) Produção de algodão safra 2015/2016. Disponível em: www.conab.org.br
- CONAB – Companhia Nacional do Abastecimento (2016) Produção de óleos vegetais. Disponível em: www.conab.org.br
- Christoff P. (2006) Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial – estudo de caso: Guaratuba litoral paranaense. Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento. LATEC – Instituto de Engenharia do Paraná.



- Davis J.P.; Geller D.; Faircloth W.H.; Sanders T. H. (2009) Comparisons of biodiesel produced from unrefined oils of different peanut cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(4): 353–361.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2016) Embrapa uva e vinho. Processamento de uva no Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/publicacoes>
- Elseikh Y.a.; Man Z.; Bustam M.A.; Yusup S.; Wilfred C.D. (2011) Brønsted imidazolium ionic liquids: Synthesis and comparison of their catalytic activities as pre-catalyst for biodiesel production through two stage process. *Energy Conversion and Management*, 52(2): 804-809
- Ferrari R.A.; Oliveira V.S.; Scabio A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, 28(1): 19-23.
- Fleuri L. F.; Cassani M.; Arcuri M.; Capoville B. L.; Pereira M. S.; Delgado C. O.; Novelli P. K. (2014a) 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*, 1:1-15.
- Fleuri L. F.; Novelli P. K.; Delgado C. O.; Pivetta M. R.; Pereira M. S.; Arcuri M.; Capoville B. L. (2014b) Biochemical characterization and application of lipases produced by *Aspergillus* sp. on solid-state fermentation using three substrates. *International Journal of Food Science & Technology* (Print), 1:1-18.
- Hartman L; Lago R. C. A. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Laboratory Practice*, London, 22:3:475-47.
- Kulkarni M.G.; Dalai A.K. (2006) Waste cooking oil an economical source for biodiesel: a review. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45(9): 2901–2913.
- Kumar S.; Mathur A.; Singh V.; Nandy S.; Kumar K.; Negi S. (2012) Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*, 120:300–304.



- Lima J.R.O.; Silva R.B.; Silva C.C.M.; Santos L.S.S.; Moura E.M.J.; Moura C.V.R. (2007) Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Química Nova*, 30(3): 600-603.
- Mankiw N.G. (2014) *Introdução à economia - tradução da 6ª edição norte-americana*. Thomson Learning Ltda. São Paulo, Brasil.
- Macedo G. A.; Pastore G. M.; Park Y. K. (1997) Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista Brasileira de Microbiologia*, 28:90.
- Novozymes (2013) *Enzymes at work*. Disponível em: www.novozymes.com/en/about-us/brochures/documents/enzymes_at_work.pdf, acessado em Setembro de 2013.
- Nwobi B. E.; Ofoegbu O.; Adesina O. B. (2006) Extraction and qualitative Assessment of african sweet orange seed oil. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.*, 6:1–11.
- Okino-Delgado C. H.; Fleuri L. F. (2014) Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing. *Food Chemistry*, 163:1-19.
- O'Fallon, J.V., Busboom, J.R., Nelson, M.L., Gaskins, C.T., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 85, 1511–1521.
- O'Shea N.; Arendt E. K.; Gallagher E. (2012) 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* 16:1–10.
- Pighinelli A.L.M. (2007) *Extração mecânica de óleos de amendoim e de girassol para produção de biodiesel via catálise básica*. Dissertação apresentada a Faculdade Agrícola da Universidade Estadual de Campinas.
- Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (2011) *Inclusão social e desenvolvimento territorial*. Disponível em: http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/Biodiesel_Book_final_Low_Completo.pdf. Acessado em Agosto de 2017.



- Rossi E.; Santos K. G. (2014) Grape seed oil for biodiesel production. *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM, Santa Maria*, 14(2): 3139–3145.
- RDC Nº 482, Resolução de 23 de setembro de 1999, Publicada em DOU nº 196-E, de 13 de outubro de 1999, Republicada em DOU nº 118-E, de 20 de junho de 2000 e Revogada pela Resolução – RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005.
- Sangaletti N. (2012) Alcoólise química e enzimática de miscela etanólica de óleo de soja. Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade do Estado de São Paulo.
- Santana G.C.S.; Martins P.F.; Silva N.L.; Batistella C.B.; Maciel R.M.F.; Maciel M.R.W. (2010) Simulation and cost estimate for biodiesel production using castor oil. *Chemical Engineering Research and Design*, 88(5–6): 626–632.
- Santos C. (2008) Biodiesel: uma análise de custos de produção. Monografia submetida ao Departamento de Ciências Econômicas da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Selvakumar P.; Sivashnmugam P. (2017) Optimization of lipase production from organic solid waste by anaerobic digestion and its application in biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, 165: 1–8.
- Sotoft L.F.; Rong B.G.; Christensen K.V.; Norddahal B. (2010) Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant. *Bioresource Technology*, 101: 5266–5274.
- Soares D.; Pinto A.F.; Gonçalves G.; Mitchell D.A.; Krieger N. (2013) Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, XX.
- Souza S.P.; Pacca S.; Ávila M.T.; Borges J.L. (2010) Greenhouse gas emissions and energy balance of palm oil biofuel. *Renewable Energy*, 35: 2552-2561.
- Silva G.S.; Inoue D.Y.; Dors G.; Furigo A.J.; Castro H.F. (2011) Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. *Acta Scientiarum. Technology*, 33(2): 197-203.



- Su E.; Wei D. (2008) Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerol for biodiesel production using a solvent engineering method. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 55:3-4:118-125.
- Talukder M. M. R.; Tamalampudy S.; Li C. J.; Le Y. L.; Wu J. C.; Kondo A. (2007) An improved method of lipase preparation incorporating both solvent treatment and immobilization onto matrix. *Biochem Eng*, 33:60–65.
- Woiciechowski A. L.; Carvalho J. C.; Spier M. R.; Habu S.; Yamaguishi C. T.; Ghiggi V.; Soccol C. R. (2013) Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares capítulo de *Biotecnologia de alimentos*, coleção *Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição*, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, 12:143:172.
- Yan J.; Yan Y.; Liu S.; Hu J.; Wang, G. (2011) Preparation of cross-linked lipasecoated micro-crystals for biodiesel production from waste cooking oil. *Bioresour. Technol.* 102:4755–4758.



CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou que as diferentes frações de resíduos do processamento de laranja, de diferentes variedades, podem ser utilizadas como fontes diretas de lipases. Assim, as lipases de laranja que apresentam alta atividade e características bioquímicas diversas e que podem ser obtidas por métodos simples, de baixo custo e de fontes abundantes como os resíduos agroindustriais, são alternativas às custosas lipases comerciais.

Há diferenças de rendimento de suco/resíduo entre as diferentes variedades de laranja e que as frações de resíduos são geradas em diferentes proporções. Porém apesar das diferenças, os resíduos do processamento de laranja, em geral, podem ser utilizados como fontes diretas de lipases; o que, atrelado à expressividade da cadeia produtiva de suco de laranja, evidenciou o potencial do uso desses resíduos como matéria-prima de produtos biotecnológicos.

As lipases de laranja possuem efeito sinérgico com lipases fúngicas, pois os extratos combinados apresentaram aumento na atividade catalítica em diferentes condições reacionais; evidenciando que tanto os extratos combinados como isolados, livres ou imobilizados por adsorção possuem potencial para aplicação em reações de hidrólise de glicerídeos de diferentes tamanhos de cadeia.

As lipases possuem tamanho variando de 10 a 250 kDa e podem ser concentradas por precipitação com sais e que, assim como como lipases comerciais, podem ser utilizadas na modificação de óleo de soja e seu resíduo. As lipases de laranja foram ainda capazes de diminuir a citotoxicidez do resíduo de óleo de cozinha e, por isso, conclui-se que essas enzimas podem ser utilizadas na biorremediação de resíduos de óleo de cozinha.

A lipase é um dos subprodutos que podem ser obtidos dos resíduos gerados no processamento de laranja das principais variedades de laranja utilizadas no Brasil. A obtenção de lipases poderia ser inserida no processo já instalado, em conjunto com a obtenção de outros subprodutos dentro do conceito de biorrefinaria da laranja, na qual uma fruta daria origem a diferentes produtos tornando o processamento mais sustentável e rentável.



O biodiesel dos óleos de mamona, soja, girassol, palma e resíduos de óleo de cozinha pode ser produzido por catálise química com custos compatíveis com os preços praticados no Brasil, sendo que os principais fatores no preço final são o valor das matérias-primas agrícolas, a razão molar entre óleo e solvente e a recuperação de subprodutos.

A produção de biodiesel por catálise enzimática é viável do ponto de vista reacional, afinal elevadas taxas de rendimento podem ser obtidas utilizando diferentes óleos vegetais e diferentes lipases, entretanto, o elevado custo das enzimas comerciais torna o valor final do biodiesel impraticável até o presente momento, abrindo caminho para a busca de lipases de baixo custo e versáteis quanto às reações que podem catalisar. Para os cálculos da estimativa de custos foram considerados apenas valores referentes aos custos de produção, sendo que não foram quantificados os valores referentes aos benefícios agregados por fatores de impacto à sociedade, como o aumento da sustentabilidade pelo uso da catálise enzimática e incentivo à agricultura familiar pelo uso de matérias-primas que se enquadram neste perfil. Pondera-se, portanto, que a inclusão desses valores poderia modificar as conclusões deste estudo e, por isso, considera-se que estudos de viabilidade econômica que analisem tanto os fatores inerentes do processo industrial como os impactos desses à sociedade são necessários para a análise da produção de biodiesel.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram o elevado potencial que os resíduos de laranja possuem para obtenção de lipases, as quais poderiam ser aplicadas na modificação de glicerídeos em diversas áreas. Para que este estudo científico seja transformado em realidade comercial considera-se que são necessárias parcerias com as indústrias processadoras de laranja e produtoras de enzimas, para que os processos de obtenção e concentração sejam amplificados e ajustados às condições industriais. Além disso, consideram-se relevantes que análises econômicas e mercadológicas sobre a obtenção de lipases de diferentes fontes sejam realizadas, para que os fatores responsáveis pelos elevados custos dessas enzimas sejam evidenciados e minimizados, assim como, os benefícios inerentes ao processo enzimático sejam quantificados e integrados aos dados financeiros, culminando em análises de custo que permitam analisar a viabilidade reacional e econômica do uso de lipases para cada aplicação.



ANEXO I

Recibo de depósito de patente

29/07/2015 860150162349 11:04 NPWB 0000221503815026	 BR 10 2015 018088 8	
Protocolo	Número	Código QR

	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Diretoria de Patentes Sistema e-Patentes/Depósito
--	---

DIRPA	Tipo de Documento: Recibo de Peticionamento Eletrônico	DIRPA	Página: 1 / 2
Título do Documento: Recibo DIRPA-FQ001 - Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição		Código: RECIBO	Versão: 01
		Modo: Produção	

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial informa:
Este é um documento acusando o recebimento de sua petição conforme especificado abaixo:

Dados do INPI:	
Número de processo:	BR 10 2015 018088 8
Número da GRU principal:	00.000.2.2.15.0381502.6 (serviço 200)
Número do protocolo:	860150162349
Data do protocolo:	29 de Julho de 2015, 11:04 (BRT)
Número de referência do envio:	124539

Dados do requerente ou interessado:	
Tipo de formulário enviado:	DIRPA-FQ001 v.006
Referência interna:	15AUI025
Primeiro requerente ou interessado:	Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
CNPJ do primeiro requerente ou interessado:	48.031.918/0001-24
Número de requerentes ou interessados:	1
Título do pedido:	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO CONCENTRADO DE LIPASE