



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais

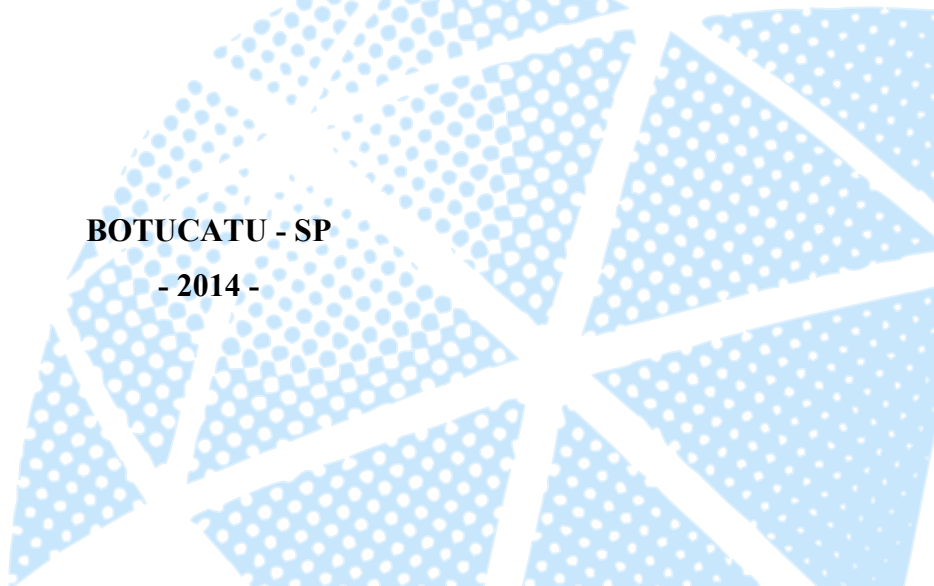
Utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco

CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

BOTUCATU - SP

- 2014 -





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Obtenção, caracterização e aplicação de lipases vegetais

Utilizando subprodutos do processamento de laranja e manga para suco

CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO

Prof^a Dr^a LUCIANA FRANCISCO FLEURI

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica).

BOTUCATU - SP

- 2014 -



Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de pesquisa e a Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe) da UNESP pelo auxílio financeiro para participação em eventos;

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Botânica e ao Departamento de Química e Bioquímica pelo suporte técnico e estrutural;

À minha orientadora professora doutora Luciana Francisco Fleuri, por todo apoio, dedicação, incentivo, respeito e amizade;

Aos meus amigos por fazerem minha vida mais leve e divertida;

À minha família por serem minha base, exemplo e inspiração.



Sumário

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	2
1 Introdução	3
2 Referências bibliográficas.....	4

CAPÍTULO 01: SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS VEGETAIS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS - REVISÃO

Resumo.....	5
1 Revisão bibliográfica.....	6
1.1 Resíduos e subprodutos agroindustriais como fonte de biomoléculas.....	6
1.2 Produtos e subprodutos da Laranja.....	9
1.3 Produtos e subprodutos de manga.....	13
1.4 Lipase.....	17
1.5 Aplicação de lipases.....	20
1.5.1 Detergentes e indústria têxtil.....	22
1.5.2 Tratamento de efluentes e biorremediação.....	22
1.5.3 Papel e celulose.....	23
1.5.4 Química fina.....	23
1.5.5 Alimentos.....	24
1.5.6 Transformação de óleos.....	25



1.5.7	Biodiesel.....	26
2	Conclusão.....	26
3	Referências bibliográficas.....	27

CAPÍTULO 02: DETERMINAÇÃO DE LIPASES EM MATRIZES VEGETAIS E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LIPASES

	Resumo	34
	Abstract	34
1	Introdução.....	35
2	Material e métodos.....	35
2.1	Material.....	35
2.2	Preparação do extrato enzimático para análise das matrizes vegetais.....	36
2.3	Preparação do extrato enzimático para análise de estabilidade do bagaço de laranja.....	36
2.4	Atividade da enzima.....	37
3	Resultados e discussão.....	37
3.1	Matrizes vegetais.....	37
3.2	Estabilidade de lipases de bagaço de laranja.....	39
4	Conclusão.....	39
5	Referências bibliográficas.....	39

CAPÍTULO 3: OBTENÇÃO DE LIPASES DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA



Resumo	41
Abstract.....	41
1 Introdução	42
2 Material e métodos.....	43
2.1 Material.....	43
2.2 Preparação do extrato enzimático.....	43
2.3 Atividade da enzima	43
2.4 Influência do pH.....	44
2.5 Influência da temperatura.....	44
2.6 Influência de sais.....	44
2.7 Estudo de especificidade.....	45
3 Resultados e discussão.....	45
4 Conclusão	54
5 Agradecimentos.....	54
6 Referências bibliográficas.....	54

CAPÍTULO 04: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS DE POLPA, CASCA E SEMENTE DE MANGA

Resumo	56
Abstract	56
1 Introdução.....	57
2 Material e métodos.....	58



2.1	Material.....	58
2.2	Preparação do extrato enzimático.....	58
2.3	Atividade da enzima.....	58
2.4	Influência do pH.....	59
2.5	Influência da temperatura.....	59
2.6	Influência de sais.....	59
2.7	Estudo de especificidade.....	60
3	Resultados e discussão.....	60
4	Conclusão.....	69
5	Agradecimentos.....	69
6	Referências bibliográficas.....	69

CAPÍTULO 05: APLICAÇÃO DE LIPASES VEGETAIS EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE, ALCOÓLISE E ESTERIFICAÇÃO

	Resumo	71
	Abstract	71
1	Introdução.....	72
2	Material e métodos.....	73
2.1	Material.....	73
2.2	Reações de hidrólise.....	74
2.3	Reações de esterificação.....	74
2.4	Reações de alcoólise.....	75



3	Resultados e discussão.....	76
4	Conclusão.....	88
5	Referências bibliográficas.....	8



Índice das Ilustrações

Índice das Figuras

CAPÍTULO 01

Figura 1. Sistema de extração de suco cítrico da empresa J. B. T. Food Tech.....11

Figura 2. Comparação entre as partes anatômicas da laranja e as denominações industriais dos subprodutos da laranja.....12

Figura 3. Comparação entre as partes anatômicas da manga e as denominações industriais dos subprodutos da manga.....16

CAPÍTULO 02

Figura 1. Atividade de lipase das matrizes vegetais38

CAPÍTULO 03

Figura 1. Estudo de pH ótimo para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - *frit*)..... 49

Figura 2. Estudo de pH de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - *frit*) 50

Figura 3. Estudo de temperatura ótima para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - *frit*) 51

Figura 4. Estudo de temperatura de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - *frit*) 52

Figura 5. Estudo de influência de sais na atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - *frit*) 53

CAPÍTULO 04

Figura 1. Estudo de pH ótimo para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A - casca, B – polpa e C - semente)64



Figura 2. Estudo de pH de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A - casca, B – polpa e C - semente)	65
Figura 3. Estudo de temperatura ótima para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A - casca, B – polpa e C - semente)	66
Figura 4. Estudo de temperatura de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A - casca, B – polpa e C – semente)	65
Figura 5. Estudo de influência de sais na atividade de lipase (extratos enzimáticos: A - casca, B – polpa e C – semente).....	66
CAPÍTULO 05	
Figura 1. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de casca de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	78
Figura 2. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de bagaço de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	79
Figura 3. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de <i>frit</i> de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	80
Figura 4. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de casca de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	81
Figura 5. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de polpa de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	82
Figura 6. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de semente de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho).....	83
Figura 7. Esterificação de ácido oleico por extratos enzimáticos de laranja (A – casca, B – bagaço e C – <i>frit</i>).....	84
Figura 8. Esterificação de ácido oleico por extratos enzimáticos de manga (A – casca, B – polpa e C – semente).....	85



Figura 9. Produção de biodiesel, substratos óleo de milho e etanol (PM - polpa de manga, CM - casca de manga).....86

Figura 10. Produção de biodiesel, substratos óleo de soja e etanol (PM - polpa de manga, SM - semente de manga, FL - *frit* de laranja).....87

Índice das Tabelas

CAPÍTULO 01

Tabela 1. Aplicação de lipases.....21

CAPÍTULO 02

Tabela 1. Matrizes utilizadas nos pré-testes para detecção de atividade lipolítica.....36

Tabela 2. Estabilidade da atividade de lipase de bagaço de laranja.....39

CAPÍTULO 03

Tabela 1. Atividade de lipase em emulsão de goma arábica e *p*-NP-ésteres48

CAPÍTULO 04

Tabela 1. Atividade de lipase em emulsão de goma arábica e *p*-NP-ésteres63



Resumo

O presente estudo está dividido em cinco capítulos, o primeiro apresenta uma revisão bibliográfica sobre o uso de subprodutos agroindustriais vegetais como fonte de compostos bioativos e aplicações industriais de lipases. Os capítulos seguintes descrevem o estudo de matrizes vegetais para obtenção de lipases, bem como a aplicação das lipases mais promissoras em reações de hidrólise e síntese. As matrizes de laranja e manga foram as que apresentaram maior potencial, pois além da elevada atividade lipolítica são abundantes e possuem processos de produção e processamento bem estabelecidos. Pela primeira vez, foi constatada a presença de lipases em três subprodutos do processamento de suco de laranja denominadas casca, bagaço e *frit* e em três partes de manga denominadas casca, polpa e semente, as quais, apresentaram atividade em ampla faixa de pH desde o neutro (6-7) ao alcalino, elevada termoestabilidade e atividade em diferentes *p*-NP-ésteres, apresentando atividade de até 77,7 U/g para o extrato enzimático bruto do subproduto denominado *frit* de laranja e de 170 U/g para o extrato bruto de casca de manga. Todas as matrizes de laranja e de manga foram capazes de catalisar as reações de hidrólise e esterificação, sendo observado taxa de 58,5% de esterificação de ácido oleico para uma lipase obtida de manga. Cinco matrizes foram capazes de catalisar reações de alcoólise, sendo elas casca e polpa de manga em óleo de milho, polpa e semente de manga em óleo de soja e *frit* de laranja em óleo de soja.



Abstract

This study is divided into five chapters, the first presents a literature review on the use of agroindustrial byproducts plant as a source of bioactive compounds and industrial applications of lipases. The following chapters describe the study of vegetable matrices for obtaining lipases, as well as the most promising application of lipases for the hydrolysis and synthesis. The lipases of orange and mango showed the greatest potential, because besides the high lipase activity are abundant and have production processes and well established processing. For the first time, the presence of lipase was determined in byproducts of processing of orange juice called peel, core and *frit* and three parts of manga called peel, pulp and seed, which showed activity in a wide pH range from neutral (6-7) to alkaline thermostability and activity at different *p*-NP- esters. Having activity of up to 77.7 U/g for the raw byproduct enzyme extract called *frit* orange and 170 U/g for the raw enzyme extract from peel of mango. All arrays of orange and mango were able to catalyze the reactions of hydrolysis and esterification, observed the rate of 58.5% on the esterification of oleic acid by lipase obtained from mango. Five matrices were able to catalyze the alcoholysis reactions, peel and pulp mango in corn oil, mango seed and pulp in soybean oil and orange *frit* in soybean oil.



Introdução

A Revolução industrial, a qual, ocorreu entre os séculos XVII e XVIII é considerada o marco para a cultura contemporânea devido ao seu impacto nas relações do homem com o trabalho e meio ambiente, sendo a área de produção de alimentos uma das que mais sofreram transformações. As inovações tecnológicas oferecidas proporcionaram maior velocidade de transformação das matérias primas adaptando antigas técnicas artesanais ao sistema industrial, impulsionando os avanços nesse setor, pois, com aumento da produção industrial foi gerado maior capital, o qual estimulou o êxodo rural. Com aumento da oferta de mão de obra urbana e maior capital as indústrias puderam crescer para, entre outros, suprir a demanda por alimentos processados que cresceu proporcionalmente à expansão da população urbana. Devido à concentração da população na área urbana e aumento da carga horária de trabalho nas indústrias os alimentos passaram a ser transportados à distâncias cada vez maiores e as pessoas passaram a ter menos tempo para o preparo de refeições, fazendo com que os alimentos processados aumentassem gradativamente sua durabilidade e praticidade (Koblitz, 2011; Hernández, 2005).

Entretanto, o aumento da produção de alimentos industrializados apresentou crescimento exponencial trazendo como problema a expressiva geração de resíduos. Mundialmente são produzidos, processados e consumidos bilhões de toneladas de vegetais e como consequência também são gerados bilhões de toneladas de resíduos. Atualmente, esse problema têm se tornado atrativo, já que os resíduos vegetais podem ser utilizados como matérias primas para inúmeras finalidades, como na área de bioprospecção de moléculas ativas, entre as quais se destacam as enzimas como as lipases (Woiciechowski et al., 2013).

As lipases, triacilglicerol acilhidrolases (E. C. 3.1.1.3), podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo que a primeira possui vantagens como simplicidade dos métodos de obtenção e disponibilidade de matérias primas. Essas enzimas estão presentes em maior abundância em frutas, grãos e sementes, porém atualmente são pouco utilizadas em escala comercial devido à ausência de matrizes economicamente viáveis. Em condições naturais catalisam a reação de hidrólise, porém, em condições controladas podem catalisar outras reações como a esterificação e transesterificação. Dependendo de suas características bioquímicas, cada lipase, possui maior afinidade pela catálise de determinada reação, dessa forma, o estudo do desempenho dessas em processos catalíticos diferenciados é essencial para a indicação de suas possíveis aplicações (Lopes et al., 2011; Hasan et al., 2006).

A concentração do mercado de enzimas em poucas grandes empresas auxilia a manter o custo das enzimas comerciais elevado o que em muitos casos torna impraticável a aplicação



da catálise em larga escala. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas para obtenção de enzimas *home-made* pode transformar o mercado de biocatalisadores.

O presente trabalho objetivou a obtenção de lipases a baixo custo com características bioquímicas adequadas à sua aplicação em processos industriais. Com o intuito de contextualizar as pesquisas realizadas ao cenário atual de uso de resíduos e enzimas, produzimos a revisão bibliográfica intitulada “Subprodutos agroindustriais vegetais como fonte de biomoléculas”, a qual compõem o capítulo 1. O capítulo 2 descreve os pré-testes realizados com 15 matrizes vegetais provenientes de laranja, manga, lima ácida tahiti, uva, amendoim e maracujá, entre as quais, as matrizes de laranja e manga foram as que apresentaram maior potencial, pois além da elevada atividade lipolítica são abundantes e de baixo custo. Devido à esse potencial essas matrizes foram caracterizadas e testadas, *in vitro*, na catálise das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação com o intuito de verificar a aplicabilidade das matrizes de laranja e manga como fonte de lipases.

Referências bibliográficas

Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235.

Hernández J. C. (2005) Patrimônio e globalização: o caso das culturas alimentares, capítulo de Antropologia e nutrição: um diálogo possível, Fundação Oswaldo Cruz, 129-143, Rio de Janeiro, Brasil.

Koblitz M. G. B. (2011) Matérias-primas alimentícias, composição e controle de qualidade, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.

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.

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.



CAPÍTULO 01: SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS VEGETAIS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS - REVISÃO

Clarissa Hamaio Okino Delgado, Luciana Francisco Fleuri

Trabalho submetido na revista *Journal of the Science of Food and Agriculture* (fator de impacto de 1.759 e qualis B1).

Resumo

Os resíduos agroindustriais de origem vegetal são considerados um problema desde o início dos processos industriais, entretanto vêm se tornando atrativos como matérias primas para inúmeras finalidades, como na área de bioprospecção de moléculas ativas, entre as quais se destacam as enzimas como as lipases. Essa revisão bibliográfica procurou contextualizar esse cenário reunindo definições, informações e estudos relevantes sobre resíduos e subprodutos agroindustriais de laranja e manga, além do mercado internacional de enzimas e aplicações industriais de enzimas lipolíticas.

Palavras chave: resíduos agroindustriais, produção enzimática, biocombustíveis, transformação de óleo, indústria de alimentos

Abstract

The agro-industrial waste plant has been considered a problem since the beginning of the industrial processes, however, currently has becoming attractive as a raw material for numerous purposes such as in the area of bioprospecting of active molecules, among which stand out the enzymes, such as lipases. This review aimed to contextualize this scenario, adding definitions, information and relevant studies on waste and agro-industrial byproducts of orange and mango, the international market and industrial applications of lipolytic enzymes.

Keywords: agro-industrial residues, enzymatic production, biofuel, transformation of oil, food industry



1. Revisão bibliográfica

Resíduos e subprodutos agroindustriais como fonte de biomoléculas

Mundialmente são produzidos, processados e consumidos bilhões de toneladas de vegetais, como consequência também são gerados bilhões de toneladas de resíduos. Nos Estados Unidos cerca de 30% de todos os alimentos produzidos são descartados. Proporcionalmente o Reino Unido e Japão são os países que mais desperdiçam seus alimentos chegando a descartar 40% de sua produção. O Brasil devido à expressiva produção agrícola é também grande gerador de resíduos, sendo que a somatória da produção anual de 2009 das culturas de cana de açúcar, soja, milho, laranja, arroz e mandioca foi de aproximadamente 870 milhões de toneladas de alimentos e cerca de 670 milhões de toneladas de resíduos (EPA, 2013; Woiciechowski et al., 2013; Kosseva, 2009).

Os termos da União Européia (91/156/CEE)(1) Diretriz 91/156/CEE de 18 de março de 1991, definem resíduo como qualquer substância ou objeto de que o respectivo detentor se desfaz ou tem a intenção ou obrigação de se desfazer, considerando resíduo tudo o que não é o produto final (principal) do processo. Dessa forma, mesmo quando determinado processo gera dois produtos o principal é considerado o produto e o outro resíduo. Assim os termos subproduto, coproduto e *byproduct* foram empregados para denominar os produtos secundários do processo (Conselho Comunidade Européia – EU, 1991).

Porém, de todo o resíduo gerado durante processos agroindustriais, apenas pequena parcela é aproveitada como subprodutos, sendo que a grande maioria é considerada sem aplicação viável e é descartada diretamente no meio ambiente ou responsável por grandes gastos com descarte apropriado. Existem exemplos bem sucedidos do uso de subprodutos como biomassa para a produção de energia ou como alimentação animal, o que constitui boa alternativa para o grande volume de resíduos gerados. Geralmente, para esses fins a indústria geradora do resíduo minimiza seus custos, visto que os criadores de animais e empresas de energia arcam com os custos de transporte e em alguns casos, ainda pagam valores pequenos por tonelada de resíduo. Entretanto, esses resíduos podem conter substâncias valiosas como pigmentos, açúcares, ácidos orgânicos, aromas e compostos bioativos como antioxidantes, enzimas, ativos antimicrobianos e fibras e, por isso, poderiam ser aplicados em bioprocessos gerando produtos de maior valor agregado (Martínez et al., 2012).



Bioprocesso pode ser definido como processo de transformação de determinada matéria-prima envolvendo células vivas, como em processos fermentativos utilizando micro-organismos ou parte dessa célula como as enzimas (Woiciechowski et al., 2013).

Enzimas são, geralmente, proteínas que catalisam reações nos seres vivos de forma ordenada e sequencial no metabolismo celular. Estão entre as biomoléculas mais importantes em processos biotecnológicos devido à elevada especificidade e poder catalítico, apresentando inúmeras vantagens, como a ação em condições brandas de temperatura, pH e pressão, elevada velocidade de reação e compatibilidade com diferentes substratos sintéticos (Barros et al., 2010).

A *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) divide as enzimas em seis principais grupos, oxidorreduções (1), transferases (2), hidrolases (3), liases (4), isomerases (5) e ligases (6) nas quais estão inclusas subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada. Nesse sistema cada enzima recebe seu nome recomendado, geralmente formado pelo nome do substrato catalisado e sufixo ase. Cada enzima também recebe seu nome sistemático constituído por 4 dígitos, sendo que cada número descreve a enzima de maneira progressivamente mais detalhada. O primeiro número refere-se à classe, ou tipo de reação geral catalisada. O segundo especifica a sub-classe, o terceiro sub-subclasse e o quarto o substrato. É importante ressaltar que o código se baseia na reação catalisada em condições naturais, já que a enzima que realiza a catálise de determinada reação em seu meio de origem pode catalisar outras reações sob condições controladas (BRENDA, 2013, IUBMB, 2013; Devasena, 2010).

A cada dia são caracterizadas novas enzimas de acordo com as regras da *Enzyme Commission* (E. C. number), sendo que até 2013 cerca de 6200 enzimas foram cadastradas em sistemas de banco de dados como o BRENDA e IUBMB.

As enzimas podem ser obtidas de animais, plantas e micro-organismos. Nos animais, geralmente, estão concentradas, principalmente em glândulas e órgãos excretórios como pâncreas. Para obtenção de enzimas pelo uso de micro-organismos são utilizados os processos fermentativos. Nos vegetais, as enzimas estão presentes em maior concentração em frutos, folhas, sementes e látex. Porém, o uso desses vegetais como fonte de enzimas pode ser economicamente inviável e controverso, devido ao alto custo desses materiais e ao uso para finalidades não alimentícias ser visto danoso à população por diminuir a oferta de alimentos. Assim o uso de subprodutos agrícolas e agroindustriais constitui boa fonte de enzimas sem prejuízos, já que o produto principal (alimento) é produzido normalmente. O fator limitante ao uso de subprodutos está no próprio processamento, já que altas temperaturas, condições



extremas de pH e adição de químicos, comuns em processos industriais, podem desnaturar as enzimas. Nesse contexto o processamento de frutas para suco constitui boa fonte de subprodutos, pois de maneira geral as partes descartadas, como cascas e sementes são ricas em enzimas e não sofrem tratamentos que poderiam desestruturar essas biomoléculas (O'Shea et al., 2012; Devasena, 2010; Fleuri et al., 2013).

Há muitos exemplos bem sucedidos do uso de vegetais como fonte de enzimas, como as proteases denominadas papaínas de frutos, folhas e látex de mamão (*Carica papaya* L.); ascorbato oxidases de espécies do gênero *Curcubita*; peroxidase de raiz forte (*A Armoracia rusticana* L.); fosfoglicerol pivuvato carboxilase de folhas de milho (*Zea mays* L.) e fitase de cereais como trigo (*Triticum vulgare* V.) (Molina et al., 2013; Devasena, 2010).

Atualmente há diversas enzimas utilizadas industrialmente sendo as principais as proteases, carboidrases (incluindo amilase, lactase, celulase e glicose isomerase), lipases, penicilina acilase, aminoácido acilase e ciclodextrina glicosil transferase aplicadas em diferentes áreas como alimentos, farmacêutica, diagnósticos, prevenção de doenças, têxtil, transformação, agricultura, pós-colheita, entre outras. O mercado mundial de enzimas movimenta cerca de 5 bilhões de dólares anualmente, com crescimento exponencial nos últimos anos; entretanto poucas empresas vêm dominando esse mercado. As 10 maiores e mais renomadas empresas de enzimas do mundo (Novozymes, Genencor, A B enzymes, Eucotis Genzyme, Berg+Schimidt, Amano, Biocon, Danisco, ADM, Biocatalyts e Stern Ingredients Multinacional) são responsáveis por aproximadamente 80% do mercado, sendo que a empresa Novozyme sozinha corresponde a cerca de 25% do total de enzimas comercializadas (Novozymes, 2012; Devasena, 2010).

A concentração do mercado de enzimas em poucas grandes empresas auxilia a manter o custo das enzimas comerciais elevado o que em muitos casos torna impraticável a aplicação da catálise enzimática em grande escala. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas para obtenção de enzimas *home-made* pode transformar o mercado de biocatalisadores já que apresentam elevada atividade, especificidade, características bioquímicas diversas e que podem ser obtidas por métodos simples e baratos de fontes abundantes e de baixo custo como os resíduos agroindustriais. O presente trabalho focou os estudos na busca por lipases em subprodutos do processamento de laranja e manga devido à expressão dessa enzima e das culturas no Brasil.



Produtos e subprodutos da laranja

Mundialmente são produzidas, aproximadamente, 55 milhões de toneladas de laranja doce, onde o Brasil se destaca como o maior produtor. Na safra de 2011 o país produziu 19 milhões de toneladas de laranja, sendo que o estado de São Paulo foi responsável por 76,1% dessa produção (IBGE, 2012; Lanza, 2003).

A origem da laranja é controversa, entretanto, de maneira geral, considera-se que ocorreu primeiramente no arquipélago malaio, localizado na China. Posteriormente espalhando-se pela Europa na Idade Média e chegando ao Brasil na época do descobrimento, cujo cultivo foi estimulado por ser considerada, no período, como antídoto ao escorbuto (doença ocasionada pela deficiência severa de vitamina C, comum na época das grandes navegações) (ASSOCITRUS, 2013).

A maioria das espécies consideradas citros pertence ao gênero *Citrus*, composto por apenas três espécies: cidra (*Citrus medica* L.), tangerina (*Citrus reticulata* B.) e toranja (*Citrus sinensis* L.), sendo os outros genótipos derivados de hibridações entre estas espécies (Scora, 1975).

A espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck é a mais utilizada para a produção de suco concentrado no Brasil e nos Estados Unidos. No Brasil, dentre as diversas variedades comerciais utilizadas a Pêra possui maior relevância. Condições de campo incluindo fatores climáticos, tratamentos culturais, variedade selecionada e métodos de extração influenciam na produtividade e composição, porém entre 45 a 60 % do peso total do fruto é convertido em suco de laranja e o restante é considerado subproduto (Donadio et al., 1995; Kimball, 1991).

Por muito tempo a laranja foi avaliada apenas por suas propriedades organolépticas, entretanto, sua composição bioquímica é rica em metabólitos secundários como proteínas, aminas, poliaminas, hidratos de carbono complexos, ácidos orgânicos, lipídios, fenóis, flavonóides, terpenóides, compostos aromáticos, elementos minerais, hormônios e vitaminas. O uso da laranja como fonte dessas biomoléculas agrega valor à essa fruta que é amplamente utilizada para consumo *in natura*, processamento de suco e extração de óleo essencial (Ladaniya, 2009).

Cerca de 40 % de toda laranja produzida no mundo é transformada em suco concentrado, juntos o Brasil e os EUA produzem 90% de todo o suco processado de laranja. Porém, há grande diferença entre esses dois países, os EUA preferem suco processado, consumindo quase todo o suco produzido no país. O consumidor brasileiro prefere consumir o fruto *in natura* e por isso o suco processado é voltado à exportação, sendo que cerca de 80% da laranja doce brasileira é



convertida em suco concentrado congelado, cujo principal destino é a Europa (IBGE, 2012; Lanza, 2003).

A extração de suco de laranja tem como finalidade separar o suco do restante do fruto. Dependendo do equipamento utilizado os subprodutos são separados em diferentes frações. Entre os equipamentos mais utilizados está a extratora *in line* da empresa J. B. T. Food Tech, que até 2008 pertencia a F. M. C. Food Tech e é considerada referência em tecnologia de equipamentos para processamento de alimentos. Esse equipamento separa os subprodutos em três frações denominadas casca, *frit* e bagaço, cujo funcionamento está ilustrado na Figura 1. Nesse equipamento a laranja é comprimida entre os copos, a polpa e suco ficam retidos no tubo filtro, enquanto a casca e o *frit* são descartados separadamente na parte superior, entre o copo e o cortador. A polpa e suco de dentro do tubo filtro sofrem pressão, conforme o movimento ocasionado pela entrada de mais material, fazendo com que o suco e partículas da polpa passem para dentro do coletor de suco. As partículas maiores são descartadas e encaminhadas à produção de farelo de polpa cítrica. Após a extração, o suco ainda contém polpa e resíduos de bagaço que são removidos em equipamentos adicionais denominados *finishers* (despolpadeiras), os quais separam a polpa do suco por filtração (J. B. T. Food Tech, 2013).

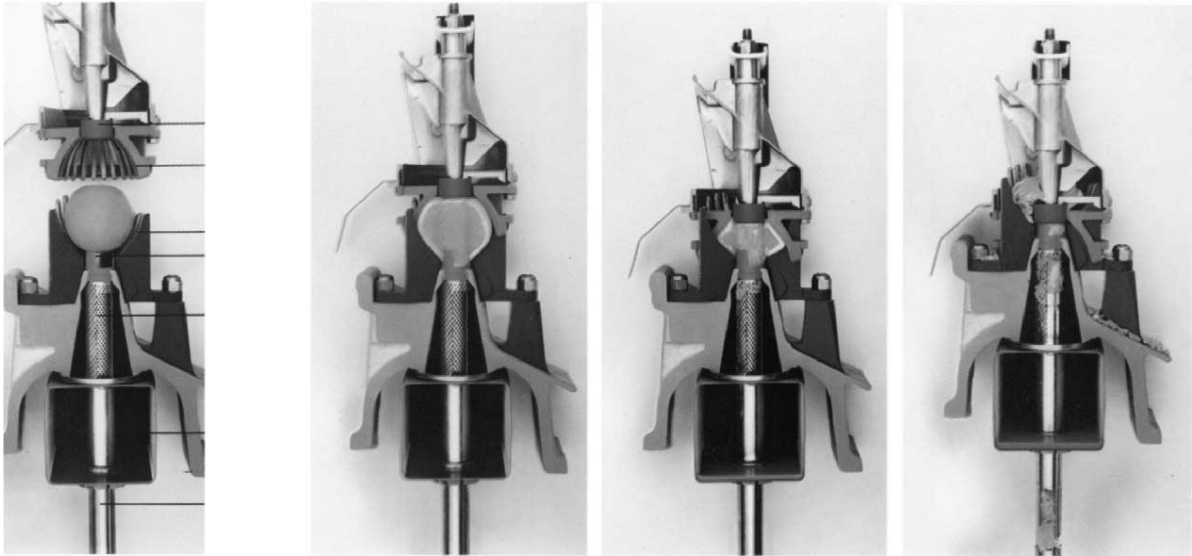


Figura 1. Sistema de extração de suco citrico da empresa J. B. T. Food Tech

A extração de suco de laranja é mecânica, somente após a etapa de extração são realizadas etapas de padronização, que podem incluir a adição de compostos químicos e processos para a conservação como pasteurização que utilizam temperaturas elevadas (Lanidaya, 2009).

Anatomicamente, a laranja é um fruto simples sincárpico, carnoso indeiscente do tipo hesperídeo. As partes são epicarpo, constituída pela parte colorida e mais externa do fruto; mesocarpo, composta pela parte branca e localizada entre o epicarpo e endocarpo; e endocarpo, composta pelos gomos, na qual estão inseridas as sementes (Vidal e Vidal, 2006).

Comparando constituintes do fruto pela definição da anatomia vegetal e a industrial, a fração denominada casca é composta pelo epicarpo, o *frit* corresponde a parte mais externa do epicarpo e o bagaço pelo mesocarpo. A Figura 2 ilustra a relação entre as partes anatomicamente denominadas e as denominações usualmente utilizadas pela indústria de processamento de suco de laranja.

O bagaço é composto pelo mesocarpo, também denominado albedo e constitui o subproduto de maior volume produzido no processamento para suco de laranja, correspondendo a 42 % do total do fruto. Possui flavanonas (responsáveis pelo sabor amargo), pectinas, fibras celulósicas e minerais como ferro e cromo (Queiroz e Menezes, 2005).

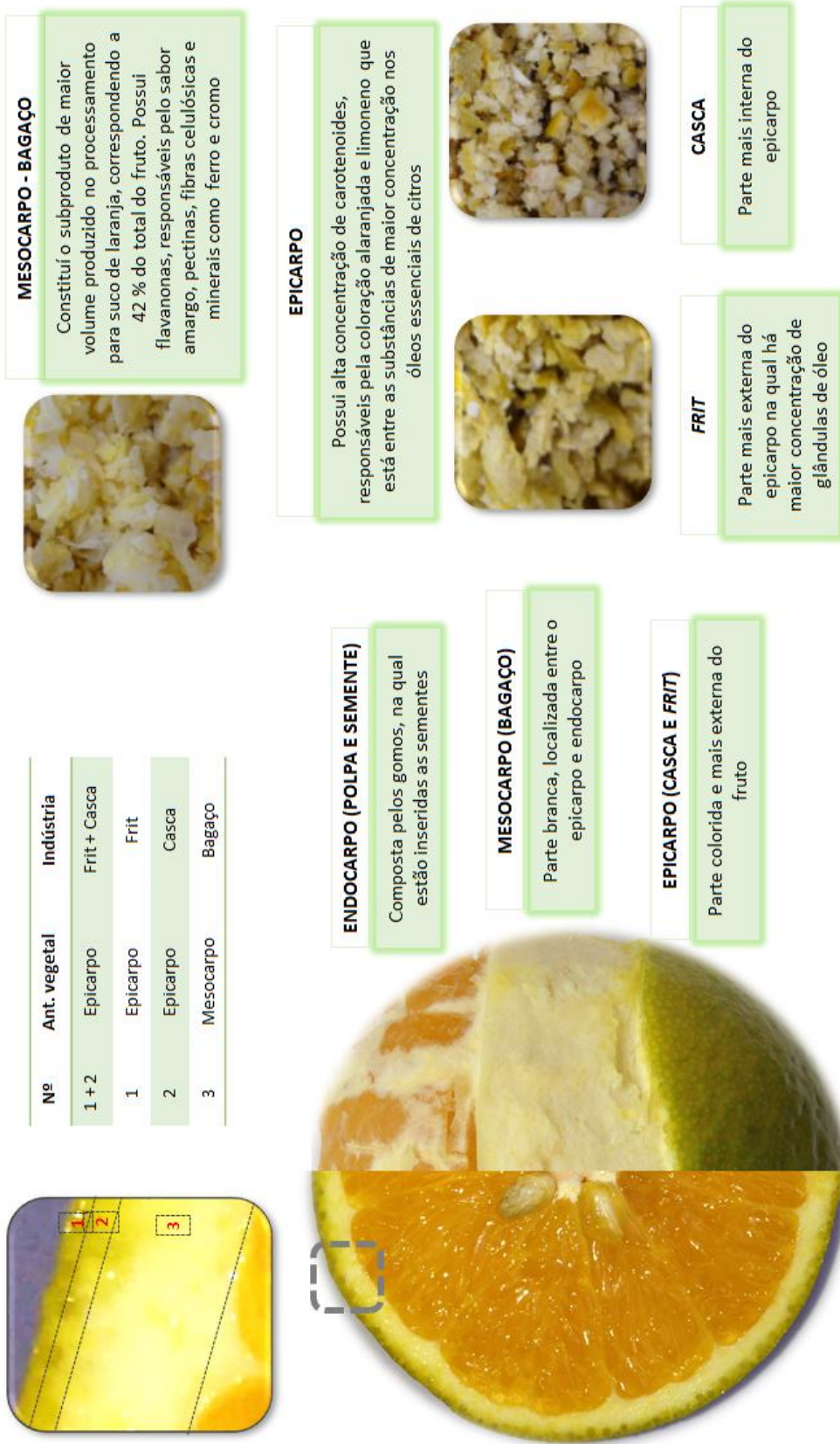


Figura 2. Comparação entre as partes anatómicas da laranja e as denominações industriais dos subprodutos da laranja



O epicarpo possui elevada concentração de carotenoides responsáveis pela coloração alaranjada e limoneno que está entre as substâncias de maior concentração nos óleos essenciais de citros. O óleo essencial é o subproduto mais valioso do processamento de suco de laranja, amplamente utilizado devido à sua essência, coloração, além de propriedades antimicrobianas nas indústrias de alimentos, fármacos e cosmética. Sua concentração é cerca de 0,3 % da massa total do fruto e é extraído por pressão mecânica. As glândulas que armazenam o óleo estão concentradas na parte mais externa do epicarpo (*frit*), por isso, para facilitar o processo de extração de óleo, durante o processo de extração de suco, esta fração é separada do restante da casca (Lanza, 2003). O óleo essencial de laranja é constituído por uma mistura de substâncias, entre elas os terpenos que são os compostos presentes em maior concentração e referem-se à hidrocarbonetos formados pela condensação de unidades de isoprenos (C5) e compartilham sua origem com ácidos graxos e são classificados como lipídeos não saponificáveis (Nascimento, 2008).

Atualmente estudos utilizando esses subprodutos para a obtenção de biomoléculas têm crescido como os de Luengo et al. (2013) sobre a extração de polifenóis da casca, Senevirathne et al. (2009) sobre extração e concentração de flavonoides e de Bortoluzzi e Marangoni (2006) para extração de fibras dietéticas obtidas durante a extração de suco.

Produtos e subprodutos de manga

A manga é a segunda fruta tropical mais produzida no mundo, sendo a Índia o maior produtor (correspondendo a cerca de 45% do total o que representa 15 milhões de toneladas) cultivando mais de 1.000 variedades. O Brasil é o sétimo, representando 3% do total produzido no mundo e o segundo maior exportador, responsável pelo cultivo de cerca de 200 variedades. A região brasileira que mais produz manga é a nordeste, principalmente o Submédio do Vale do São Francisco, no qual o cultivo utilizou cerca de 38.000 hectares no ano de 2011, desses aproximadamente 70 % pertencem à Bahia (FAO, 2012; Embrapa, 2010).

A manga pertence à família Anacardiaceae, gênero *Mangifera* que possui aproximadamente 70 espécies, sendo a mais importante a *Mangifera indica* L., planta perene de porte arbóreo, de origem no sul e sudeste da Ásia e atualmente é mundialmente cultivada apenas em locais de clima tropical. Comercialmente as mangas são divididas em dois grupos, o de mangas vermelhas que quando maduras permanecem com a casca com coloração avermelhada e incluem as variedades americanas como Haden, Tommy Atkins, Keitt, Kent e Palmer; e mangas amarelas de variedades como Afonso e Totapuri que permanecem com casca



amarela quando maduras. As variedades vermelhas dominam cerca de 90% do mercado mundial de mangas *in natura* (IBRAF, 2013; Embrapa, 2010).

Atualmente, a Tommy Atkins é a variedade mais produzida e comercializada, com origem na Flórida, EUA, possui fruto de tamanho médio para grande (460 g) com casca espessa e formato oval; apresentando coloração do fruto laranja-amarela coberta com vermelho e púrpura intensa; a polpa é firme e succulenta e o teor de fibras é médio. É resistente à antracnose e aos danos mecânicos e possui maior período de conservação, representando 90 % das exportações de manga do Brasil (Embrapa, 2004).

Por serem frutos climatéricos, a colheita pode ocorrer na maturidade fisiológica, quando ainda não atingiram o ponto de consumo (estádio verde-maturo); sendo então armazenadas e a maturação controlada com refrigeração e atmosfera modificada (Yahia e Singh, 2009).

A composição química da manga varia com as condições da cultura, variedade, estágio de maturação e outros fatores, sendo constituída principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas (principalmente ácido ascórbico) e carotenoides e outros pigmentos (Ma et al., 2011).

O mercado mundial de mangas ocorre o ano todo, porém entre os meses de abril a setembro a oferta é maior e entre outubro e dezembro há forte queda, devido principalmente à sazonalidade da produção e exportação de países como Índia, México, Paquistão e Filipinas. O Brasil, em especial a região produtora do Vale do São Francisco, possui características climáticas e tecnológicas que possibilitam a produção contínua o que implica a exportação em períodos em que outros países não dispõem dos frutos. Entretanto, apesar dessa vantagem o Brasil, assim como os outros países, enfrenta desperdícios na época de pico de colheita e escassez da fruta nos períodos de entressafra (Jawad, 2013; Embrapa, 2010).

Entre as soluções para amenizar esse problema seria o processamento dos frutos excedentes, gerando produtos como manga em calda, suco, néctar, polpa concentrada, manga liofilizada, barra de manga e cereais, doces e geleias. Além dos produtos gerados há a possibilidade de utilização dos subprodutos, devido à grande quantidade de compostos presentes nesses resíduos (Litz, 2009).

Os frutos da mangueira são do tipo drupa carnosa. O fruto quando maduro é constituído por pericarpo ou exocarpo, o qual é constituído pelo epicarpo (casca), mesocarpo (polpa) e endocarpo (caroço). O epicarpo é chamado comumente de casca. O mesocarpo corresponde à polpa. O endocarpo, chamado de caroço, é formado por uma camada lenhosa e uma membrana papirácea interna rica em fibras. O endocarpo envolve uma semente única, chamada de amêndoa, a qual, é envolvida por dois tegumentos papiráceos, sendo o primeiro denominado



testa, que é branca-prateada e é bem aderida ao endocarpo, e o segundo denominado tegmén, o qual, cobre a semente e apresenta coloração parda (Manica et al., 2001). A relação entre as partes anatômicas do fruto da manga e os nomes utilizados pela indústria para definir as porções separadas durante o processamento pode ser verificada na Figura 3.

A casca da manga corresponde a aproximadamente 25% do peso total do fruto seco, é rica em compostos bioativos e enzimas como protease, peroxidase, polifenol oxidase, carotenoides, vitaminas C e E, fibras alimentares e carboidratos (Ajila et al., 2007). Devido aos nutrientes presentes nos subprodutos do processamento de manga esses são utilizados como alimentação animal, como no estudo de Vieira (2007) sobre adição de casca de manga à alimentação de frango para corte; e como meio de cultura para micro-organismos produtores de muitos compostos, como no estudo de Jawad et al. (2013) sobre produção de ácido láctico por fermentação de casca de manga.

O caroço de manga é constituído por basicamente por duas partes, o tegumento e a amêndoa. O tegumento é a camada mais externa do caroço que envolve a amêndoa e contém grandes quantidades de celulose, hemicelulose e lignina. A amêndoa é a parte principal constituída pelo embrião e albúmen, apresentando amido, celulose, hemicelulose, lignina e ácidos graxos (ácidos oleico, esteárico, palmítico e linoleico). As amêndoas geralmente representam 10 % do peso total do fruto, enquanto que o tegumento 6,11 % (Vieira, 2007).

A maturação do fruto é o resultado de mudanças coordenadas em várias vias metabólicas, provocando alterações na parede das células, síntese de açúcares, ácidos orgânicos, pigmentos e compostos voláteis. (Giovannoni, 2004). Essas alterações são catalisadas por enzimas. O estudo de Andrade et al. (2012) avaliou a variação do conteúdo proteico de mangas durante a maturação e identificou a presença de hidrolases em frutos de manga. O estudo de Moharram e Moustafa (1981) identificou a presença de lipídeos em sementes de manga, correspondendo entre 6 a 12 % do peso total, como os ácidos graxos palmitato, esteárico, oleico, linoleico e linolênico.

ENDOCARPO E SEMENTE (CAROÇO)

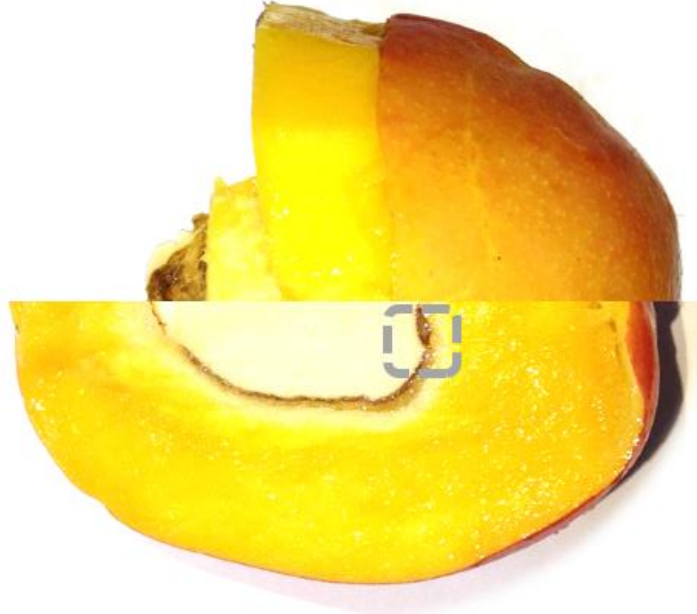
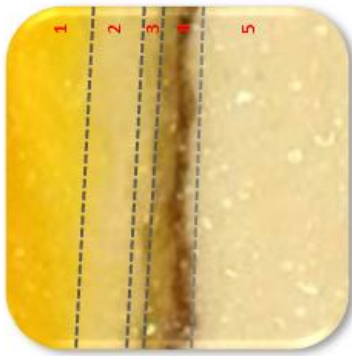
O endocarpo é a membrana lenhosa de coloração esbranquiçada, a semente (amêndoa) é envolvida pela testa e tégmen que possui a coloração parda. Os tegumentos correspondem a cerca de 6% e a semente a 10% do peso total do fruto *in natura*

MESOCARPO (POLPA)

Parte amarela, firme, doce e comestível. Constituída principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, vitaminas (principalmente ácido ascórbico) e carotenóides e outros pigmentos

EPICARPO (CASCA)

Parte mais externa do fruto, coloração de verde a vermelha. Corresponde a cerca de 25% do peso do fruto fresco, rico em enzimas, carotenóides, vitaminas, fibras alimentares e carboidratos



Nº	Ant. vegetal	Indústria
1	Mesocarpo	Polpa
1+2+3+4+5	Endocarpo + semente	Caroço
2	Endocarpo endurecido	Camada fibrosa
3	Testa	Camada branco-prateada
4	Tégmen	Camada parda
3	Semente	Amêndoa

Figura 3. Comparação entre as partes anatômicas da manga e as denominações industriais dos subprodutos da manga



Lipase

As lipases cujo o nome recomendado pela E. C. é triacilglicerol acilidrolase possui o nome de classificação EC 3.1.1.3, no qual:

EC representa *Enzyme Commission of the IUBMB*;

- primeiro dígito: 3, classe hidrolase;
- segundo dígito: 1, subclasse esterase;
- terceiro dígito: 1, sub-subclasse éster carboxílico hidrolase;
- quarto dígito: 3, triacilglicerol lipase.

Pertencem ao grupo das serina hidrolases, possuem a função de mobilizar e hidrolisar triglicerídeos (TAGs) estocados liberando ácidos graxos que são encaminhados para a produção de energia. Em seu meio natural a interface orgânica aquosa dessas enzimas catalisa a hidrólise de ligações éster carboxílicas, entretanto, em meios com umidade reduzida outras reações são catalisadas como a esterificação (reação inversa à hidrólise) e a transesterificação (Lopes et al., 2011; Freire e Castilho, 2008; Pereira et al., 2003).

As lipases catalisam diferentes reações. A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta reação ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma que, num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis. A reação de hidrólise de lipídeos consiste no rompimento da ligação éster do glicerídeo produzindo glicerol e ácidos graxos, na presença de água. O tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo estão relacionados com a elevada especificidade das lipases, o que possibilita um grande número de aplicações. Além de quebrar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa em condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes utilizados no início da reação. Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos (Oliveira e Rosa, 2006, Castro et al., 2004).



A reação de esterificação é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise, ocorrendo entre alcoóis poli-hídricos e ácidos graxos livres do glicerídeo correspondente. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação (Carvalho et al., 2003).

A transesterificação é a troca de radicais acil entre compostos, quando ocorrem entre um éster e um ácido é denominada acidólise, um éster e um álcool de alcoólise e um éster e outro éster é chamada de interesterificação. Nestas reações um ácido graxo, um álcool ou outro éster, reagem com o glicerídeo, resultando no rearranjo dos grupos de ácidos graxos produzindo novo glicerídeo com propriedades físicas e químicas diversas (Carvalho et al., 2003; Pereira et al., 2003).

As lipases que são enzimas solúveis em água atuam na interface água-lipídeo, contrariando as equações de Michaelis-Menten para a cinética enzimática que são válidas somente para reações catalisadas em fase homogênea. Geralmente o substrato lipídico é utilizado na forma de emulsão em análises da lipase e à medida que vão se formando os produtos e degradando o substrato ocorre variação na composição da interface água/lipídeo. Portanto, a velocidade da reação é determinada pela área superficial da emulsão das partículas por unidade de volume e não pela concentração de lipídeos na emulsão (Gomes, 2006).

A atividade das lipases é aumentada quando situadas na interface polar/apolar e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. A teoria bastante aceita para este fenômeno diz que parte da superfície da enzima se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar e que esta conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (Sharma et al., 2001; Mohamed et al., 2000; Borgstron e Brockman, 1984).

Descobriu-se mais recentemente, entretanto, que várias lipases não são passíveis de ativação interfacial. Por isto, a caracterização de lipases com base no conceito de ativação interfacial foi substituída pela definição de que as lipases são carboxilesterases capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (Verger, 1997).

Quanto à especificidade, as lipases podem ser divididas em três grupos principais (Villeneuve, 2003), a saber:

Substrato especificidade

O substrato natural é glicerol ésteres. Estas enzimas são hábeis em catalisar não somente a hidrólise de triacilgliceróis (TAGs), mas também di e monoacilgliceróis e fosfolipídios no caso de fosfolipases. A especificidade é definida pela habilidade da lipase para hidrolisar, preferencialmente, um tipo de ésteres de glicerol.



Regiosseletivas

Subdivididas em:

- Lipases não específicas: catalisam a hidrólise completa do triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diacilglicerol como intermediários, atuando de modo aleatório. Exemplos: lipases de *Candida cylindracea*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas fluorescens*.
- Lipases 1,3 específicas: na presença dessas lipases, os triacilgliceróis são hidrolisados nas ligações dos C1 e C3 do glicerol produzindo ácidos graxos, 2 monoacilglicerol e 1,2 ou 2,3 diacilglicerol, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil para produzir 1,3 diacilglicerol e 1 ou 3 monoacilglicerol. Exemplos: lipases de *Aspergillus niger*, *Mucor miechei* e *Rhizopus delemar*.
- Ácido graxo específica ou tipo seletivas: as lipases podem ser específicas para um tipo particular de ácido graxo ou para um grupo específico de ácidos graxos. Elas hidrolisam ésteres de ácidos graxos localizados em qualquer posição do triacilglicerol.

Enantioseletivas

Lipases com habilidade em discriminar enantiômeros em uma mistura racêmica. A enantioseletividade das lipases pode mudar com o substrato. Esta mudança pode ser relacionada à natureza química do éster. Podem ser obtidas de fontes microbianas, animais ou vegetais. Em animais podem ser pancreáticas, hepáticas e gástricas, sendo obtidas de esôfago de caprinos e ovinos, abomaso de bezerro e pâncreas de porco. Entre as leveduras o gênero *Candida* é o mais citado, sendo que entre suas espécies destaca-se a *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e *Candida cylindracea*. Entre os fungos destacam-se as linhagens *Geotrichum candidum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus chinensis* e *Mucor miechei*. Entre as bactérias destacam-se a *Pseudomonas cepacia* e a *Photobacterium lipolyticum* M37. Em vegetais podem ser encontradas em sementes e frutos de diversas espécies como girassol (*Helianthus annuus* L.), canola (*Brassica napus* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), tremoço (*Lupinus luteus* L.), coco (*Cocos nucifera* L.), aveia (*Avena sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), maracujá azedo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa), limão siciliano (*Citrus limon* L.), entre outros (Molina, 2013; Barros et al., 2010; Yang et al., 2009; Sharma et al. 2001; Bewley e Black, 1994; Garcia, 1992).

Aplicação de lipases

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes. A



modificação dessas estruturas possibilita um número indeterminado de aplicações em diversas áreas como modificação de óleos, indústria de detergentes, na indústria de química fina, aromas, panificação, agroquímicos, biorremediação, entre outros. O uso de enzimas lipolíticas nesse cenário tem se mostrado boa opção, pois além das vantagens como atividade em condições brandas e menor geração de resíduos, essas são específicas tornando possível a realização de reações que ocorreriam de maneira ineficiente pelo uso de compostos químicos. As estruturas dos lipídeos estão diretamente ligadas às suas propriedades físicas e organolépticas, assim, diferentes estruturas podem ser modificadas com o intuito de atingir metas biotecnológicas. A modificação da composição de ácidos graxos e esteroides, por exemplo, pode modificar o valor nutricional de óleos e gorduras, assim como alterações no tamanho e grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos podem modificar o ponto de fusão (Barros et al., 2010; Hasan et al., 2006, Castro et al., 2004). Na *Tabela 1* há alguns exemplos de aplicações e a seguir estão descritos exemplos de aplicações de lipases já utilizadas em escala industrial, bem como estudos recentes de usos promissores.



Tabela 1. Aplicação de lipases (adaptado de Devasena 2010)

Área de aplicação		Reações e características associadas
Detergentes		Auxilia na remoção de manchas devido à hidrólise de óleos e gorduras.
Indústria têxtil		Remoção de óleos e gorduras na produção de couro.
Tratamento de efluentes		Hidrólise de efluentes com conteúdo lipídico.
Indústria de papel e celulose		Aumento da extração de celulose e aumento da brancura.
Alimentos	Laticínios	Síntese de aromas e sabores característicos devido à hidrólise e transesterificação de gorduras do leite.
	Panificação	Promove resistência à massa aumentando o volume e brancura do miolo de pães.
	Dietéticos	Alteração na composição nutricional pela transesterificação de óleos.
	Processamento de ovos	Manutenção das propriedades de formação de espuma da clara do ovo pela hidrólise de lipídeos.
Química fina	Cosméticos	Alteração de ponto de fusão e propriedades físicas por esterificação de óleos e manteigas.
	Agrotóxicos	Síntese de intermediários quirais.
	Síntese de poliésteres biodegradáveis.	Materiais biodegradáveis.
	Cuidados pessoais	Auxiliam na limpeza de lentes de contato, pele, cabelo, entre outros.
Biocombustíveis	Biodiesel	Transesterificação de óleos vegetais para produção de ésteres alcoólicos.
Indústria farmacêutica	Medicamentos	Auxílio em problemas digestivos, síntese de intermediários de anti-inflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen) e drogas quirais.
	Diagnósticos	Dosagem de triglicerídeos no sangue (indicadores de problemas no pâncreas).



Detergentes e indústria têxtil

A indústria de detergentes tem adicionado enzimas como proteases, amilases, celulases e lipases, para aumentar a capacidade de remoção de manchas. Cerca de 30 % do total das lipases comercializadas são aplicadas na indústria de detergentes. Devido à capacidade de catalise da hidrólise de lipídeos as lipases são uma ótima opção no auxílio à remoção de óleos e gorduras, apresentando também, capacidade de suportar variações de pH e temperatura. Além de manterem-se estáveis na presença de surfactantes e outras enzimas, as lipases que mantêm atividade em meio alcalino e em temperaturas de aproximadamente 60°C são as mais utilizadas para essa finalidade (Saisubramanian, 2006).

Entre as aplicações mais antigas de enzimas está seu uso na indústria de couro, pois para a limpeza de couros e peles é necessária a remoção de proteínas e gorduras localizadas entre as fibras de colágeno. O uso de lipases já é parte integrada do processamento de couro em substituição ao uso de solventes e surfactantes que são menos eficazes e prejudiciais ao meio ambiente (Biotech, 2013).

Tratamento de efluentes e biorremediação

Lipídeos, óleos, gorduras e ácidos graxos livres, juntamente com carboidratos são os principais constituintes de águas residuárias da indústria de alimentos, principalmente nas áreas de óleos comestíveis, sorvetes, laticínios, matadouros e restaurantes. Os lipídeos causam grandes danos ao meio ambiente como a formação de filmes oleosos nas superfícies aquáticas impedindo a difusão de oxigênio e, conseqüentemente, provocando mortandade da vida aquática. Os óleos emulsificam-se também com matéria orgânica causando entupimentos e sob condições anaerobióticas pode ocorrer metanização de óleos o que contribui para o efeito estufa, entre outros. Segundo Hocevar et al. (2012), cada litro de resíduo lipídico é capaz de comprometer cerca de 1 milhão de litros de água. Estudos como de Kumar et al. (2012), Mita et al. (2010) e Rigo et al. (2008) têm testado a aplicabilidade do uso de lipases 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 conseqüente diminuição de gastos com energia.



Papel e celulose

Durante a extração de papel e celulose são formados depósitos de material resinoso e pegajoso que causam danos aos equipamentos e diminuem a qualidade dos produtos por aderirem em rolos, cabos e nas folhas de papel, sendo que entre os principais componentes desse material resinoso estão os triglicerídeos. A adição de lipases promove a hidrólise liberando ácidos graxos que podem ser incorporados às fibras celulósicas com adição de sulfato de alumínio ou outro fixador. Na indústria de papel reciclado também há formação de aglomerados de material pegajoso devido, por exemplo, à presença de adesivos, revestimentos e ligantes no material utilizado como matéria prima, o que pode ser solucionado pela adição de enzimas lipolíticas que impedem a aglomeração desses materiais neutralizando seu efeito negativo. As lipases também conduzem a significativas melhorias na resistência à tração resultando na redução do uso de produtos químicos de alto valor (Novozyme, 2013).

Química fina

O campo de biopolímeros abrange produtos tais como os plásticos biodegradáveis, tintas e papelão. Polímeros típicos incluem amido, proteínas, polissacarídeos (celulose, pectina, xilana, e lignina) e plásticos biodegradáveis produzidos por micro-organismos. As enzimas são utilizadas para modificar estes polímeros na produção de derivados adequados para incorporação como copolímeros em polímeros sintéticos para tintas, plásticos e filmes. A capacidade das lipases catalisarem a síntese de ésteres pela reação de transesterificação em sistemas contendo solventes orgânicos, possibilita seu uso na síntese de poliésteres biodegradáveis. Como, por exemplo, o 1-butil-oleato que é produzido por esterificação direta de butanol e do ácido oleico, o qual é utilizado para diminuição da viscosidade do biodiesel em temperaturas baixas (Linko et al., 1998)

Na área de produtos para cuidados pessoais (*personal care*) as lipases são adicionadas à inúmeros produtos para maximizar a ação de limpeza, como em produtos para limpeza de lentes de contato e shampoos pré-tratamentos químicos. Compostos como isopropil miristato, isopropil palmitato, ésteres de ácidos e álcoois graxos e retinóides são utilizados na fabricação de cosméticos e podem ser produzidos através de bioprocessos utilizando lipases imobilizadas. Apesar do processo enzimático possuir maior custo, os produtos finais possuem qualidade superior e necessitam de menos processos de refinamento (Novozyme, 2013).

Intermediários quirais podem ser sintetizados a partir da transformação de fibras sintéticas por lipases com elevada quimio, regio e enantioselectividade. Esses compostos são



essenciais na eficácia de muitos medicamentos, agrotóxicos e compostos de química fina, como na interesterificação do substrato ácido (R,S)-2-cloropropiônico com formação de ácido (S)-2-cloropropiônico que é intermediário do cloro-ácido propiônico constituinte de herbicidas, ou na conversão de (R,S)-Naproxeno etil ester em (S)-naproxeno que é ingrediente ativo de medicamentos anti-inflamatórios, antirreumáticos e antitérmicos. As lipases também são utilizadas na remoção de componentes indesejados em misturas racêmicas (Patel, 2003).

Lipases são marcadores de drogas importantes e marcadores enzimáticos na área médica e podem ser usadas como ferramentas de diagnóstico, na determinação do nível de lipases no sangue, auxiliando, por exemplo, no diagnóstico de doenças no pâncreas. Lipases que atuam em meios ácidos são adicionadas em medicamentos para distúrbios gástricos, dispepsias, manifestações cutâneas de alergias digestivas, inflamações cutâneas, entre outros (Hasan et al., 2006).

Alimentos

Na indústria de alimentos, as lipases são amplamente utilizadas para modificação de ácidos graxos e ésteres com intuito de obter aromas e sabores específicos. Em lácteos para enriquecimento de aromas em queijos, lipólise da gordura da manteiga, aceleração do processo de amadurecimento e produção de sabores similares ao de queijo. Dependendo do ácido graxo liberado, sabores, colorações ou cheiros são modificados, alterando características organolépticas, físico-químicas e nutricionais do produto final. Em queijos, ácidos graxos de cadeia curta (quatro a seis carbonos) liberam carboxiácidos sob a ação de esterases e lipases produzidas por *Penicillium roqueforti* liberando o aroma característico do *blue cheese*. Para produtos de confeitaria e panificação são utilizadas para produção do aroma de creme e textura de manteiga em biscoitos e balas e para controlar o escurecimento não enzimático (Molina, 2013).

A farinha de trigo normal utilizada na fabricação de pães contém cerca de 1 % de lipídios polares e não polares. Alguns destes lipídios, especialmente os lipídios não polares, como triglicerídeos, são ligados ao glúten, o que dificulta a sua funcionalidade. A adição de lipases modifica os triglicerídeos, modificando deste modo, sua interação com glúten. Assim o glúten adquire maior resistência, o que garante uma massa mais estável ao excesso de fermentação, maior volume do pão, melhor estrutura de miolo e devido à maior uniformidade o miolo se torna mais branco (Biotech, 2013).



Entre as lipases comerciais mais utilizadas na indústria de queijo está a lipase pré-gastrica PGETT produzida pela empresa Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan) que possui a capacidade de catalisar a hidrólise de ácidos graxos de cadeia curta responsáveis pelo aroma característico. O estudo de Mase et al. (2011) demonstram que é possível substituir as enzimas comerciais obtendo resultados semelhantes por lipases microbianas *home-made*.

Transformação de óleos

Óleos com estrutura química semelhante possuem valores bem diferentes dependendo de suas propriedades e dificuldade de obtenção. O óleo de palma e a manteiga de cacau são estruturalmente semelhantes, mas a manteiga de cacau possui alto valor devido às suas propriedades como ponto de fusão a 37 °C permanecendo sólida em temperatura ambiente, o que não ocorre com o óleo de palma que possui ponto de fusão de 23 °C e menor valor. Entretanto, pela reação de interesterificação o óleo de palma pode ser transformado em um produto com as mesmas características da manteiga de cacau (Hasan et al., 2006). Pela hidrólise de óleos marinhos podem ser obtidos compostos de alto valor agregado como a astaxantina (corante de alimentos), ácido 4-hidroxicarboxílico usado como precursor de aromas, o éster γ -decalactona (sabor de frutas), ácidos dicarboxílicos para indústrias de pré-polímeros e ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-3 e ômega-6 (Castro et al., 2004).

Os óleos essenciais são constituídos por inúmeros compostos, dos quais os mais abundantes estão os terpenos. A derivação de terpenóides possibilita a síntese de materiais complexos como os epóxidos que apresentam elevada reatividade devido às suas propriedades físico-químicas, podendo formar inúmeros compostos utilizados na produção de fármacos. O estudo de Moreira (2008) demonstrou a epoxidação químico-enzimática de terpenos, via lipases e constitui alternativa interessante e viável para a obtenção de epóxidos com conversões satisfatórias e com regio e estereosseletividade.

O estudo de Ribeiro (2008) avaliou a aplicação de lipases na extração de carotenoides a partir do óleo de buriti, já que carotenoides e triglicerídeos possuem estruturas físicas semelhantes, assim a hidrólise dos triglicerídeos modifica sua polaridade e solubilidade, facilitando a extração e concentração dos pigmentos.

Biodiesel

Atualmente, o esgotamento das fontes de petróleo têm estimulado as pesquisas sobre fontes alternativas de energia. O biodiesel está entre essas alternativas, apresentando vantagens



sobre o diesel de petróleo, como baixa toxicidade, proveniente de fontes renováveis e boa qualidade no processo de combustão. Embora o biodiesel forneça uma quantidade de energia, cerca de 10% menor que o diesel de petróleo, seu desempenho no motor é praticamente o mesmo em relação à potência e ao torque. Quimicamente é constituído por uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa, obtidos de triglicerídeos de óleos vegetais, gorduras animais ou até mesmo de óleos alimentares usados (Leng et al., 2010).

O biodiesel é obtido pela transesterificação dos triglicerídeos com álcoois de cadeia curta, com a liberação do glicerol o qual é considerado subproduto desse processo. Dentre os álcoois empregados na transesterificação de óleos e gorduras, os mais utilizados são metanol e etanol. O metanol é mais amplamente aplicado na produção de biodiesel em escala comercial e, por ser mais reativo, implica em menor temperatura e tempo de reação. O etanol, além de ter produção consolidada no Brasil, é consideravelmente menos tóxico, renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade (Lobo et al., 2009).

A reação de transesterificação de óleos ou gorduras é realizada na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. A produção de biodiesel via enzimática ocorre pela ação de lipases na catálise da reação de alcoólise ou hidrólise seguida por esterificação. A via enzimática possui vantagens em relação ao processo químico convencional como reação em condições brandas (baixa temperatura e pressão) o que significa redução com custos de energia, possibilidade de separação do glicerol que é o subproduto desse processo e redução no volume de resíduos gerados (Fleuri et al., 2011).

2. Conclusão

Os subprodutos agroindustriais, como os provenientes do processamento de laranja e manga, podem ser explorados como fontes abundantes e de baixo custo de inúmeros biocompostos. As lipases são enzimas versáteis que já são utilizadas em áreas de aplicação diversificadas e seu mercado poderia expandir caso sejam comercializadas enzimas eficazes a baixo custo, já que, atualmente o principal entrave para a expansão de seu uso é o custo elevado desses biocatalisadores. Dessa forma, o uso de subprodutos agroindustriais pode ser a promissor para a produção de lipases a baixo custo.



3. Referências bibliográficas

Ajila C. M., Bhat S.G., Prasada-Rao U.J.S. (2007) Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102:1006–1011.

Andrade J. M., Toledo T. T., Nogueira S. B., Cordenunsi B. R., Lajoloa F. M., Nascimento J. R. O. (2012) 2D-DIGE analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit reveals major proteomic changes associated with ripening. *Journal of proteomics* 75:3331-3341.

ASSOCITRUS - Associação Brasileira de Citricultores (2013) Documentos. Disponível em www.associtrus.com.br/ Acessado em Agosto de 2013.

Barros M., Fleuri L. F., Macedo G. A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 27:15-29.

Bewley J. D., Black M. (1994) *Seeds, Physiology of Development and Germination*. Plenum Press, New York, 445:446.

Biotech S. R. O. (2013) Enzyme. Disponível em: www.im-biotech.com/ Acessado em Setembro de 2013.

BRENDA – Enzyme database. (2013) Disponível em: www.brenda-enzymes.org/ Acessado em Agosto de 2013.

Borgston, B. e Brockman H. L. (1984) *Lipases*. 4ª ed., Elsevier: Amsterdam, Holland.

Bortoluzzi R. C. e Marnagoni C. (2006) Caracterização da fibra dietética obtida da extração do suco de laranja. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, 8:61-66.

Carvalho P. O., Campos P. R. B., Noffs M. D'A., Oliveira J. G., Shimizu M. T., Silva D. M. (2003) Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26:1:75-80.

Castro H. F., Mendes A. A., Santos J. C. (2004) Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27:146:156.

Conselho da Comunidade Europeia (EU) (1991) Diretriz 91/156/CEE de 18 de março de 1991. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu>, acessado em Agosto de 2013.



Devasena T. (2010) Enzymology. 1º edição, Oxford. YMCA Library Building, Jai singh Road, New Delhi.

Donadio L. C., Figueiredo J. O., Pio R. M. (1995) Variedades cítricas brasileiras. Boletim agrícola, UNESP/FUNEP/EECB, Jaboticabal, 1:228-229.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) Mercado da Manga. Sistemas de Produção, 2ª edição. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/index.htm>, acessado em Agosto de 2013.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido (2004) Mercado e comercialização da Manga. Sistemas de Produção. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/index.htm>, acessado em Agosto de 2013.

EPA - United States Environmental Protection Agency (2013) Land, waste and cleanup science. Disponível em: www.epa.gov/, acessado em Agosto de 2013.

FAO. FAOSTAT- data base estatístico. 2012. Disponível em: <http://fao.org>, acessado em Agosto de 2013.

Fleuri L. F.; Freire D. M. G.; Macedo G. A. Studying synergic effects of the combined lipase systems in vegetable oil hydrolysis. In: IX Brazil-Japan International Workshop: Society, Energy and Environment, 2011, Campinas, Brazil. IX Brazil-Japan International Workshop: Society, Energy and Environment, 2011

Freire G. D. M. e Castilho F. L. (2008) Lipases em Biocatálise. In: Bon et al. (org). Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado. Interciência, Rio de Janeiro, 369.

Garcia A. P., Benaches G. M. J., Primo E. M. (1992) Lipid mobilization in Citrus cotyledons during germination, 140:01-07.

Giovannoni JJ. (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. Plant Cell, 16:170–80.

Gomes F. M., Paula A. V., Silva G. S., Castro H. F. (2006) Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em elulignina quimicamente modificada por carbonildimidazol. Química Nova, 29:710-718.



- Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235.
- 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.
- IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas (2010) Estatística frutas frescas e processadas. Disponível em: www.ibraf.org.br/, acessado em Agosto de 2013.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012). Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/, acessado em Julho de 2013.
- IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2013). Disponível em: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/, acessado em Agosto de 2013.
- Jawad A. H., Abbas F. M. A., Ogugbue C. J., Azhar M. E., Norulaini N. A. N. (2013) Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. *Journal of King Saud University – Science*, 25:39–45
- J. B. T. Food Tech (2013) Citrus processing. Disponível em: www.jbtfoodtech.com/en/Solutions/Processes/Citrus-Processing, acessado em Julho de 2013.
- Knothe G., Gerpen J.V., Krahl J. (2005) *The Biodiesel Handbook*. AOCS Press, Illinois, 4–16.
- Kimball D. A. *Citrus processing: quality control and technology*. (1991) AVI Book, New York, NY, 470:472.
- Kosseva M. R. (2009) Processing of Food Wastes capítulo de *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier Inc., 58:58-60, Belfield, Dublin.
- Kumar S., Mathur A., Singh V., Nandy S., Khare S. 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
- Ladaniya M. (2009) *Citrus fruit – Biology, technology and evaluation*. Elsevier Inc. San Diego, CA.



- Lanza C. M. (2003) Processed and Derived Products of Oranges capítulo de CITRUS FRUITS/Processed and Derived Products of Oranges, Elsevier Science Ltd., University of Catania, Catania, 1346:1348.
- Leng D. Y. C., Wu X., Leung M. K. H. (2010) A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy* 87:1083–1095.
- Linko Y. Y., Lamsa M., Wu X., Uosukainen E., Seppala J., Linko P. (1998) Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal Biotechnology*, 66:41–50.
- Lôbo I. P., Ferreira S. L.C., Cruz R.S. (2009) Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v. 32, 6:1596-1608.
- 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.
- Luengo E. Álvarez I., Raso J. (2013) Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17:79–84.
- Ma, X., Wu, H., Liu, L., Yao, Q., Wang, S., Zhan, R., et al. (2011). Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, 129:102–107.
- 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* 135:1520–1526.
- Mase T, Sonoda M., Morita M., Hirose E. (2011) Characterization of a lipase from *Sporidiobolus pararoseus* 25-A which produces cheese flavor. *Food Sci. Technol. Res.*, 17:1:17–20.
- Menezes V. B. (1993) A indústria da laranja: competitividade e tendências. Salvador: Fundação Centro de Projetos e Estudos da Bahia, 125:126.
- 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.

Mohamed M., Mohamed T. M., Mohamed S. A., Fahmy A. S. (2000) Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresource Technology*, 73:227.

Molina G., Pelissari F. M., Dionisio A. P., Pastore G. M. (2013) Obtenção de enzimas para a indústria de alimentos capítulo de Biotecnologia de alimentos, coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, 12:367:387.

Moreira M. A. (2008) Produção enzimática de peróxi-ácidos e sua utilização na epoxidação de terpenos. Tese de doutorado do curso de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina.

Nascimento M. G. (2008) Produção enzimática de peróxi-ácidos e sua utilização na epoxidação de terpenos. Tese de doutorado do programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Santa Catarina.

Novozymes (2012) The Novozymes Report 2012. Disponível em: <https://report2012.novozymes.com/>, acessado em Agosto de 2013.

Novozymes (2013) Enzymes at work. Disponível em: www.novozymes.com/en/about-us/brochures/documents/enzymes_at_work.pdf, acessado em Setembro de 2013.

Oliveira C., Rosa M. F. (2006) Enzymatic Transesterification of Sunflower Oil in an Aqueous-Oil Biphasic System. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83:1:21-25.

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.

Patel R.N. (2003) Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel*, 6:902–20.

Pereira E. B., Zanin G. M. Castro H. F. (2003) Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20:4:343-355.



- Queiroz C. E. e Menezes H. C. (2005) Suco de laranja, capítulo de Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo, Edgard Blücher, 221-254.
- Ribeiro B. D. (2008) Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de β -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*). Dissertação de mestrado, Curso de pós-graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 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.
- Scora R. W. (1975) On the history and origin of Citrus. *Bull. Torrey Bot. Soc.*, 102:6:365-369.
- Saisubramanian N., Edwinoliver N. G., Nandakumar N., Kamini N. R., Puvanakrishnan R. (2006) Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. *Journal Ind. Microbiology and Biotechnology*, 33:669-676.
- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627.
- Senevirathne M., Jeon Y. J., Ha J. H., Kim S. H. (2009) Effective drying of citrus by-product by high speed drying: A novel drying technique and their antioxidant activity. *Journal of Food Engineering*, v. 92, p. 157-163.
- Verger R. (1997) Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Tibs Technology*, 15:32.
- Vidal W. N., Vidal M. R. R. (2006) Botânica organografia – Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Vieira P. A. F. (2007) Caracterização dos resíduos de manga (*Mangifera indica* L.) e os efeitos sobre o desempenho e parâmetros bioquímicos em frango de corte. Tese de doutorado do curso de pós-graduação em bioquímica agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Villeneuve, P. (2003) Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105:308.



Yahia E. M. e Singh S. P. (2009) Modified and controlled atmospheres for transportation, storage and packing of horticultural commodities, capítulo de Tropical fruits, Boca Raton, CRC, 397-444.

Yang K. S., Sohn J. H., Kim H. K. (2009) Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107:599.

Woiciechowski A. L., Carvalho J. C., Spier M. R., Habu S., Yamaguishi C. T., Ghiggi V., Socol 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.



CAPÍTULO 02: DETERMINAÇÃO DE LIPASES EM MATRIZES VEGETAIS E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE LIPASES

Clarissa Hamaio Okino Delgado, Luciana Francisco Fleuri

Trabalhos apresentados no formato de pôster e publicados como anais do X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC em Blumenau – SC, o qual ocorreu no período de 7 a 10 de outubro de 2012. Títulos originais: “Determinação da atividade lipolítica em matrizes vegetais” e “Avaliação da atividade de lipases em bagaço de laranja armazenado e processado em diferentes condições”.

Resumo

Com o intuito de identificar possíveis fontes vegetais de lipases as matrizes vegetais maracujá (casca, polpa e semente), manga (casca, semente e polpa), uva (casca e polpa), laranja (casca, bagaço, *frit* e polpa), limão tahiti (casca e bagaço) e amendoim (grão com casca) foram analisadas. Todas as matrizes testadas apresentaram atividade lipolítica. As matrizes provenientes de laranja e manga foram consideradas as mais promissoras, devido à elevada atividade e a relevância da cultura no cenário brasileiro e mundial. Foram testados quatro diferentes processos com o intuito de aumentar o período de conservação das enzimas, entre os quais, a liofilização com armazenamento congelado foi considerado o melhor.

Abstract

Matrices of passion fruit (peel, pulp and seed), mango (peel, seed and pulp), grapefruit (peel and pulp), orange (peel, core, pulp and frit), tahiti acid lime (peel and pulp) and peanuts (grain with peel) were analyzed in order to identify possible sources of vegetal lipases. All matrices tested showed lipase activity. Matrices from orange and mango were considered the most promising due to the high activity and the importance of culture in the Brazilian and world. We tested four different processes to increase the durability of enzymes and considered lyophilization and frozen storage the best to maintain the activity of enzymes.



Introdução

As lipases atuam acelerando reações de hidrólise de triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, além de catalisar reações reversas como esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização. Essas transformações são necessárias em diversos setores, como produção de biodiesel, detergentes, alimentos, química fina e fármacos. As lipases podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, sendo que a primeira possui vantagens como simplicidade dos métodos para obtenção e abundância de matérias primas (Barros et al., 2010). Estão presentes em maior abundância em frutas, grãos e sementes. Existem muitos estudos sobre a presença de lipases em vegetais, tais como o de Sagiroglu e Arabaci (2005) em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), Sana et al. (2004) em sementes de canola (*Brassica napus* L.) germinada e Borek et al. (2006) em sementes de lúpulo (*Lupinus luteus* L.), porém atualmente as lipases vegetais são pouco utilizadas em escala comercial devido à ausência de matrizes economicamente viáveis.

O presente estudo buscou analisar diferentes partes de frutas amplamente cultivadas e processadas no Brasil quanto às atividades de lipases, visando selecionar as matrizes que apresentassem maior potencial, ou seja, com elevada atividade e que fossem abundantes e de baixo custo, para que estudos mais aprofundados fossem realizados.

A elevada umidade e teor de nutrientes presentes nesses materiais os tornam suscetíveis à decomposição em temperatura ambiente. Assim sendo, foi analisada a estabilidade das lipases de bagaço de laranja em diferentes condições de armazenamento e processamento.

Material e métodos

Material

Foram analisados 6 diferentes espécies vegetais, totalizando 14 matrizes. As espécies e partes analisadas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 2. Matrizes utilizadas nos pré-testes para detecção de atividade lipolítica

Nº em figuras	Nome comum	Nome científico	Parte analisada
1	Maracujá-azedo-amarelo	<i>Passiflora edulis</i> S.	Casca
2	Maracujá-azedo-amarelo	<i>Passiflora edulis</i> S.	Polpa
3	Maracujá-azedo-amarelo	<i>Passiflora edulis</i> S.	Semente
4	Manga (Tommy Atkins)	<i>Mangifera indica</i> L.	Casca
5	Manga (Tommy Atkins)	<i>Mangifera indica</i> L.	Polpa
6	Manga (Tommy Atkins)	<i>Mangifera indica</i> L.	Semente
7	Uva (Itália-roxa)	<i>Vitis vinifera</i> L.	Casca
8	Uva (Itália-roxa)	<i>Vitis vinifera</i> L.	Polpa
9	Laranja (Pêra)	<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Casca
10	Laranja (Pêra)	<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Bagaço
11	Laranja (Pêra)	<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck	Frit
12	Laranja (Pêra)	<i>Citrus sinensis</i> L.	Polpa
13	Lima ácida tahiti	<i>Citrus sp.</i>	Casca
14	Amendoim	<i>Arachis hypogaea</i> L.	Semente

Preparação do extrato enzimático para análise das matrizes vegetais

Cada matriz foi analisada separadamente. Após o processamento, as matrizes foram embaladas, armazenadas por até 2 dias a 5°C, trituradas mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³ e mantidas congeladas. As amostras tiveram sua atividade de lipase analisadas pelo método descrito no item 2.4.

Preparação do extrato enzimático para análise de estabilidade do bagaço de laranja

Amostras de bagaço de laranja foram submetidas aos tratamentos: 1 - trituração mecânica e armazenamento refrigerado; 2 - trituração mecânica e armazenamento congelado; 3 - trituração mecânica, liofilização por 24 h e armazenamento refrigerado e 4- trituração mecânica, liofilização por 24 h e armazenamento congelado. As amostras dos tratamentos 1 e 2 foram analisadas nos tempos 0, 11 e 21 dias e dos tratamentos 3 e 4 nos tempos 1, 12 e 20 dias. As amostras tiveram sua atividade de lipase analisadas pelo método descrito no item 2.4.



Atividade da enzima

As matrizes testadas não possuem referências sobre as condições ideais para a atividade lipolítica. Assim, foram utilizadas condições comumente observadas em estudos de outras matrizes para a realização dos pré-testes. A atividade lipolítica das frações foi medida seguindo o método descrito por Lopes et al. (2011). Foi utilizado 5 mL do substrato composto por azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 3 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e 1g do extrato enzimático. O sistema reacional foi incubado por 30 min à 40°C em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos lipídeos do azeite foram titulados com solução de NaOH (0,05 M) utilizando fenolftaleína como indicador. Para a avaliação da atividade, cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas anteriormente. Como as frações de laranja são ácidas, para cada amostra foi analisado um branco de amostra, composto por extrato enzimático desnaturado por elevada temperatura e pela adição da solução paralisadora antes do banho termostaticado. O resultado de cada branco de amostra obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente. Foi analisado branco de reagentes (sem extrato enzimático) como garantia de que os resultados obtidos na titulação eram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

Resultados e discussão

Matrizes vegetais

Todas as matrizes estudadas apresentaram atividade de lipase. As atividades lipolíticas das diferentes matrizes podem ser verificadas na Figura 1, sendo que as maiores atividades detectadas foram na semente de manga (55,0 U/g), polpa de maracujá (28,9 U/g), polpa de manga (27,2 U/g), grão de amendoim com casca (24,1 U/g) e polpa de laranja (14,2 U/g). Nota-se que entre as matrizes que constituem resíduos vegetais a semente de manga (55,0 U/g) e casca de laranja (11,9 U/g) se destacaram. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, no qual foi constatada diferença significativa entre os tratamentos.

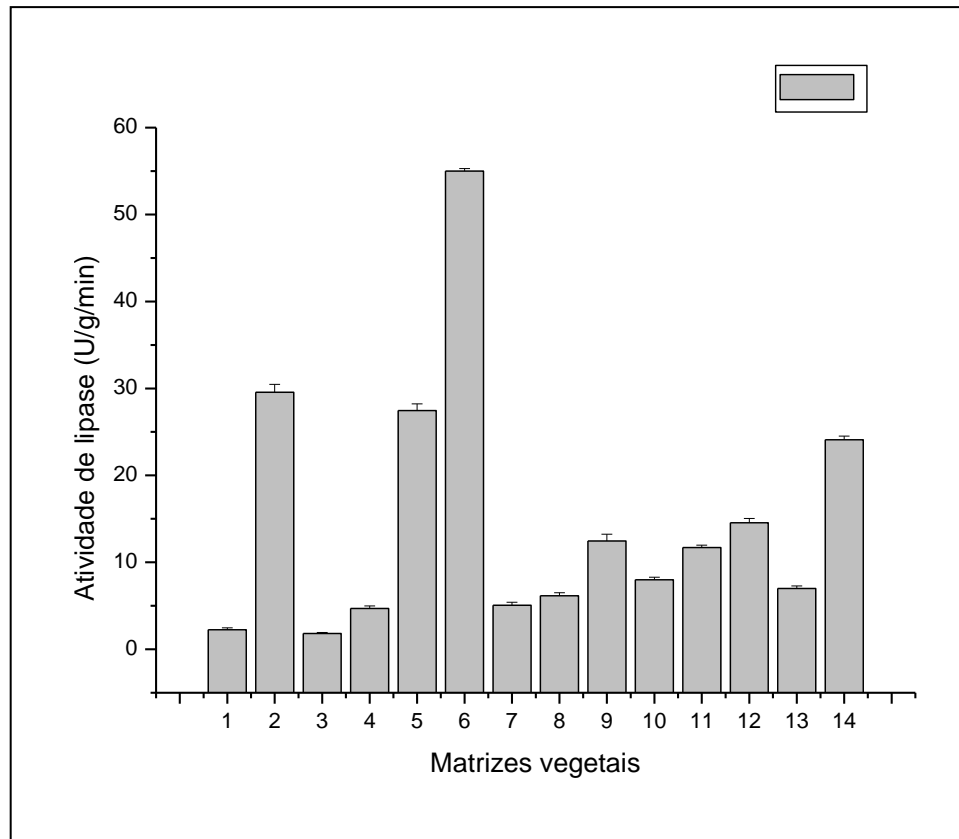


Figura 3. Atividade de lipase das matrizes vegetais, sendo respectivamente 1, 2 e 3, casca, polpa e semente de maracujá; 4, 5 e 6, casca, polpa e semente de manga; 7 e 8 casca e polpa de uva; 9, 10, 11 e 12, casca, bagaço, frit e polpa de laranja; 13 casca de lima ácida e 14 semente de amendoim.

As matrizes bagaço, casca e *frit* de laranja, assim como, casca e semente de manga foram selecionadas como as matrizes com maior potencial para obtenção de lipases. Como primeiro fator de avaliação, consideramos primeiramente a presença de elevada atividade lipolítica, apesar de todas as matrizes testadas terem apresentado atividade. A casca de uva, semente de maracujá e casca de maracujá apresentaram baixa atividade (abaixo de 4 U/g/min). Com o intuito de obter enzimas a baixo custo selecionamos as matrizes com processos de produção e processamento bem estabelecidos, dando ênfase às matrizes que apresentaram elevada atividade e que são consideradas subprodutos.

Outro fator considerado foi a abundância das frutas selecionadas. No Brasil são produzidos anualmente cerca de 19 milhões toneladas de laranja e 1,5 milhão de toneladas de manga, o que é mais expressivo quando comparado com cerca de 700 mil toneladas de maracujá e 300 mil toneladas de amendoim (IBGE, 2012; Embrapa, 2010; CONAB, 2012).



Estabilidade de lipases de bagaço de laranja

As matrizes testadas são facilmente decompostas em temperatura ambiente, devido à elevada concentração de água e nutrientes. Entre os subprodutos com alto teor de água está o bagaço de laranja e por isso foi utilizado como material padrão para o estudo de estabilidade de lipases. Em todos os tratamentos e períodos avaliados foi verificada atividade de lipases, porém quando as amostras foram liofilizadas e armazenadas as amostras apresentaram maior atividade da enzima. Além disso, as amostras não liofilizadas apresentaram crescimento de fungos após 20 dias o que poderia prejudicar o estudo das matrizes, já que os fungos poderiam modificar a composição de enzimas desses materiais. Os resultados desse estudo podem ser verificados na Tabela 3, o tratamento 4 (trituração mecânica, liofilização por 24 horas e armazenamento congelado) foi o considerado o mais indicado, pois apresentou maior atividade em todos os períodos avaliados. Foi aplicado o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, no qual foi constatada diferença significativa entre os tratamentos com resultados com letras diferentes.

Tabela 3. Estabilidade da atividade de lipase de bagaço de laranja

Tratamentos	0 dias	11 dias	21 dias
1 - trituração mecânica e armazenamento refrigerado	6,3 d	4,7 ef	8,0 c
2 - trituração mecânica e armazenamento congelado	5,9 de	4,4 f	6,4 d
3 - trituração mecânica, liofilização por 24 h	8,6 bc	9,9 a	8,4 bc
4 - trituração mecânica, liofilização por 24 h e armazenamento congelado	10,4 a	8,6 bc	9,3 ab

Conclusão

Consideramos que as matrizes bagaço, casca e *frit* de laranja, assim como, casca e semente de manga possuem potencial como fonte de lipases, porém estudos sobre as características bioquímicas bem como de aplicabilidade são necessários. Consideramos o processo de liofilização e armazenamento congelado o melhor tratamento para a estabilidade das enzimas.



Referências bibliográficas

Barros M., Fleuri L. F., Macedo G. A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 27:15-29.

Borek S., Ratajczak W., Ratajczak L. (2006) Ultrastructural and enzymatic research on role of sucrose in mobilization storage lipids in germinating yellow lupine seeds. *Plant science*, 170:3:441-448.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2012) Acompanhamento da safra brasileira, grão 2011/2012, disponível em: conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_49_52_boletim_maio_2012.pdf, acessado em Outubro de 2013.

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) Mercado da Manga. Sistemas de Produção, 2ª edição. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/index.htm>, acessado em Agosto de 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012). Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/, acessado em Julho de 2013.

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.

Sagiroglu A., Arabaci N. (2005) Purification and characterization of lipase from sunflower seed. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 35:1:37-44.

Sana N. K., Hossin I., Haque E. M., Shaha R. K. (2004) Identification, purification and characterization of lipase from germinating oil seeds (*Brassica napus* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7:2:246-258.



CAPÍTULO 3: OBTENÇÃO DE LIPASES DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE SUCO DE LARANJA

Título original: Obtaining lipases from byproducts of orange juice processing

Clarissa Hamaio Okino Delgado, Luciana Francisco Fleuri

Trabalho apresentado no formato de pôster no evento internacional 10 SLACA e submetido no formato comunicação curta na revista científica *Food Chemistry*, avaliação QUALIS A1 e fator de impacto de 4.072 em agosto de 2013.

RESUMO

Foi constatada a presença de lipases em três subprodutos do processamento de suco de laranja denominadas casca, bagaço e *frit*. As enzimas lipolíticas encontradas apresentaram atividade em ampla faixa de pH desde o neutro ao alcalino. No estudo de temperatura ótima foram verificados picos de atividade a 20°C, a 60°C e 70°C, o que indica a presença de isoformas de enzimas. Houve alteração na atividade na presença de sais, chegando a 122% na presença de MgCl₂ para extrato de bagaço e a 82,5% na presença de HgCl₂ no extrato de *frit*. Foi verificada atividade lipolítica dos extratos enzimáticos em três diferentes substratos sintéticos, os *p*-NP-ésteres butirato, laurato e palmitato. Pela primeira vez atividade de enzimas lipolíticas foram verificadas nesses resíduos, apresentando atividade de até 77,7 U/g/min para o extrato enzimático bruto do subproduto denominado *frit*.

Palavras-chave: lipase, *Citrus sinensis*, pH ótimo, temperatura ótima, influência de sais

ABSTRACT

The presence of lipases was observed in three byproducts of orange juice processing: peel, core and frit. The enzymes lipolytic were characterized biochemically over a wide pH range from neutral to alkaline. In the study of optimum temperature activity peaks at 20°C to 60°C and 70°C, indicating the presence of enzyme isoforms. The presence of salts influenced the activity of lipases, reaching 122% in the presence of MgCl₂ to extract of core and 82.5% in the presence of HgCl₂ in frit extract. The activities were monitored on different *p*-NP-esters (butyrate, laurate and palmitate). For the first time, lipase activity was detected in these residues, reaching 77.7 lipase U/g/min for the crude extract from fractions called the frit.

Keywords: lipase, *Citrus sinensis*, optimum pH, optimum temperature, influence of salts



Introdução

Durante a produção de suco de laranja apenas cerca de 50% do peso do fruto é convertido em suco, sendo o restante considerado subproduto. O equipamento utilizado no processamento das laranjas desse estudo foi a extratora *in line* da empresa J. B. T. Food Tech, que até 2008 pertencia a F. M. C. Food Tech, a qual separa os subprodutos em três diferentes frações, denominadas de *frit*, casca e bagaço. Parte dos resíduos gerados no processamento de laranja para suco é utilizada como fonte de nutrientes para o solo pela compostagem ou como alimento para animais e um pequeno volume é usado na extração de óleo essencial (Martí et al., 2010). Entretanto, essas frações são ricas em biomoléculas de alto valor como as lipases e poderiam ser exploradas devido ao baixo custo desses resíduos e alto custo das enzimas. Nesse contexto, o uso de subprodutos do processamento de suco de laranja é interessante já que esses constituem fonte abundante de baixo custo e não são submetidas à tratamentos que poderiam desestruturar as enzimas (como tratamentos térmicos ou químicos).

Lipases, também denominadas triacilglicerol acilhidrolases, catalisam a hidrólise de ligações ésteres carboxílicas em lipídeos, que desempenham importante papel em reações de síntese de substratos não aquosos (esterificação e alcoólise, por exemplo) e podem ser aplicadas na produção de biodiesel, fármacos quirais, biosurfactantes, aromas, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos (Barros et al., 2010).

A especificidade, o pH e a temperatura ótimos e de estabilidade e especificidade são parâmetros bioquímicos importantes a serem determinados para uma enzima, pois, permitem vislumbrar de qual biocatalisador se trata, bem como destinar a melhor aplicação para este. O estudo separado de cada fração de subprodutos possibilita a análise do potencial individual, o que pensando em processos em larga escala de obtenção é interessante, já que, utilizando apenas a parte do fruto com maior atividade haveria maior rendimento em comparação com o uso do fruto inteiro ou frações misturadas o que poderia tornar o processo mais rentável.

O presente estudo realizou a caracterização bioquímica de lipases obtidas dos subprodutos de laranja (casca, *frit* e bagaço), com o intuito de verificar as condições ótimas de atividade, a partir das quais é possível prever suas aplicabilidades.



Material e métodos

Material

A laranja utilizada nesse processo pertence à espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pêra Rio, cultivada no estado de São Paulo. A denominação dada pela indústria aos subprodutos da laranja pode variar, assim com o intuito de caracterizar as matrizes utilizadas comparamos cada fração industrial com seus constituintes anatômicos. O número de frações dos subprodutos do processamento de suco de laranja depende do equipamento utilizado, porém geralmente são divididos em três: *peel* ou casca, é a parte colorida da casca da laranja, composta pelo epicarpo; *frit* é a parte mais externa da casca, que é separada na indústria por deter a maior quantidade de óleo essencial, é parte mais externa do epicarpo; *core* ou bagaço, é a parte branca da laranja, localizada entre a casca e a polpa e é composta pelo mesocarpo.

Preparação do extrato enzimático

Cada fração foi analisada separadamente. Após o processamento, as matrizes foram embaladas, armazenadas por até 2 dias a 5°C, trituradas mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³, congeladas por 24 horas e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização foram novamente trituradas e depois, armazenadas congeladas a aproximadamente -7°C.

A liofilização foi realizada com os objetivos de retirada de água do sistema, concentração enzimática e homogeneização da amostra. Após a trituração as amostras passaram por peneira 20 *mesh* com abertura 0,84mm.

Atividade da enzima

A atividade lipolítica das frações foi medida seguindo o método descrito por Lopes et al. (2011). Foram utilizados 5 mL do substrato composto por azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 3 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e 1g do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min à 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos lipídeos do azeite foram titulados com solução de NaOH (0,05 M) utilizando fenolftaleína como indicador. Para a avaliação da atividade, cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições



descritas anteriormente. Como as frações de laranja são ácidas, para cada amostra foi analisado um branco de amostra, composto por extrato enzimático desnaturado por elevada temperatura e pela adição da solução paralisadora antes do banho termostaticado. O resultado de cada branco de amostra obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente. Foi analisado branco de reagentes (sem extrato enzimático) como garantia de que os resultados obtidos na titulação eram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

Influência do pH

Para o estudo do pH ótimo foi analisada a atividade lipolítica de cada fração em meio reacional semelhante ao utilizado no item 2.3, apenas diferenciando o pH da solução tampão. Foram testadas soluções tamponadas nos pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. O pH referente à maior atividade lipolítica foi considerado o pH ótimo (100% de atividade relativa). Para o estudo de pH de estabilidade foram utilizados o mesmo meio reacional anterior, porém as amostras permaneceram 24 h na solução tampão antes da análise da atividade.

Influência da temperatura

A atividade lipolítica das frações foi analisada no meio reacional descrito no item 2.3, alterando apenas a temperatura do banho termostaticado. Foram medidas a atividade lipolítica das frações nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Para verificação da termoestabilidade das frações de laranja as amostras foram incubadas em diferentes temperaturas por 60 min antes da determinação da atividade de lipase.

Influência de sais

Os extratos enzimáticos foram testados quanto à influência dos seguintes sais: MgCl₂, BaCl₂, KCl, ZnCl₂ e CuSO₄. Cada sal foi testado separadamente, a atividade lipolítica de cada fração foi determinada em meio reacional e temperaturas semelhantes aos utilizados no item 2.3 diferindo apenas no tampão ao qual foi adicionado 0,01 M de sal.

Estudo de especificidade

O *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) é composto por ácidos graxos de cadeia longa. A análise da atividade lipolítica das frações de laranja foi realizada seguindo o método descrito por Mahadik et al. (2002) e Lopes et al. (2011). A mistura de reação composta por 0,9 mL de solução de substrato, 0,2 mL de tampão fosfato (pH 7,0 e 0,5 M) e 0,05 g de extrato enzimático



foi incubada por 30 minutos à 40°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 410 nm.

O *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) é um substrato sintético constituído por ácidos graxos de cadeia média. As frações de laranja foram analisadas pelo método descrito por Gutarra et al. (2009). A solução de substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de *p*-NPL 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0 e 0,5 M). A reação foi iniciada pela adição de 0,05 g do extrato enzimático e incubada por 15 minutos a 30°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 412 nm.

Os subprodutos foram analisados segundo o método descrito por Calado et al. (2002) e Lopes et al. (2011), para avaliar a sua afinidade ao substrato *p*-nitrofenil-butirato (*p*-NPB). Uma alíquota de 0,05 g de cada fração foi adicionado a 3,43 mL de mistura de reacional constituída por 1,12 mM *p*-NPB dissolvido em tampão fosfato 50 mM (pH 7,2) contendo 0,2% de Triton X-100 e 0,43 M tetrahidrofurano. A reação foi incubada durante 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 405 nm.

O equipamento foi zerado com branco de substrato.

Resultados e discussão

A atividade lipolítica de frações de subprodutos do processamento de suco de laranja foi analisada sob condições padrão, isto é, pH 7,0 e 40°C. Durante esta etapa, as atividades médias foram de 36,5 U/g para bagaço; 37,2 U/g para casca e de 9,22 U/g para o *frit*. No estudo do pH ótimo a atividade máxima para o bagaço ocorreu em pH 6,0 correspondendo a 43,7 U/g (100% de atividade relativa) e houve atividade em pH 8,0 de 23,5 U/g (Figura 1, A); para a casca a atividade máxima foi de 57,6 U/g (100% de atividade relativa) em pH de 7,0, porém foi verificada atividade de 85% em pH 8,0 (Figura 1, B) e para o *frit*, o pico de atividade ocorreu em pH 9,0 correspondendo a 46,8 U/g (100% de atividade relativa) (Figura 1, C). O pH de maior estabilidade para a casca e o bagaço foi de pH 7,0 e para o *frit* de pH 6,0 (Figura 2).

No estudo de temperatura ótima o bagaço apresentou picos de atividades, um a 20°C correspondendo a 52,3 U/g (100% de atividade relativa) e outro a 70°C com 51,3 U/g (Figura



3, A); a casca e o *frit* também apresentaram dois picos, aos 20°C correspondendo à atividade relativa de 100% (63,6 U/g e 64,2 U/g, respectivamente) e em 60°C com 50,9 U/g e 15 U/g, respectivamente (Figura 3, B e C). No estudo de temperatura de estabilidade o bagaço apresentou dois picos de atividade, um a 20°C correspondendo a 57,5 U/g (100% de atividade relativa) e outro a 70°C com 50,5 U/g (Figura 3, A); a casca e o *frit* também apresentaram dois picos, aos 20°C correspondendo à atividade relativa de 100% (64,4 U/g e 77,7 U/g, respectivamente) e em 60°C com 55,3 U/g e 13,7 U/g, respectivamente (Figura 4, B e C). Para todas as frações, os resultados sugerem a presença de isoformas de lipases.

No estudo de influência de sais foi verificada a diminuição da atividade para o bagaço na presença de CuSO_4 correspondendo a cerca de 90% de atividade relativa e de 98% na presença de HgCl_2 . Foi verificado aumento na atividade na presença de ZnCl_2 , KCl , BaCl_2 e MgCl_2 , correspondendo a 111%, 109%, 112% e 122% de atividade relativa, respectivamente. Para a casca houve diminuição na presença de BaCl_2 (83%) e MgCl_2 (85%) e aumento da atividade na presença de ZnCl_2 , KCl e HgCl_2 correspondendo a 113%, 103% e 103%, respectivamente. Para o *frit* houve diminuição na atividade na presença de KCl com cerca de 88,5% de atividade relativa e de HgCl_2 correspondendo a 82,5% de atividade relativa (Figura 5).

Os resultados relativos à especificidade das lipases demonstraram que o *frit* e a casca têm uma elevada atividade na hidrólise de *p*-nitrofenol de palmitato (*p*-NPP). O bagaço apresenta baixa atividade para *p*-NPP, mas elevada atividade de *p*-NPL. As três frações possuem afinidade pelo *p*-NPB. Os resultados detalhados deste estudo estão apresentados na *Tabela 4*.

Há vários estudos sobre aplicações dos subprodutos do processamento de suco de laranja, como o de Crizel et al. (2013), o qual analisa a utilização dos subprodutos como fonte de fibras. Até a presente data, no entanto, não há registros de uso dessas matrizes como uma fonte de lipases. Comparado com outras lipases vegetais, as encontradas nos subprodutos de laranja são bioquimicamente semelhantes às encontradas em sementes de feijão Africano descrito por Enjiughha et al. (2004), os quais demonstraram atividade ótima em pH alcalino e atividade máxima a temperaturas entre 20°C e 30°C. As lipases de subprodutos de laranja apresentaram atividade menor que das lipases de látex do gênero *Euphorbia* descritas no estudo de Paques e Macedo (2006), entretanto, estas plantas são ornamentais e possuem cultivo restrito, o que torna impraticável sua utilização para aplicações em larga escala. Quanto às lipases microbianas, as lipases encontrados em derivados de laranja apresentam atividade consideravelmente maior em



comparação com as atividades relatadas por Daoud et al. (2013) de 5 U/mL; Papagora et al. (2013) de 7,44 U/mL e de Maldonado et al. (2012) de 16 U / mL.



Tabela 4. Atividade de lipase em emulsão de goma arábica e pnp-ésteres

Substratos e condições de reação	Bagaço	Casca	Frit
Goma arábica, pH 7,0, 40°C, 30 min	36,55 ± 0,91	57,55 ± 4,45	22,95 ± 1,25
Goma arábica, pH optimal (9 - frit, 6 - core e 7 - peel)	43,75 ± 3,88	57,55 ± 4,45	46,75 ± 1,76
Goma arábica, T optimal (20°C para frit, core e peel)	51,60 ± 2,68	65,10 ± 2,26	69,55 ± 0,77
<i>p</i> -NPP	0,00	1,02 ± 0,41	3,12 ± 0,07
<i>p</i> -NPB	5,27 ± 0,77	7,84 ± 1,52	15,46 ± 2,92
<i>p</i> -NPL	1,59 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,00

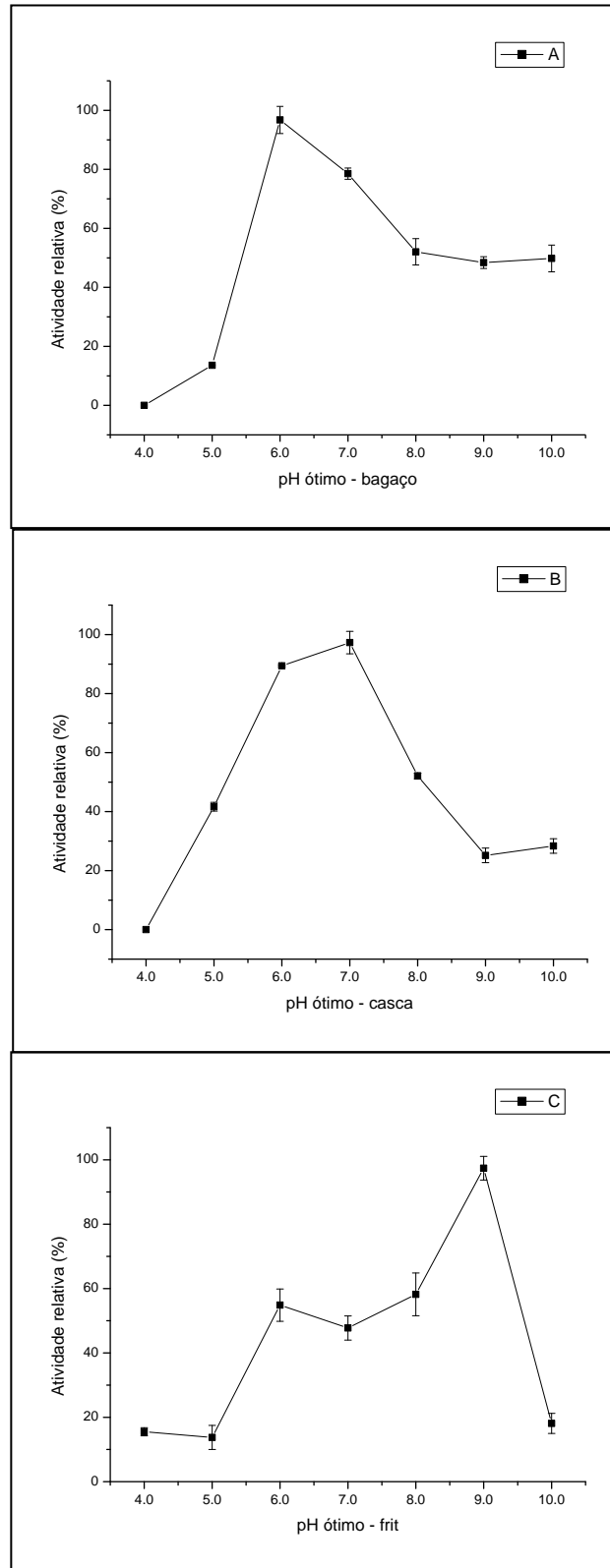


Figura 4. Estudo de pH ótimo para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - frit)

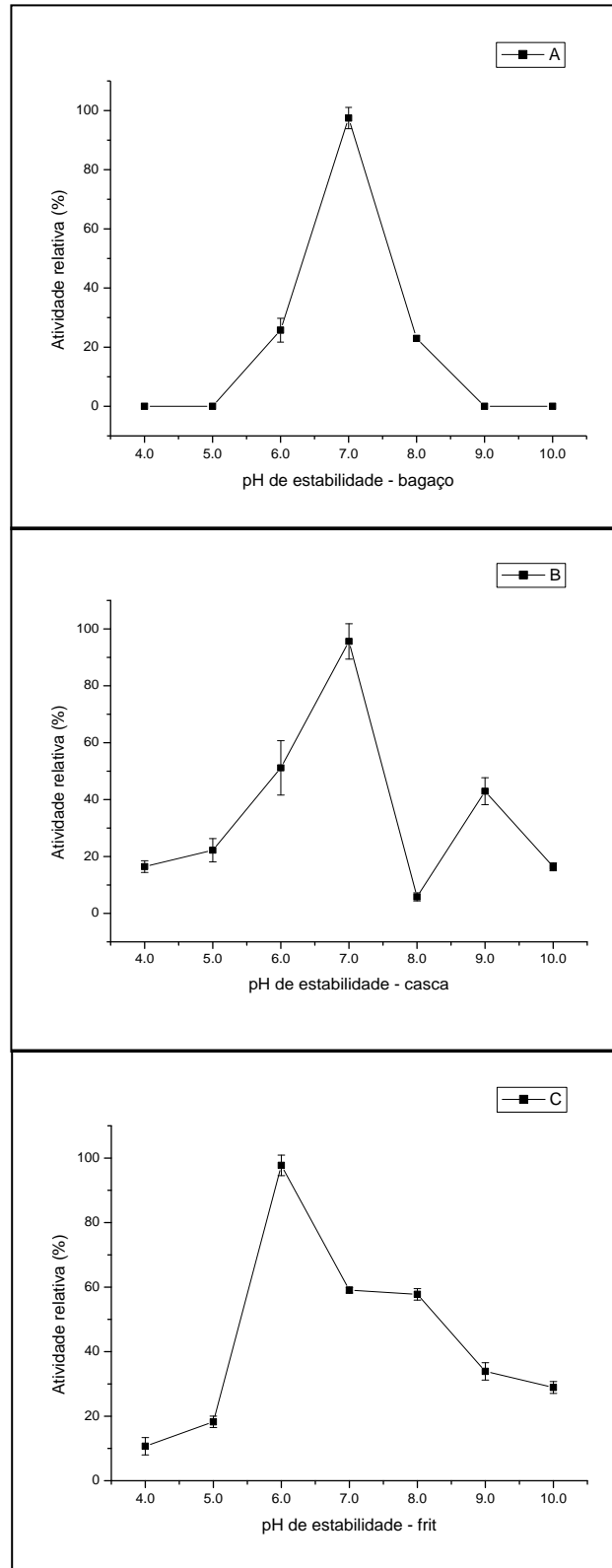


Figura 5. Estudo de pH de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C – frit)

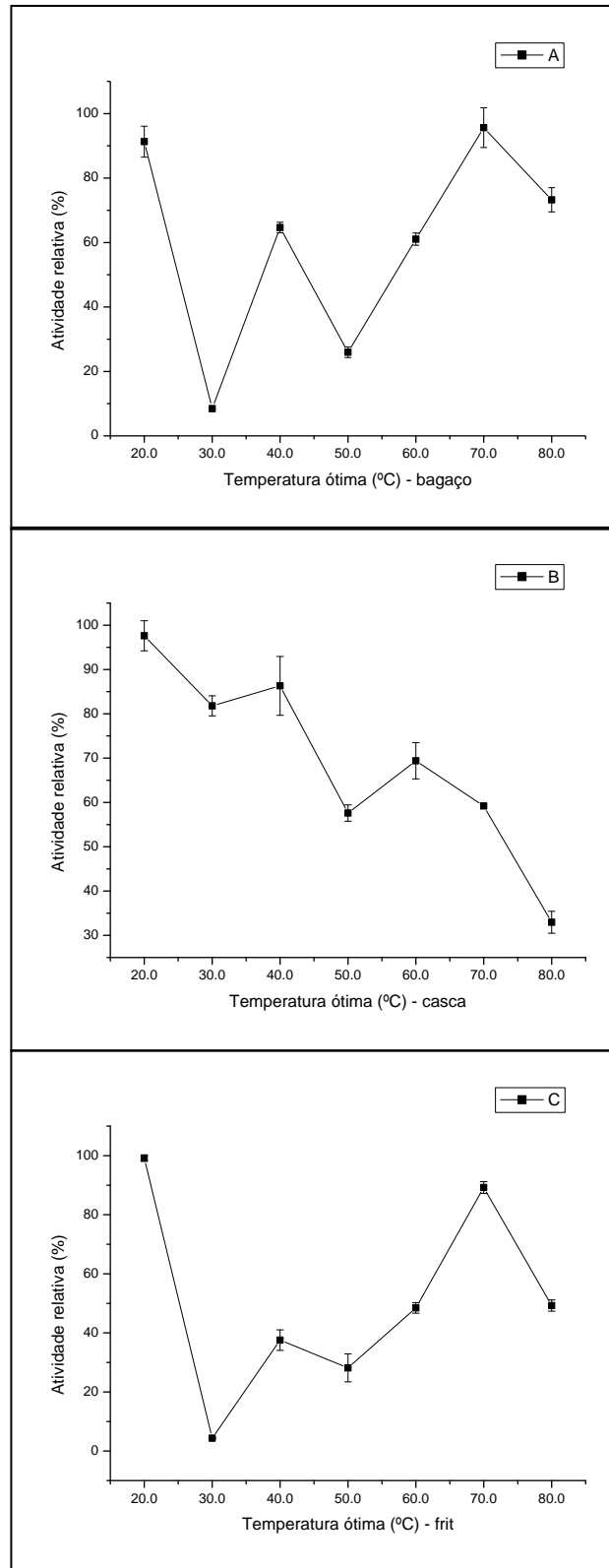


Figura 6. Estudo de temperatura ótima para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - frit)

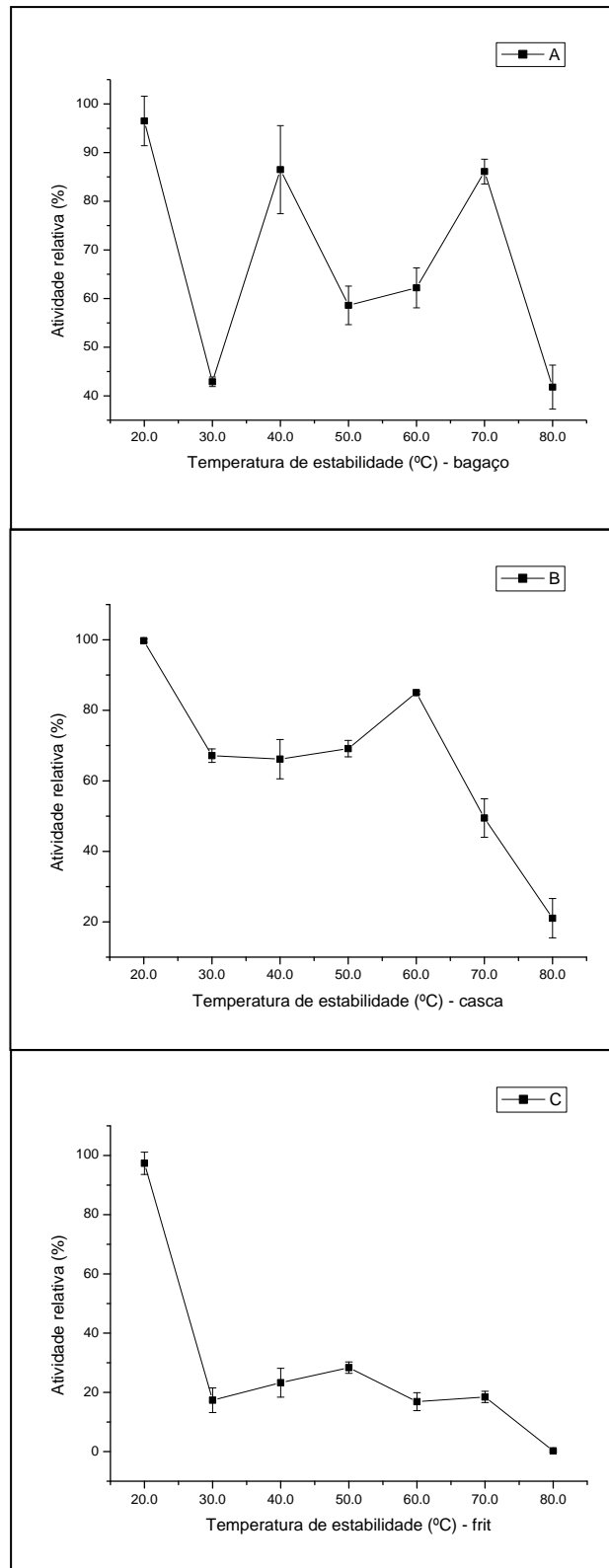


Figura 7. Estudo de temperatura de estabilidade para atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagação, B – casca e C - frit)

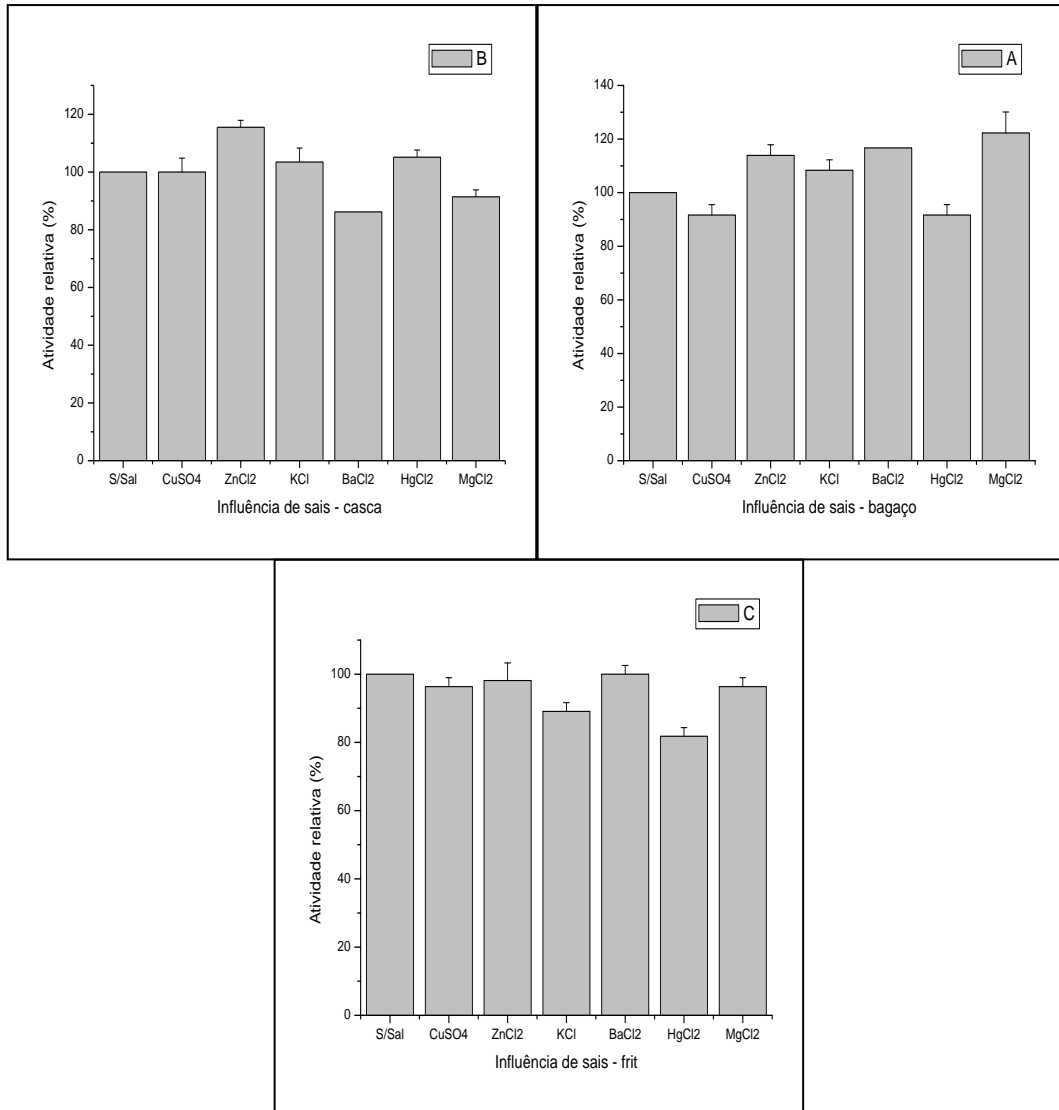


Figura 8. Estudo de influência de sais na atividade de lipase (extratos enzimáticos: A – bagaço, B – casca e C - frit)



Conclusão

Pela primeira vez, foi detectada a presença de lipases em subprodutos do processamento de suco de laranja. A facilidade de extração, aliada à abundância e baixo custo dessas fontes de lipases, juntamente com elevada atividade em ampla faixa de pH e temperatura e afinidade por diferentes substratos fazem dos subprodutos do processamento de suco de laranja fontes de lipases potenciais alternativas às lipases comerciais

Agradecimento

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao centro de pesquisa UNESP pelas bolsas e auxílios concedidos.

Referências bibliográficas

- Barros, M, Fleuri, L. F., Macedo, G. A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 27,15-29.
- 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.
- Crizel, T. M., Jablonski, A., Rios, A. O., Flores, S. H.T. (2013) Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer, *Food Science and Technology*, available online 14 February.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Mechichi, R. B. T., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Aloulou, A. (2013) Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232– 237.
- Enujiucha, V. N., Thani, F. A., Sanni, T. M.; Abigor, R. D. (2004) Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth), *Food Chemistry*, 88, 405-410.
- 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.



- 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.
- 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.
- Maldonado, R. R., Panciera, A. L., Macedo, G. A., Mazutti, A., Maugeri, F., Roddrigues, M. I. (2012) Improvement of lipase production from *Geotrichum* sp. in shaken flasks. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18, 459-464.
- Martí, N., Saura, D., Fuentes, E., Lizama, V., García, E., Mico-Ballester, M. J., Lorente, J. (2011) Fiber from tangerine juice industry. *Industrial Crops and Products*, 33, 94-98.
- Papagora, C., Roukas, T., Kotzekidou, P. (2013) Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, In press.
- Paques, F. W. & Macedo, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Quím. Nova* v.29, P. 93-99, 2006



CAPÍTULO 04: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS DE POLPA, CASCA E SEMENTE DE MANGA

Trabalho apresentado no formato de pôster no evento 10 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos.

RESUMO

A presença de enzimas lipolíticas foi observada em três partes da manga: casca, polpa e semente. As enzimas foram caracterizadas bioquimicamente e apresentaram atividade em ampla gama de pH a partir do ácido até neutro e maior atividade em temperaturas até 50°C. Houve influência na atividade dos extratos enzimáticos na presença de sais, chegando a 106% na presença de ZnCl₂ em extrato de polpa e a 20,2% na presença de MgCl₂ em extrato de semente. A casca e polpa possuem elevada atividade na hidrólise *p*-NPB. Pela primeira vez, foi detectada atividade de lipase em resíduos e polpa de manga, atingindo 160 U/g/min para o extrato bruto de casca.

Palavras-chave: *Mangifera indica*, pH ótimo, temperatura ótima, influência de sais

ABSTRACT

The presence of lipolytic enzymes was observed in three portions of the mango: peel, pulp and seed. The enzymes were characterized biochemically and showed activity in a wide range of pH from acidic to neutral and temperature with the highest activity at temperatures until 50°C. There was influence on the activity of the enzyme extract in the presence of salts, reaching 106% in the presence of ZnCl₂ in pulp extract and 20.2% in the presence of MgCl₂ in seed extract. The peel and pulp have high activity in the hydrolysis *p*-NPB. For the first time, lipase activity was detected in waste of mango, reaching 160 U / g / min for the crude extract of peel.

Keywords: *Mangifera indica*, optimum pH, optimum temperature, influence of salts



Introdução

A manga é a segunda fruta tropical mais produzida no mundo, a Índia é o maior produtor, correspondendo a cerca de 45% do total o que representa 15 milhões de toneladas, cultivando mais de 1.000 variedades. O Brasil é o sétimo, representando 3% do total produzido no mundo e o segundo maior exportador. A região brasileira que mais produz manga é a nordeste, principalmente o Submédio do Vale do São Francisco, no qual o cultivo utilizou cerca de 38.000 hectares no ano de 2011, desses aproximadamente 70% pertencem à Bahia. Em todo o país são cultivadas cerca de 200 variedades (FAO, 2012; Embrapa, 2010).

Apenas a polpa, cerca de 60% do fruto, é consumida, o restante que é constituído por cascas e sementes, representando cerca de 20% cada uma, ou seja, 40% dos frutos é considerado resíduo. Sua produção é sazonal, assim no auge da colheita há excesso de oferta do produto *in natura*, dessa forma o processamento e utilização da manga para fins não alimentícios poderia diminuir este problema. Essa fruta possui rica composição química, a qual varia de acordo com as condições da cultura, variedade, estágio de maturação e outros fatores, sendo constituída principalmente de água, carboidratos, ácidos orgânicos, sais minerais, proteínas, lipídeos, vitaminas (principalmente ácido ascórbico) e carotenoides e outros pigmentos (Ma et al., 2011).

Entre as enzimas presentes estão as lipases, também denominadas triacilglicerol acilhidrolases, que catalisam a hidrólise de ligações ésteres carboxílicas em lipídeos e desempenham importante papel em reações de síntese de substratos não aquosos (esterificação e alcoólise, por exemplo), podendo ser aplicadas na produção de biodiesel, fármacos quirais, biossurfactantes, aromas, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos. Essas enzimas possuem alto valor e ampla possibilidade de aplicação o que tem aumentado o interesse por pesquisas com fontes alternativas (Barros et al., 2010).

Considerando a composição dos frutos de manga esse estudo avaliou seu potencial como fonte de enzimas lipolíticas, pela medição da atividade dessas enzimas nas diferentes partes do fruto. A especificidade, o pH e a temperatura ótimos e de estabilidade e especificidade são parâmetros bioquímicos importantes a serem determinados para uma enzima, pois, permitem vislumbrar de qual biocatalisador se trata, bem como destinar a melhor aplicação para este. O estudo separado de cada fração de subprodutos possibilita a análise do potencial individual, o que pensando em processos em larga escala de obtenção é interessante, visto que utilizando apenas a parte do fruto com maior atividade haveria maior rendimento em comparação com o uso do fruto inteiro ou frações misturadas o que poderia tornar o processo mais rentável.



O presente estudo realizou a caracterização bioquímica de lipases obtidas dos subprodutos de manga (casca e semente) e polpa de manga, com o intuito de verificar as condições ótimas de atividade, a partir das quais é possível prever suas aplicabilidades.

Material e métodos

Material

As mangas utilizadas nesse estudo pertencem a variedade Tommy Atkins, que é a variedade mais produzida e comercializada, foram produzidas no estado de São Paulo e foram divididas em 3 frações para a análise, sendo elas polpa, casca e semente.

Preparação do extrato enzimático

Cada fração foi analisada separadamente. Após o processamento, as matrizes foram embaladas, armazenadas por até 2 dias a 5°C, trituradas mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³, congeladas por 24 horas e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização foram novamente trituradas e depois armazenadas congeladas a aproximadamente -7°C.

A liofilização foi realizada com os objetivos de retirada de água do sistema, concentração enzimática e homogeneização da amostra. Após a trituração as amostras passaram por peneira 20 *mesh* com abertura 0,84mm.

Atividade da enzima

A atividade lipolítica das frações foi medida seguindo o método descrito por Lopes et al. (2011). Foi utilizado 5 mL do substrato composto por azeite de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (na proporção de 1:4, v/v), 3 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7.0) e 1g do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min à 40°C em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de solução acetona:etanol (1:1, v/v). Os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos lipídeos do azeite foram titulados com solução de NaOH (0,05 M) utilizando fenolftaleína como indicador. Para a avaliação da atividade, cada unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas anteriormente. Como as frações de manga são ácidas, para cada amostra foi analisado um branco de amostra, composto por extrato enzimático desnaturado por elevada temperatura



e pela adição da solução paralisadora antes do banho termostatizado. O resultado de cada branco de amostra obtido na titulação foi descontado da amostra correspondente. Foi analisado branco de reagentes (sem extrato enzimático) como garantia de que os resultados obtidos na titulação eram referentes à reação com os extratos enzimáticos e não dos ácidos presentes no substrato.

Influência do pH

Para o estudo do pH ótimo foi analisada a atividade lipolítica de cada fração em meio reacional semelhante ao utilizado no item 2.3, apenas diferenciando o pH da solução tampão. Foram testadas soluções tamponadas nos pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. O pH referente a maior atividade lipolítica foi considerado o pH ótimo (100% de atividade relativa). Para o estudo de pH de estabilidade foram utilizados o mesmo meio reacional anterior, porém as amostras permaneceram 24 horas na solução tampão antes da análise da atividade.

Influência da temperatura

A atividade lipolítica das frações foi analisada no meio reacional descrito no item 2.3, alterando apenas a temperatura do banho termostatizado. Foram medidas as atividades lipolíticas das frações nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C. Para verificação da termoestabilidade das frações de manga as amostras foram incubadas em diferentes temperaturas por 60 min antes da determinação da atividade de lipase.

Influência de sais

Os extratos enzimáticos foram testados quanto à influência dos seguintes sais: $MgCl_2$, $BaCl_2$, KCl , $ZnCl_2$ e $CuSO_4$. Cada sal foi testado separadamente, a atividade lipolítica de cada fração foi determinada em meio reacional e temperaturas semelhantes aos utilizados no item 2.3 diferindo apenas no tampão ao qual foi adicionado 0,01 M de sal.

Estudo de especificidade

O p-nitrofenil palmitato (pNPP) é composto por ácidos graxos de cadeia longa. A análise da atividade lipolítica das frações de manga foi realizada seguindo o método descrito por Mahadik et al. (2002) e Lopes et al. (2011). A mistura de reação composta por 0,9 mL de solução de substrato, 0,2 mL de tampão fosfato (pH 7,0 e 0,5 M) e 0,05 g de extrato enzimático foi incubada por 30 minutos à 40°C. Após o período de incubação as amostras foram



centrifugadas por 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 410 nm.

O p-nitrofenil laurato (pNPL) é um substrato sintético constituído por ácidos graxos de cadeia média. As frações de manga foram analisadas pelo método descrito por Gutarra et. al. (2009). A solução de substrato foi preparada utilizando-se 0,25 mL de pNPL 2,5 mM em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio (pH 7,0 e 0,5 M). A reação foi iniciada pela adição de 0,05 g do extrato enzimático e incubada por 15 minutos a 30°C. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 412 nm.

Os subprodutos foram analisados segundo o método descrito por Calado et al. (2002) e Lopes et al. (2011), para avaliar a sua afinidade para o substrato p-nitrofenil-butilato (pNPB). Uma alíquota de 0,05 g de cada fração foi adicionado a 3,43 mL de mistura de reacional constituída por 1,12 mM pNPB dissolvido em tampão de fosfato 50 mM (pH 7,2) contendo 0,2% de Triton X-100 e 0,43 M tetrahidrofurano. A reação foi incubada durante 15 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante de cada amostra foi lido em espectrofotômetro em absorvância no comprimento de 405 nm.

O equipamento foi zerado com branco de substrato.

Resultados e discussão

A atividade lipolítica de frações de manga foi analisada sob condições padrão, isto é, pH 7,0 e 40°C. Durante esta etapa, as atividades médias foram de 12,2 U/g para casca; 28,2 U/g para polpa e de 40,3 U/g para o semente. No estudo do pH ótimo a atividade máxima para a casca ocorreu em pH 7,0 correspondendo a 46,1 U/g (100% de atividade relativa) (Figura 1, A); para a polpa a atividade máxima foi de 53,7 U/g (100% de atividade relativa) em pH de 7,0, porém foi verificada atividade de 85% em pH 8,0 (Figura 1, B) e para a semente, o pico de atividade ocorreu em pH 6,0 correspondendo a 53,6 U/g (100% de atividade relativa) (Figura 1, C). O pH de maior estabilidade para a casca e polpa foi de pH 7,0 e para o semente de pH 6,0 (Figura 2).

No estudo de temperatura ótima a casca apresentou maior atividade entre 20°C e 30°C correspondendo a 155,7 U/g (100% de atividade relativa) a 30°C (Figura 3, A); a polpa



apresentou dois picos de atividade, o maior a 20°C com 52,4 U/g (100% de atividade relativa) e outro a 50°C correspondendo a 40,4 U/g (Figura 3, B) e a semente também apresentou dois picos de atividade, sendo o maior a 40°C com 59,3 U/g (100% de atividade relativa) e outro a 20°C com 77% de atividade relativa (Figura 3, C). No estudo de temperatura de estabilidade a casca mostrou-se mais estável na faixa entre 20°C e 40°C com atividade de 76,0 U/g (100% de atividade relativa), porém a 50°C continuou com elevada atividade correspondendo a 75% de atividade relativa (Figura 4, A); a polpa apresentou maior estabilidade a 30°C com 57,3 U/g, porém a 60°C continuou com elevada atividade correspondendo a 54,7% de atividade relativa (Figura 4, B) e a semente apresentou maior estabilidade a 40°C correspondendo a 61,2 U/g (100% de atividade relativa) baixando muito sua estabilidade a partir de 50°C, na qual sua atividade correspondeu à 16,8% (Figura 4, C).

Durante o estudo de influência de sais foi verificada a diminuição da atividade lipolítica da casca na presença de ZnCl₂ e CuSO₄ cerca de 85,6% de atividade relativa e na de HgCl₂ com cerca de 91,7% de atividade relativa. Foi verificado o aumento na atividade correspondendo a aproximadamente 103% na presença de KCl, BaCl₂ e MgCl₂. Para a polpa houve diminuição na presença de KCl (79,8% de atividade relativa) e na de HgCl₂ (72,5% de atividade relativa) e houve aumento na presença de CuSO₄ e ZnCl₂ (102% e 106%, respectivamente). Para semente houve diminuição na presença de CuSO₄ (72,4% de atividade relativa), ZnCl₂ (84,4% de atividade relativa), KCl (51,8%), BaCl₂ (44,5%), HgCl₂ (48,9%), e MgCl₂ (20,2%). Os resultados detalhados sobre a influência de sais podem ser verificados na Figura 5.

Os resultados relativos à especificidade das lipases demonstraram que a casca e semente não têm atividade na hidrólise de *p*-nitrofenol de palmitato (*p*-NPP), porém possuem elevada atividade na hidrólise de *p*-nitrofenol de butirato (*p*-NPB). A casca também possui atividade em *p*-nitrofenol de laurato (*p*-NPL). Os resultados detalhados deste estudo estão apresentados na Tabela 1.

Há vários estudos sobre aplicações dos subprodutos do processamento de suco de manga, como o de Crizel et al. (2013), o qual analisa a utilização dos subprodutos como fonte de fibras ou como meio de cultura para micro-organismos produtores de muitos compostos, como no estudo de Jawad et al. (2013) sobre produção de ácido láctico por fermentação de casca de manga. Até à presente data, no entanto, não há registros de uso dessas matrizes como uma fonte de lipases. Comparado com outras lipases vegetais, as encontradas nos subprodutos de manga são bioquimicamente semelhantes às encontradas em sementes de feijão Africano descrito por



Enjiughá et al. (2004), os quais demonstraram atividade ótima em pH alcalino e atividade máxima a temperaturas entre 20°C e 30°C. Em relação à atividade as lipases de subprodutos de manga apresentaram atividade menor que das lipases de látex do gênero *Euphorbia* descritas no estudo de Paques e Macedo (2006), entretanto, estas plantas são ornamentais e possuem cultivo restrito o que torna impraticável sua utilização para aplicações em larga escala. As lipases de manga obtidas neste estudo apresentaram atividade consideravelmente maior em comparação com as lipases microbianas relatadas por Abdelmoez et al. (2013) de 12 U/mL, Daoud et al. (2013) de 5 U/mL; Papagora et al. (2013) de 7,44 U/mL e de Maldonado et al. (2012) de 16 U/mL.



Tabela 5. Atividade de lipase de manga em emulsão de goma arábica e *p*-NP-ésteres

Substratos e condições de reação	Casca	Polpa	Semente
Goma arábica, pH 7,0, 40°C, 30 min	12,2 ± 1,41	28,2 ± 1,97	40,3 ± 1,83
Goma arábica, pH ótimo (7 – casca e polpa e 6 - semente)	46,1 ± 0,28	53,7 ± 0,91	53,6 ± 0,56
Goma arábica, T ótima (20°C para casca, 30°C para polpa e 40°C para semente)	155,7 ± 1,27	52,4 ± 1,13	59,3 ± 1,41
<i>p</i> -NPP	0,00	0,00	0,00
<i>p</i> -NPB	4,305 ± 0,96	12,73 ± 0,07	5,76 ± 0,37
<i>p</i> -NPL	1,01 ± 0,55	0,00	0,98 ± 0,43

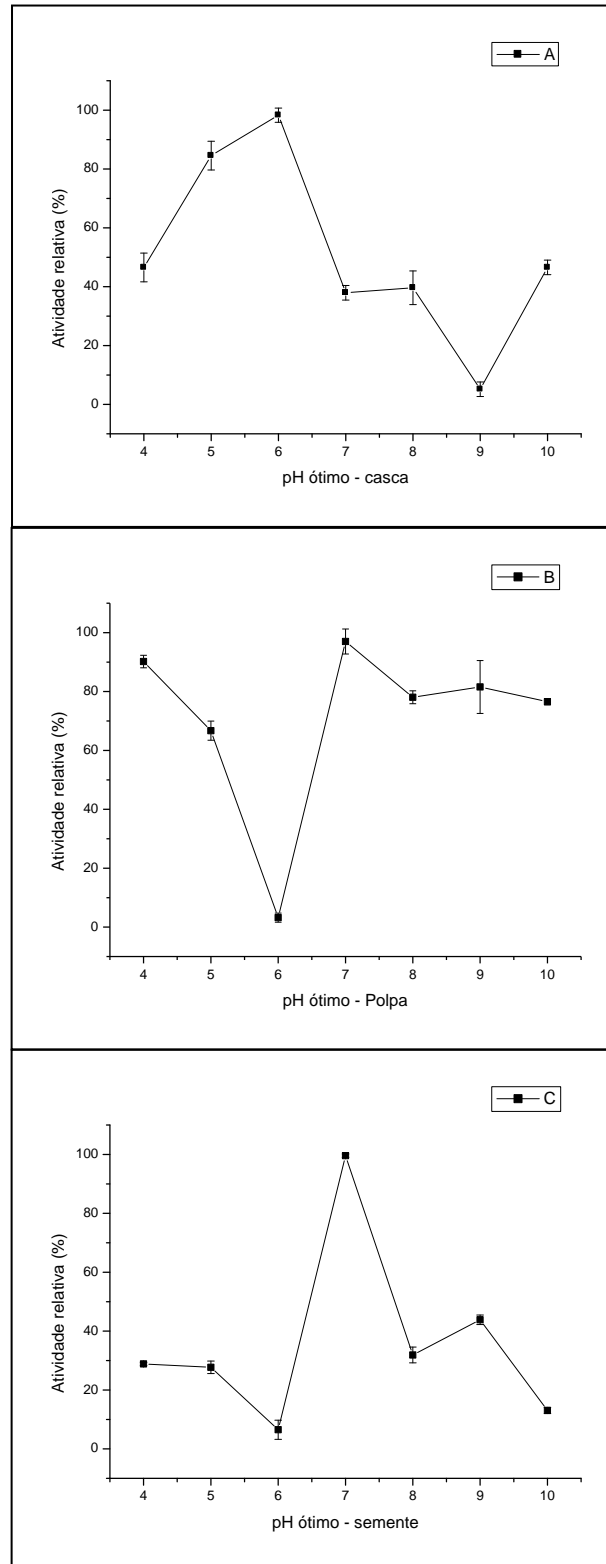


Figura 9. Estudo de pH ótimo para atividade de lipase de manga (A - casca, B - polpa e C - semente)

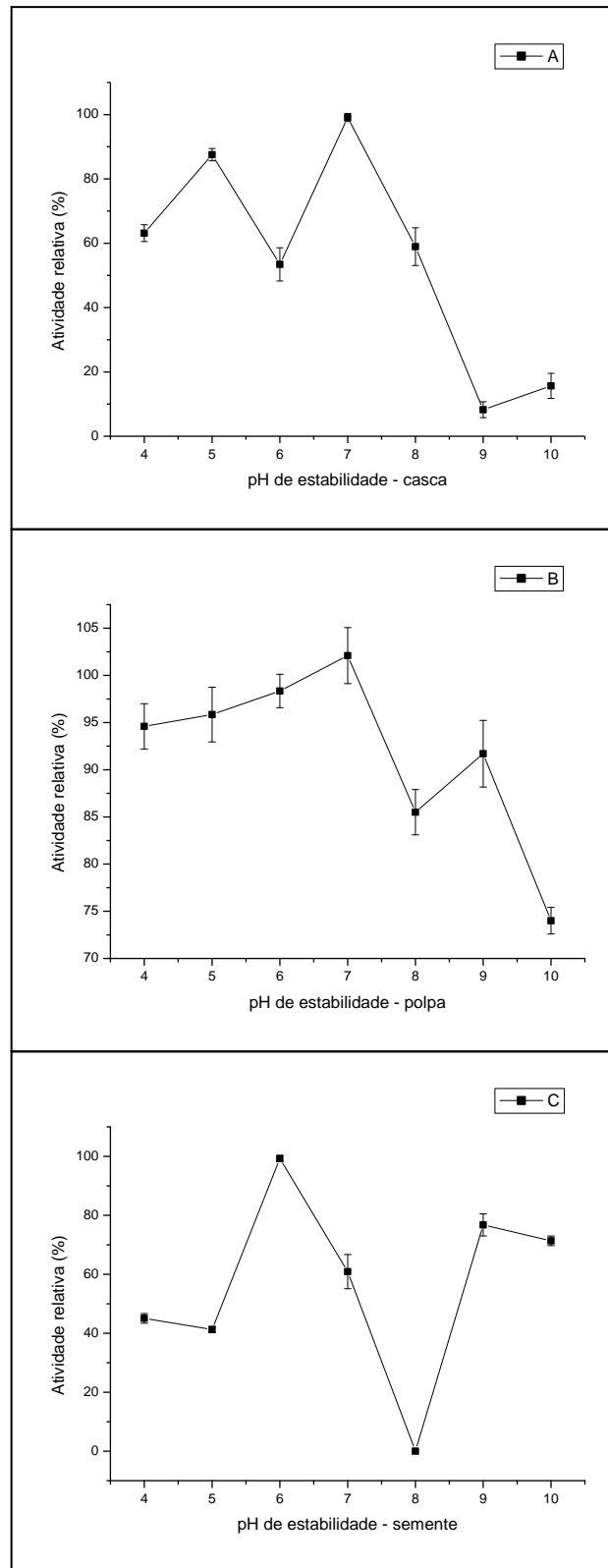


Figura 10. Estudo de pH de estabilidade para atividade de lipase de manga (A - casca, B - polpa e C - semente)

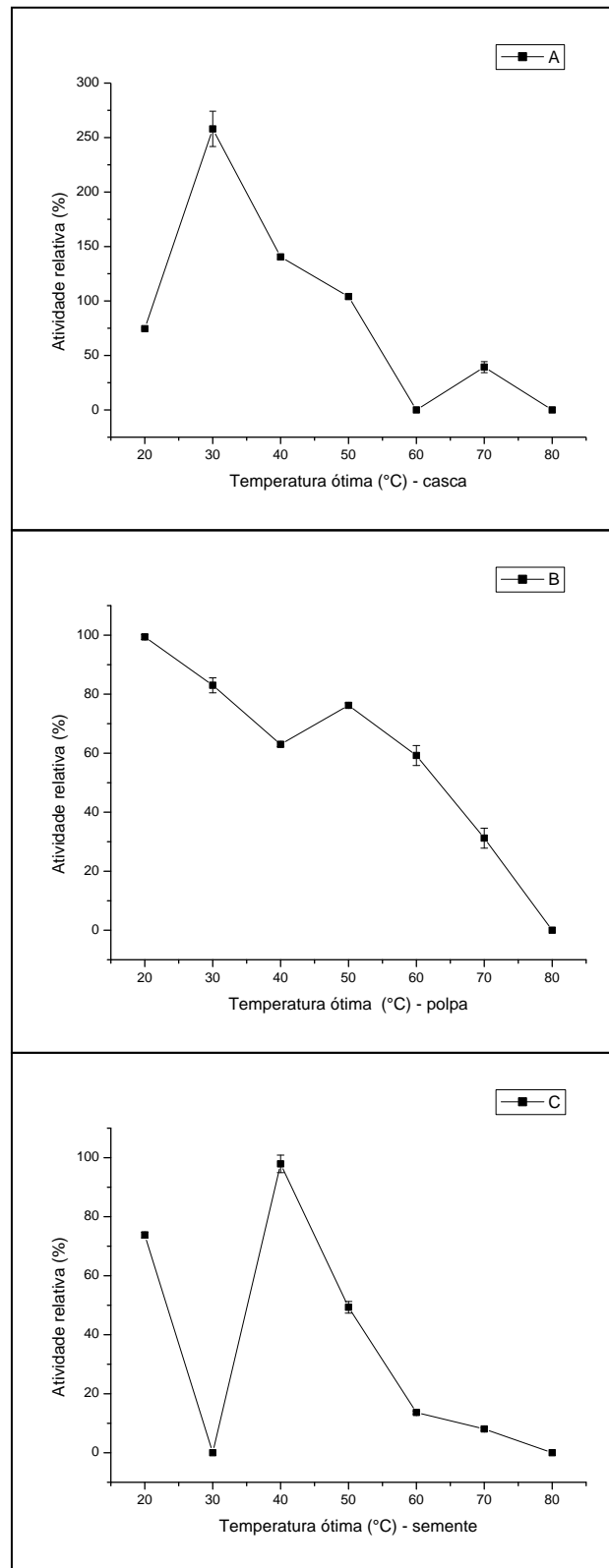


Figura 11. Estudo de temperatura ótima para atividade de lipase de manga (A - casca, B - polpa e C - semente)

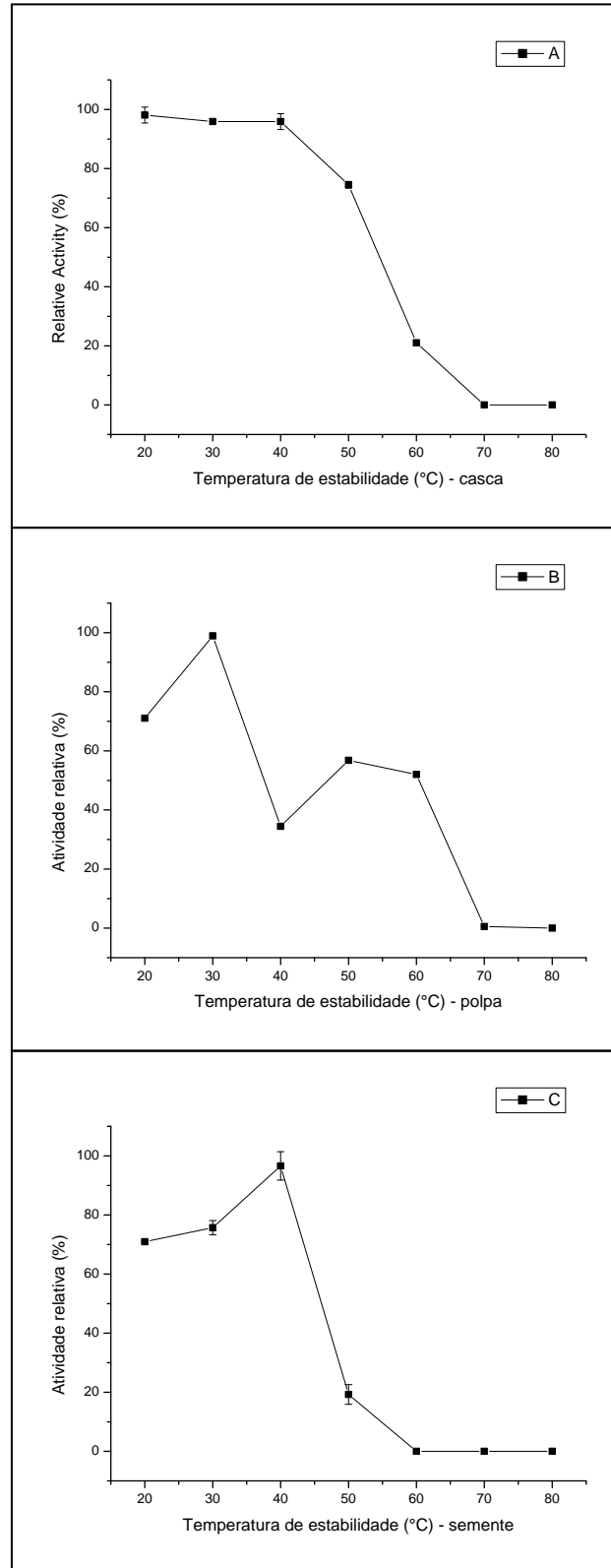


Figura 12. Estudo de temperatura de estabilidade para atividade de lipase de manga (A - casca, B - polpa e C - semente)

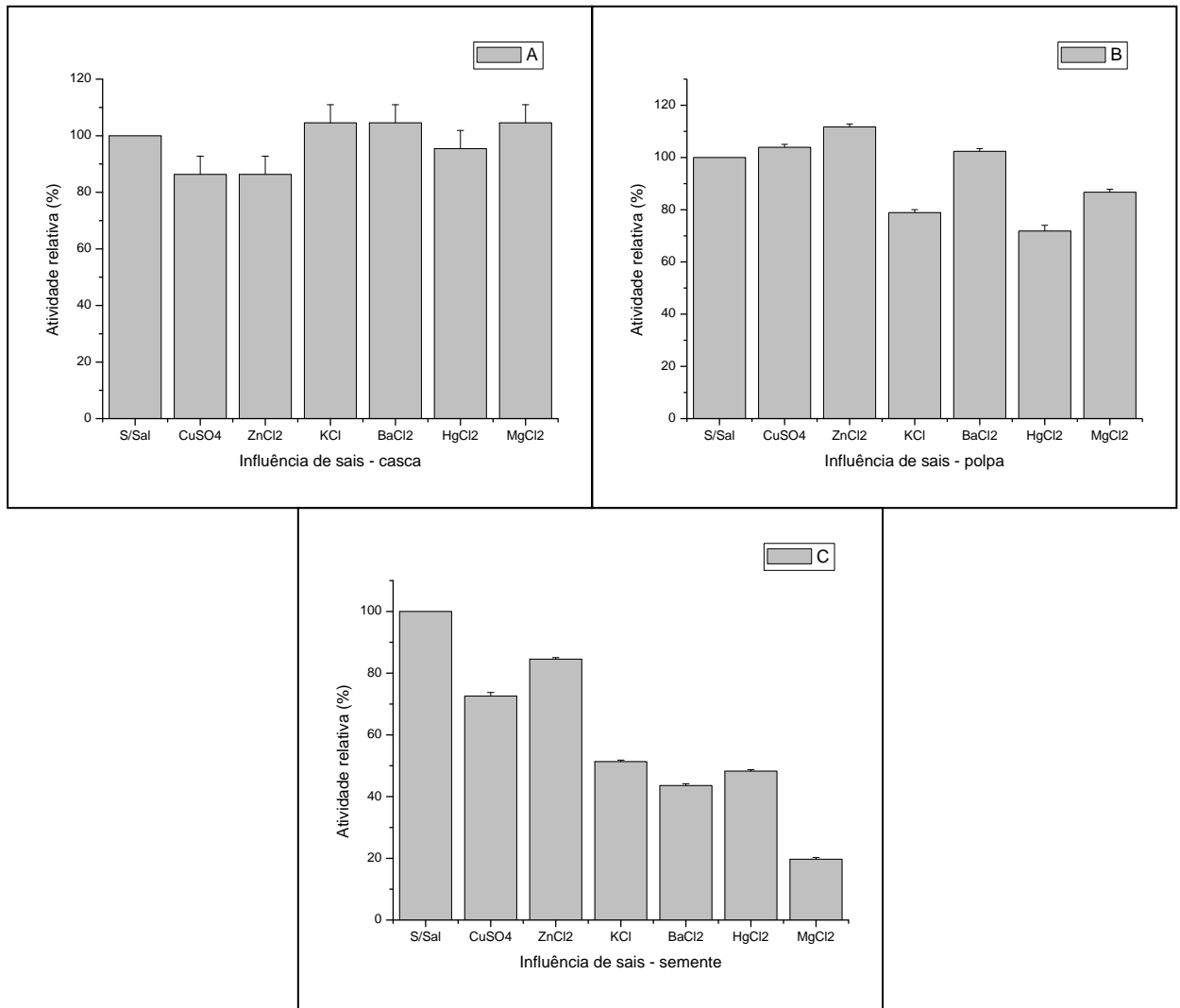


Figura 13. Estudo de influência de sais na atividade de lipase de manga



Conclusão

Pela primeira vez, a presença de lipases em resíduos de polpa de manga foi detectada. A facilidade de extração de enzimas lipolíticas, o baixo custo e abundância das matrizes correspondentes, juntamente com a elevada atividade das lipases em ampla faixa de pH e de temperaturas e a afinidade por diferentes tipos de substratos, fazem dessas enzimas alternativas potenciais às lipases comerciais.

Agradecimento

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao centro de pesquisa UNESP pelas bolsas e auxílios concedidos.

Referências bibliográficas

- Abdelmoez W., Mostafa N. A., Mustafa A. (2013) Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production* 59:290-297.
- Barros, M, Fleuri, L. F., Macedo, G. A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 27,15-29.
- 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.
- Crizel, T. M., Jablonski, A., Rios, A. O., Flores, S. H.T. (2013) Dietary fiber from orange byproducts as a potential fat replacer, *Food Science and Technology*, available online 14 February.
- Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Mechichi, R. B. T., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Aloulou, A. (2013) Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase, *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232– 237.
- Enujiucha, V. N., Thani, F. A., Sanni, T. M.; Abigor, R. D. (2004) Lipase activity in dormant seeds of the African oil bean (*Pentaclethra macrophylla* Benth), *Food Chemistry*, 88, 405-410.



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.

Jawad A. H., Alkarkhi A. F. M., Jason O. C., Easa A. M., Norulaini N. A. N. (2013) Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. *Journal of King Saud University – Science* 25:39–45

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.

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.

Maldonado, R. R., Panciera, A. L., Macedo, G. A., Mazutti, A., Maugeri, F., Rodrigues, M. I. (2012) Improvement of lipase production from *Geotrichum* sp. in shaken flasks. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 18, 459-464.

Papagora, C., Roukas, T., Kotzekidou, P. (2013) Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, In press.

Paques, F. W. & Macedo, G. A. Plant lipases from latex: properties and industrial applications. *Quím. Nova* v.29, P. 93-99, 2006



CAPÍTULO 05: APLICAÇÃO DE LIPASES VEGETAIS EM REAÇÕES DE HIDRÓLISE, ALCOÓLISE E ESTERIFICAÇÃO

Clarissa Hamaio Okino Delgado, Luciana Francisco Fleuri

RESUMO

O presente estudo avaliou o desempenho de lipases provenientes de seis subprodutos de manga e laranja na catálise das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Todas as matrizes foram capazes de catalisar as reações de hidrólise e esterificação, chegando a taxa de 58,5% de esterificação do ácido oleico. Cinco matrizes foram capazes de catalisar a reação de alcoólise, sendo elas casca e polpa de manga em óleo de milho, polpa e semente de manga em óleo de soja e *frit* de laranja em óleo de soja.

Palavras chave: *Citrus sinensis*, *Mangifera indica*, enzimas lipolíticas, aplicação

ABSTRACT

The present study evaluated the performance of lipases from six byproducts of mango and orange in the catalysis of the hydrolysis, esterification and transesterification. All matrices were able of catalyzing hydrolysis and esterification, reaching rate of esterification of 58.5% on oleic acid. Five matrices were able to catalyze the alcoholysis reaction, mango peel and pulp in corn oil, mango seed and pulp in soybean oil and orange frit in soybean oil.

Keywords: *Citrus sinensis*, *Mangifera indica*, lipolitic enzymes, application



Introdução

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes. A modificação dessas estruturas possibilita um número indeterminado de aplicações em diversas áreas como na modificação de óleos, na indústria de detergentes, na indústria de química fina, na produção de aromas, na panificação, em agroquímicos, biorremediação, entre outros. O uso de enzimas lipolíticas nesse cenário tem se mostrado boa opção, pois além das vantagens como atividade em condições brandas e menor geração de resíduos, essas são específicas tornando possível a realização de reações que não ocorreriam ou ocorreriam de maneira ineficiente pelo uso de compostos químicos. As estruturas dos lipídeos estão diretamente ligadas às suas propriedades físicas e organolépticas, assim, diferentes estruturas podem ser modificadas com o intuito de atingir metas biotecnológicas. A modificação da composição de ácidos graxos e esteroides, por exemplo, pode modificar o valor nutricional de óleos e gorduras, assim como alterações no tamanho e grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos pode modificar o ponto de fusão (Barros et al., 2010; Hasan et al., 2006; Castro et al., 2004).

As lipases catalisam diferentes reações. A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise da ligação éster do triglicerídeo, produzindo glicerol e ácidos graxos. Esta reação ocorre via hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma que, num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis. O tipo e a posição estereoespecífica do resíduo de ácido graxo estão relacionados com a elevada especificidade das lipases, o que possibilita um grande número de aplicações. As lipases são também capazes de catalisar reações reversas em condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação), dependendo dos reagentes utilizados no início da reação. Outros compostos, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos (Oliveira et al., 2004; Castro et al., 2004).

A reação de esterificação é, em sua essência, a reação inversa da hidrólise, ocorrendo entre alcoóis poli-hídricos e ácidos graxos livres do glicerídeo correspondente. A relação entre



as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação (Carvalho et al., 2003).

A transesterificação é a troca de radicais acil entre compostos, quando ocorrem entre um éster e um ácido é denominada acidólise, um éster e um álcool de alcoólise e um éster e outro éster é chamada de interesterificação. Nestas reações um ácido graxo, um álcool ou outro éster, reagem com o glicerídeo, resultando no rearranjo dos grupos de ácidos graxos produzindo novo glicerídeo com propriedades físicas e químicas diversas (Carvalho et al., 2003; Pereira et al., 2003).

As lipases podem ser obtidas de inúmeras fontes vegetais, animais e microbianas, geralmente cada tipo de lipase possui afinidade pela catálise de determinada reação. Por isso, para vislumbrar quais reações as lipases são capazes de catalisar são necessários testes de aplicabilidade em diferentes reações. Assim, o presente estudo avaliou a aplicabilidade, *in vitro*, de lipases obtidas de subprodutos do processamento de laranja e manga nas reações de hidrólise, esterificação e alcoólise, visando vislumbrar as possibilidades de aplicação dessas enzimas.

Material e métodos

Material

Foram utilizados três subprodutos do processamento de laranja e três partes da manga.

As laranjas utilizadas nesse processo pertencem à espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck variedade Pêra, cultivada no estado de São Paulo. Foram utilizados três subprodutos do processamento de suco de laranja, denominados casca, bagaço e *frit*.

As mangas utilizadas nesse estudo pertencem a variedade Tommy Atkins, que é a variedade mais produzida e comercializada. Essa fruta foi produzida no estado de São Paulo e foi dividida em 3 frações para a análise, sendo elas polpa, casca e semente.

Cada fração foi analisada separadamente. Após o processamento, as matrizes foram embaladas, armazenadas por 2 dias a 5°C, trituradas mecanicamente até atingir granulometria homogênea de 0,5 cm³, congeladas por 24 horas e liofilizadas por 48 horas. Após a liofilização foram novamente trituradas e depois armazenadas congeladas a aproximadamente -7°C.

Reações de hidrólise

Foram utilizados óleo de soja, milho e girassol com água para estudo da reação de hidrólise. Cada óleo foi analisado separadamente, em sistema reacional composto por 70% de



óleo, 30% de água e 2 % de extrato enzimático. Os frascos foram incubados em banho de agitação recíproca a 100 oscilações por minuto a 40°C por 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas. A reação foi paralisada e titulada com solução de NaOH 0,05 mol/L aquosa, utilizando fenolftaleína como indicador (Lopes et al., 2011). Para cada amostra foi preparada um branco da amostra, constituída pelo mesmo meio reacional e extrato enzimático desnaturado por calor. A porcentagem de hidrólise foi calculada, conforme Equação 1.

$$\text{Equação 1: \% Hidrólise} = \frac{A \times B}{C \times D} \times 100; \text{ onde:}$$

A: Volume de NaOH (ml)

B: Concentração Molar do NaOH x Massa Molar de NaOH

C: Massa do Óleo (g)

D: Índice de Saponificação do Óleo

Reações de esterificação

Foi utilizado o ácido oleico com o etanol para o estudo das reações de esterificação. Foi criado um sistema reacional composto por 1:5 moles de ácido e etanol, respectivamente, mais 2% de extrato enzimático e incubados em banho de agitação recíproca a 100 oscilações por minuto a 40°C durante 7 dias. Foi preparado um sistema de reação e um branco (sem adição da enzima) para cada tempo de reação. A reação foi paralisada adicionando-se 5 mL de acetona:etanol (1:1, v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH 0,5 mol/L aquosa, utilizando fenolftaleína como indicador (Fleuri e Macedo, 2009). A porcentagem de esterificação foi calculada conforme Equação 2.

$$\text{Equação 2: \% Esterificação} = \frac{A \times B \times C \times D}{10 \times E} \times 100; \text{ onde:}$$

A: Índice de saponificação do óleo



B: Concentração molar do NaOH

C: Massa molar do ácido graxo

D: Volume NaOH (mL)

E: massa da alíquota (g)

Reações de alcoólise

Foram utilizados os óleos de soja, milho e girassol com etanol para o estudo das reações de alcoólise. Foi criado o sistema reacional composto de 1:1 moles de óleo e etanol mais 2% de extrato enzimático e incubado em banho de agitação recíproca a 100 oscilações por minuto a 40°C por 72 horas. Posteriormente foi adicionado 0,5 mol de etanol às 24 horas e 48 horas. Foi preparado um controle (sem adição da enzima) para cada óleo estudado.

Os produtos de reação resultantes foram analisados por cromatografia em camada delgada, em placas de sílica gel, utilizando como fase móvel éter de petróleo:éter etílico: ácido fórmico na proporção de 210:90:0,4 (v:v:v) à temperatura de 25°C, e como revelador ácido sulfúrico (10%) em etanol, seguido de aquecimento a 100°C. Os ésteres etílicos (produtos da reação de alcoólise) foram comparados com padrão composto por palmitato de etila.

O fator de retenção (Rf) foi utilizado como fator de comparação, o qual foi calculado conforme Equação 3.

$$\text{Equação 3: } R_f = \frac{d_c}{d_{fm}}; \text{ onde}$$

d_c : distância percorrida pelos componentes da mistura.

d_{fm} : distância percorrida pela fase móvel.

Resultados e discussão

Todas as matrizes testadas foram capazes de catalisar a reação de hidrólise dos três óleos utilizados como substrato, porém em baixas taxas; havendo, portanto, a necessidade de incrementar o meio reacional com mais lipase ou estudar outras condições. Os extratos de casca e bagaço de laranja obtiveram melhores taxas de catálise em óleo de soja após 24 horas de incubação, chegando a 2,5% e 2,8% (Figura 1 e Figura 2, respectivamente). Para *frit* de laranja



o melhor resultado ocorreu a partir de 4 horas de incubação para os três óleos, chegando a 1,8% para óleo de milho após 8 horas de incubação (Figura 3). Entre as matrizes de manga, o extrato de casca atingiu melhor desempenho chegando a 3,3% em óleo de soja após 2 horas de incubação (Figura 4); o de polpa após 24 horas de incubação para óleo de soja correspondendo a 3,1% (Figura 5) e o de semente após 24 horas de incubação para óleo de girassol chegando a 1,8% (Figura 6). Os resultados do teste de hidrólise foram baixos quando comparados com estudos semelhantes relatados por Abdelmoez et al. (2013), no qual a lipase de *Candida rugosa* ATCC 14830 foi capaz de hidrolisar até 39,5% dos triglicerídeos de óleo de girassol, porém esse resultado foi obtido com elevada concentração enzimática (cerca de 168% em relação ao meio reacional). No presente estudo utilizamos a concentração de 2% de extrato enzimático bruto, assim, consideramos que caso aumentássemos a concentração das enzimas no meio reacional hipoteticamente aumentaríamos a porcentagem de hidrólise.

No estudo de esterificação, utilizando o ácido oleico como substrato, os extratos de bagaço e *frit* de laranja (Figura 7) e casca e polpa de manga (Figura 21) apresentaram resultados promissores, enquanto as matrizes de casca de laranja e semente de manga apresentaram resultados inferiores a 5 % de esterificação em todos os períodos de incubação. Os extratos de bagaço e *frit* de laranja apresentaram bons resultados a partir de 96 horas de incubação, chegando a 41,0% após 144 horas de incubação para o bagaço e a 40,2% para *frit* (Figura 7, B e C). Os extratos de casca e polpa de manga também apresentaram melhores resultados a partir de 96 horas de incubação, o que correspondeu a 32,8% para casca de manga após 144 horas de incubação e a 58,5% para polpa de manga, após 144 horas de incubação (Figura 21, B e C). Comparando com enzimas comerciais ou microbianas como as descritas no trabalho de Shuang-



Van *et al.* (2011) o desempenho dos extratos enzimáticos apresentados neste trabalho é similar aos encontrados para as lipases microbianas, porém inferior a preparação comercial Lipozyme (87% de esterificação). Entretanto, vale ressaltar que o presente trabalho não incluiu etapas de concentração, purificação e/ou imobilização, o que poderia melhorar o desempenho das lipases de manga *home-made*.

Os resultados do estudo de alcoólise são qualitativos, dessa maneira, o resultado foi considerado positivo para catálise da reação de alcoólise quando a corrida do extrato enzimático ficou acima do branco e próximo ao padrão, caracterizando a presença de ésteres etílicos, os quais são produtos da alcoólise de óleos vegetais e álcool etílico. Foram testados 6 extratos enzimáticos em 3 óleos diferentes, totalizando 18 combinações (tipo de extrato - tipo de óleo). Dessas, apenas 5 combinações obtiveram resultados positivos, sendo elas: casca e polpa de manga em óleo de milho (Figura 9), polpa e semente de manga em óleo de soja (Figura 10) e *frit* de laranja em óleo de soja (Figura 10). A reação de alcoólise pode ser utilizada na conversão de óleos vegetais em biodiesel, convertendo triglicerídeos e etanol em ésteres etílicos, por exemplo. Há estudos sobre lipases de origem microbiana para aplicação na produção de biodiesel, como o de Shah *et al.* (2004) sobre o uso de lipases produzidas por *Chromobacterium viscosum*, no qual as condições requeridas para a reação são similares, porém, nesse estudo foi necessária a adição de água ao meio reacional.

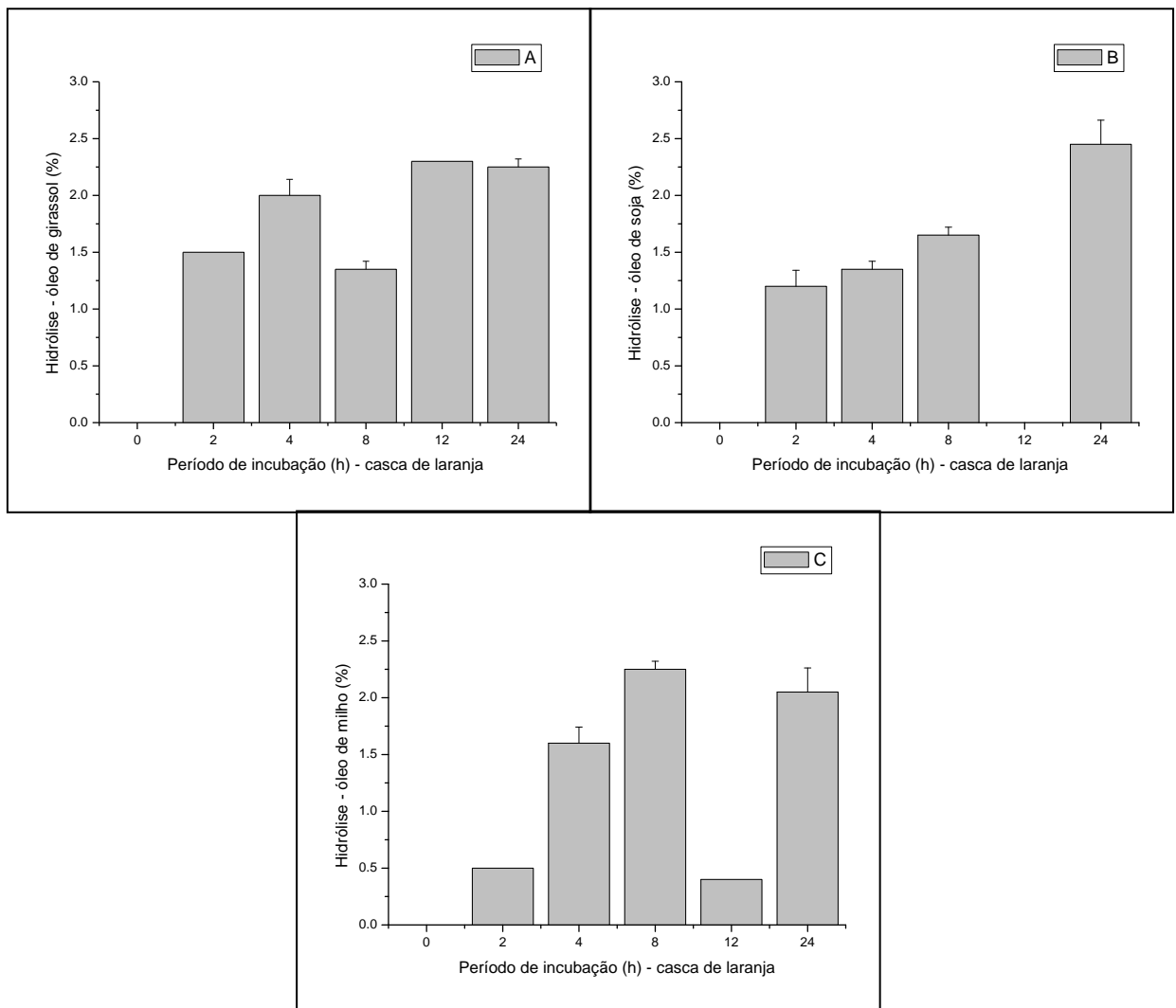


Figura 14. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de casca de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

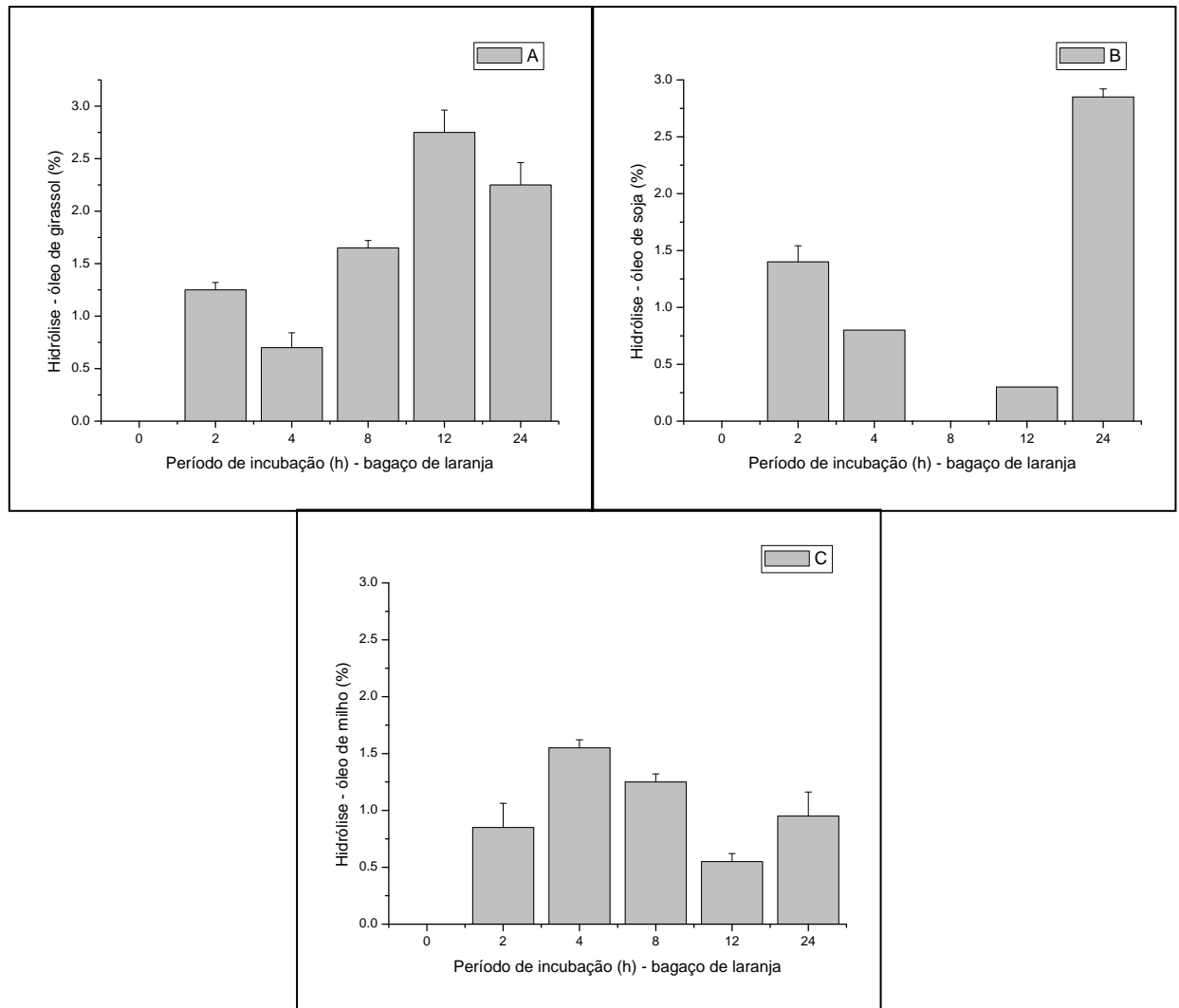


Figura 15. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de bagaço de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

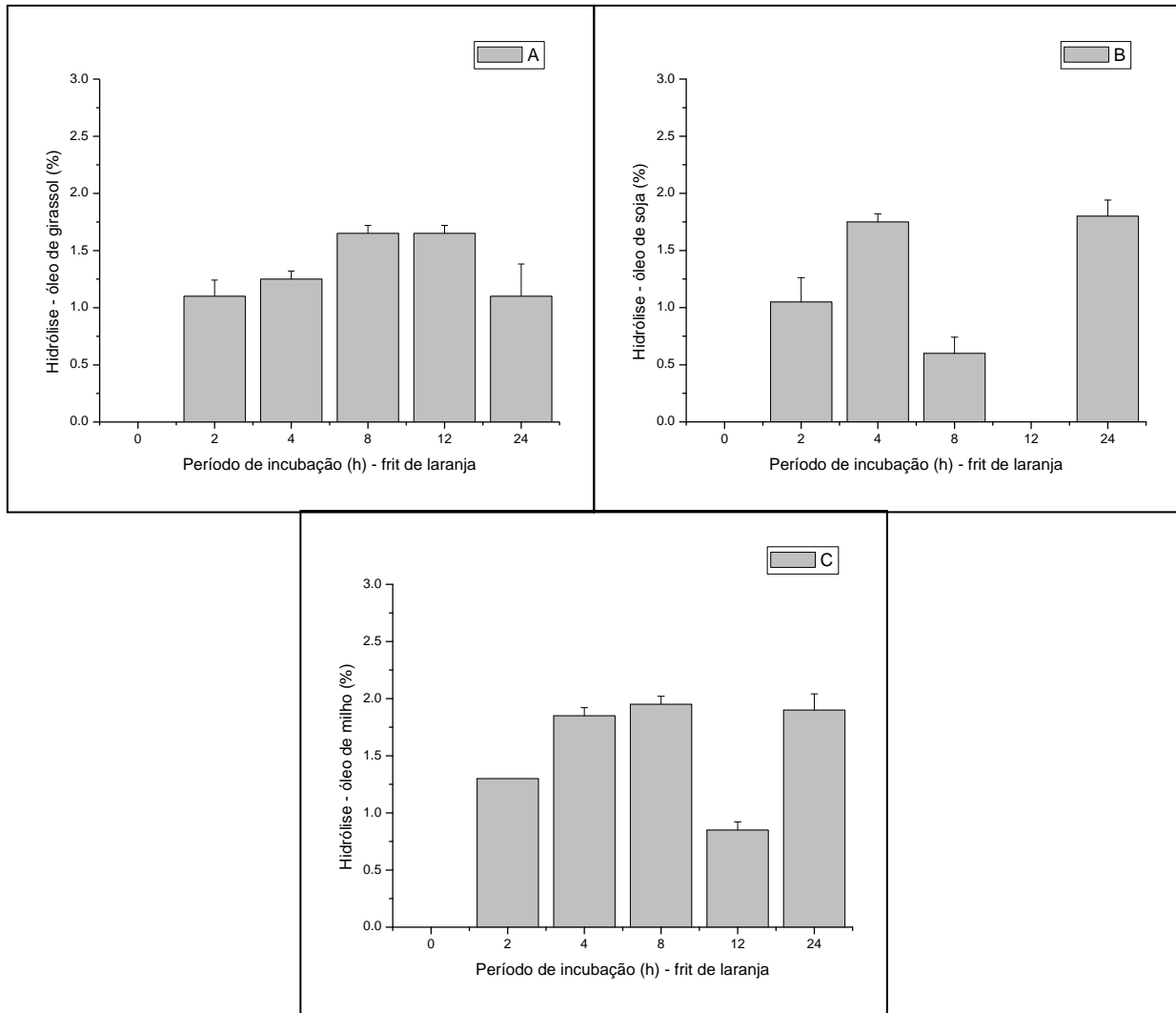


Figura 16. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de frit de laranja (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

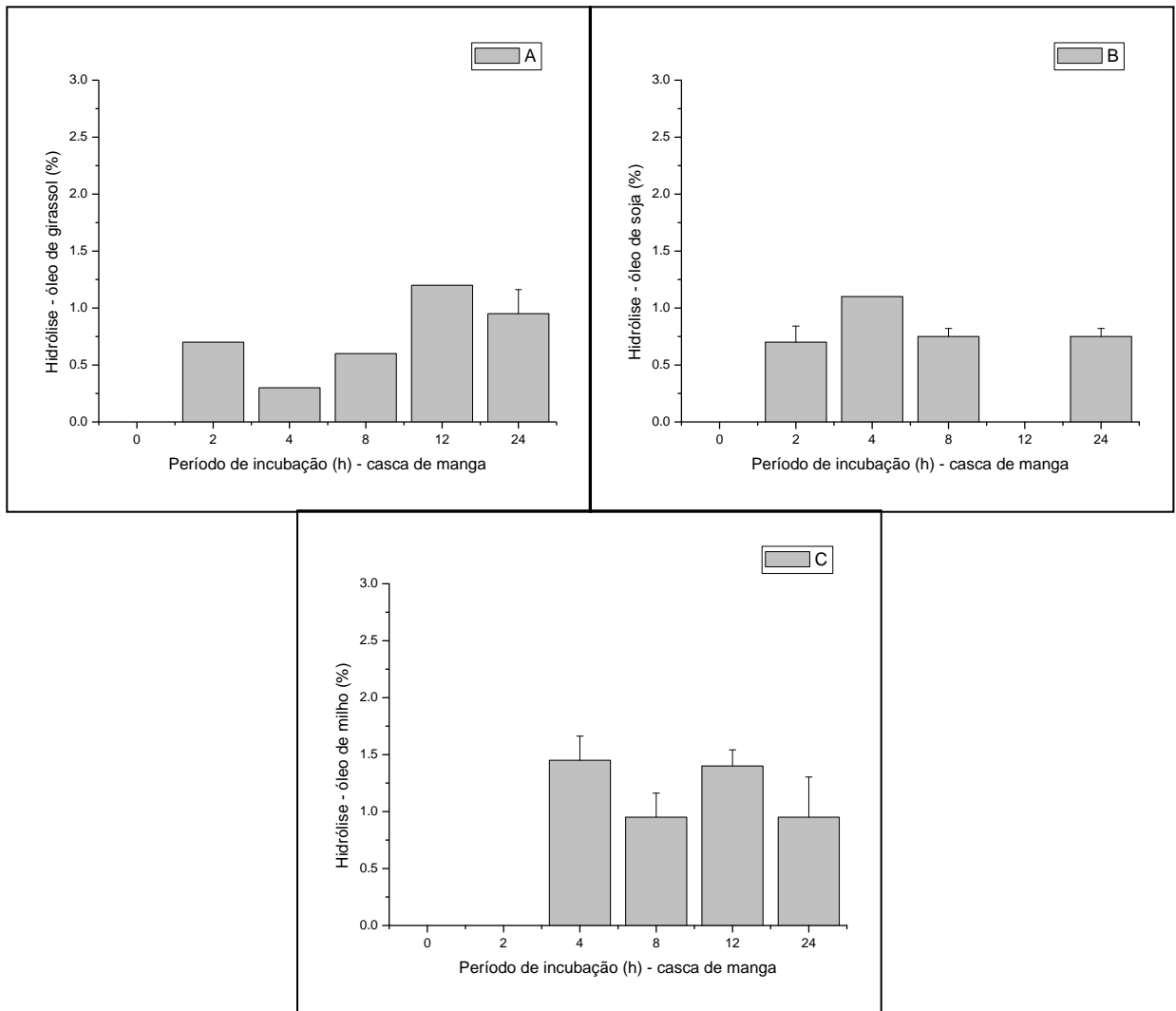


Figura 17. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de casca de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

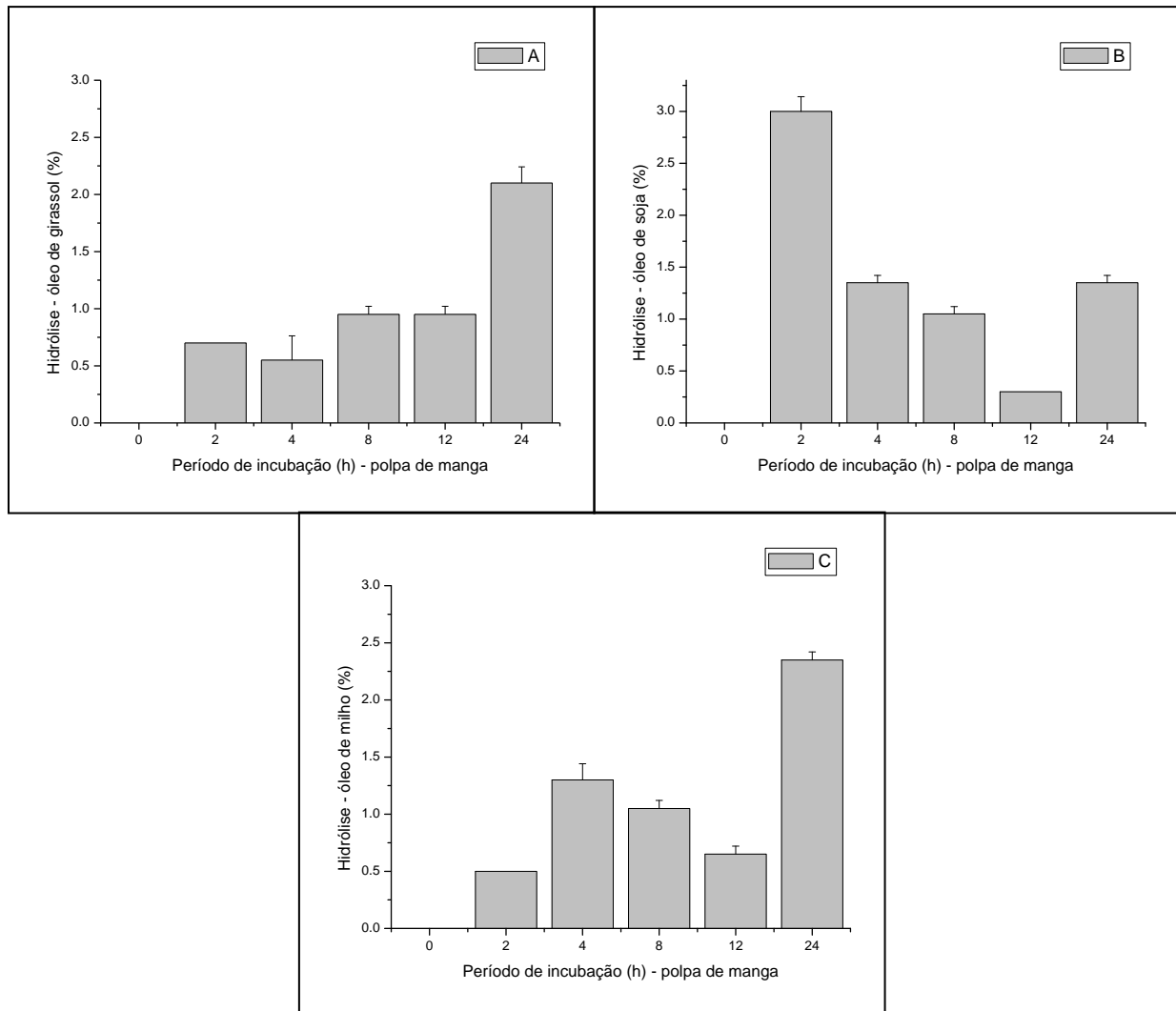


Figura 18. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de polpa de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

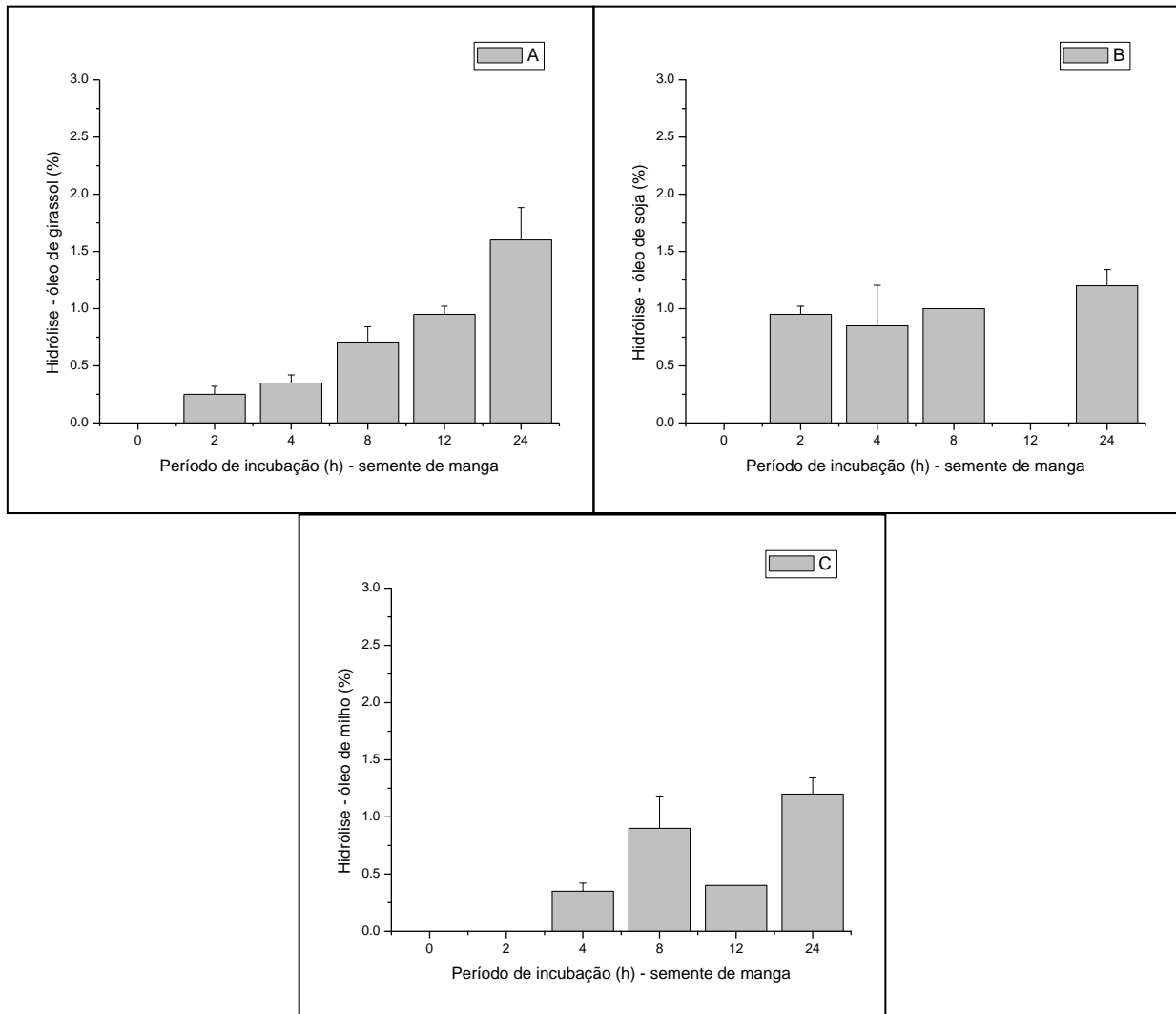


Figura 19. Hidrólise de óleos vegetais catalisada por extrato enzimático de semente de manga (A – óleo de girassol, B – óleo de soja e C – óleo de milho)

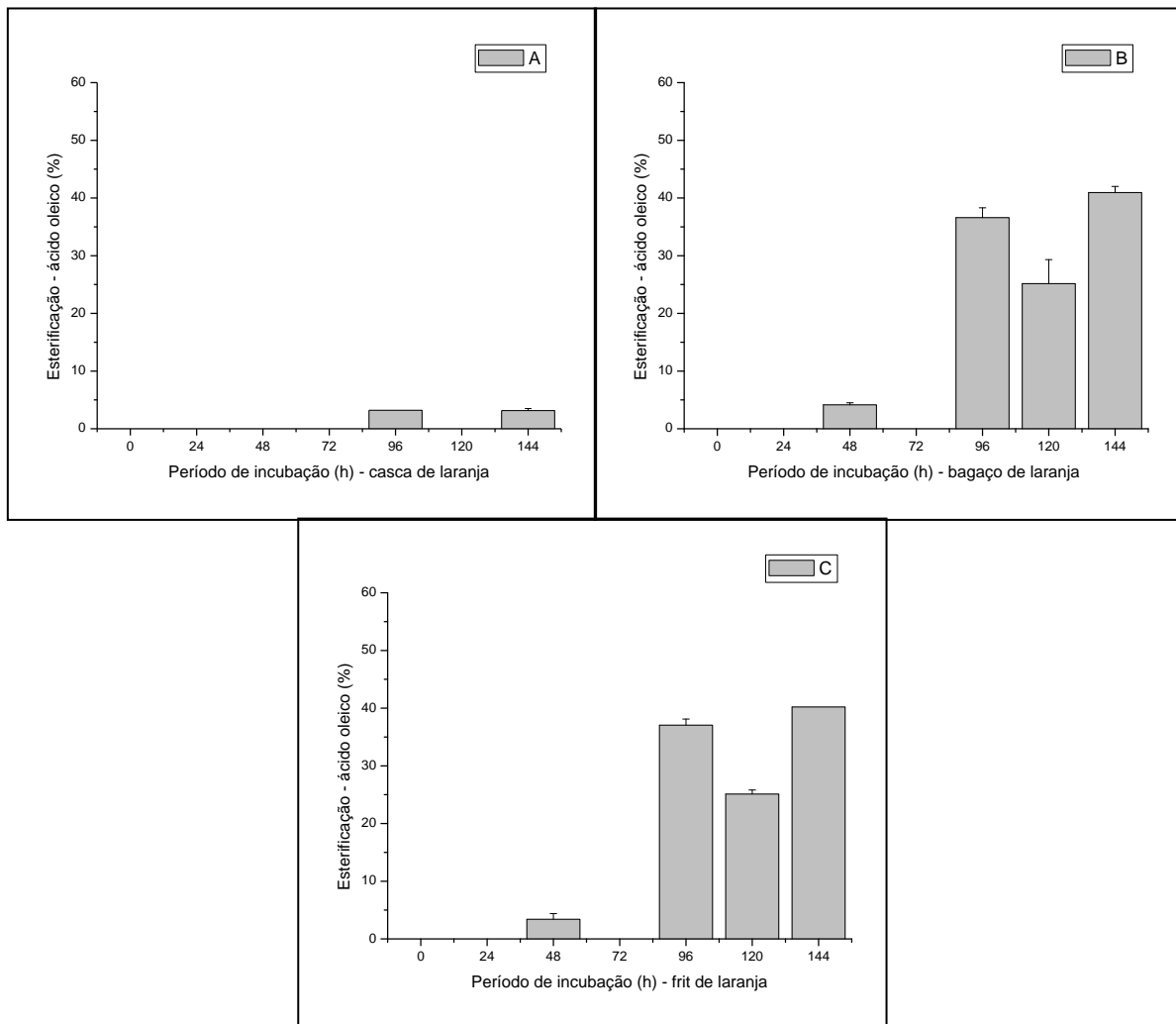


Figura 20. Esterificação de ácido oleico por extratos enzimáticos de laranja (A – casca, B – bagaço e C – frit)

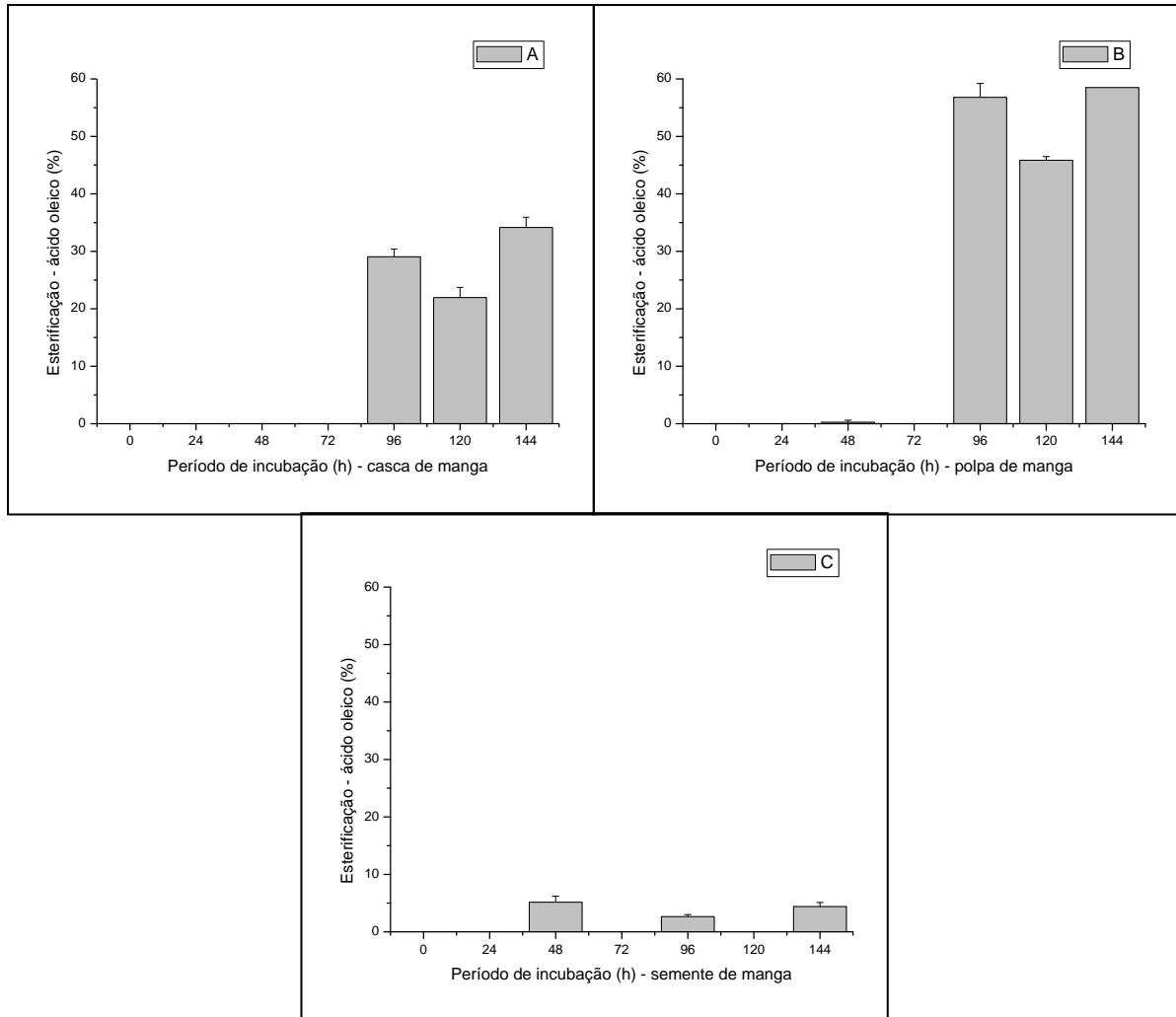


Figura 21. Esterificação de ácido oleico por extratos enzimáticos de manga (A – casca, B – polpa e C – semente)

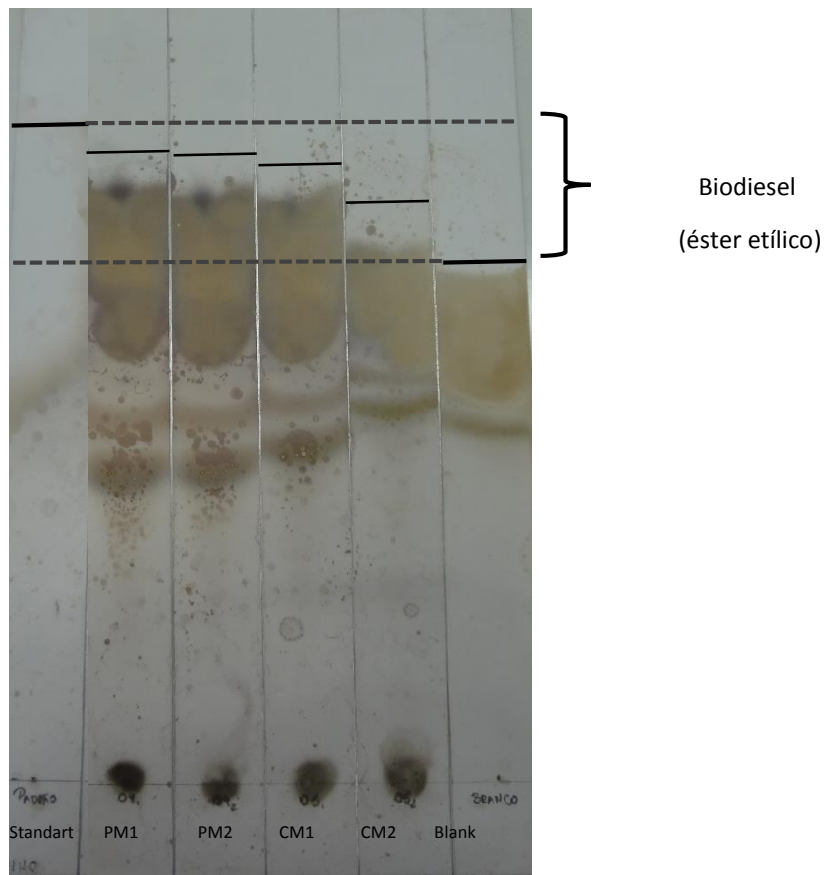


Figura 22. Produção de biodiesel, substratos óleo de milho e etanol (PM - polpa de manga, CM - casca de manga)

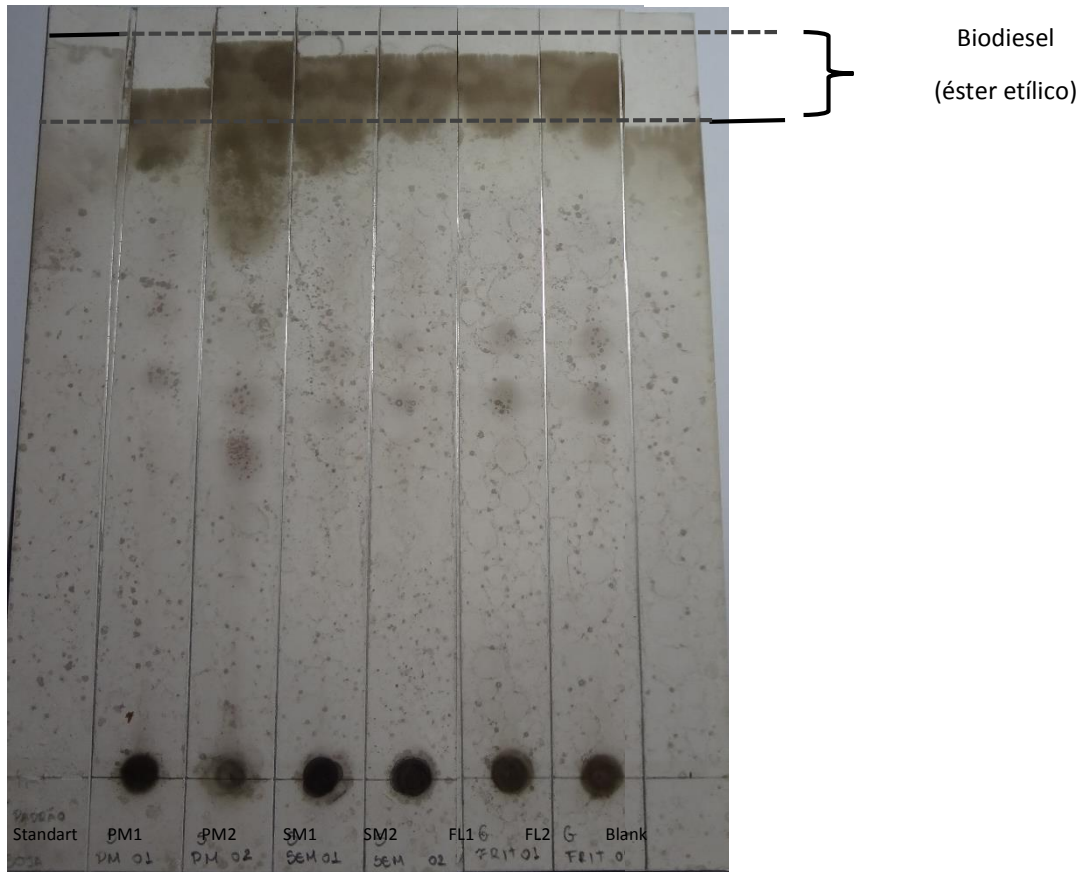


Figura 23. Produção de biodiesel, substratos óleo de soja e etanol (PM - polpa de manga, SM - semente de manga, FL - frit de laranja)



4. Conclusão

As matrizes vegetais de laranja e manga possuem lipases capazes de catalisar as reações de hidrólise e em maior grau as reações de síntese como a esterificação e alcoólise. Podem dessa forma, serem exploradas, principalmente, para a produção de biodiesel e transformação de óleos e gorduras.

5. Referências bibliográficas

Abdelmoez W., Mostafa N. A., Mustafa A. (2013) Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. *Journal of Cleaner Production* 59:290-297.

Barros M., Fleuri L. F., Macedo G. A. (2010) Seed lipases: Sources, applications and properties – a review. *Brasilian Journal of Chemical Engineering*, 27:15-29.

Carvalho P. O., Campos P. R. B., Noffs M. D'A., Oliveira J. G., Shimizu M. T., Silva D. M. (2003) Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26:1:75-80.

Castro H. F., Mendes A. A., Santos J. C. (2004) Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27:146-156.

Fleuri L. F. e Macedo G. A. (2009) Desenvolvimento de biocatalisadores com tecnologia nacional visando à obtenção de bioprodutos de interesse da indústria de petróleo: produção e imobilização de lipases, *Relatório de pesquisa para Petrobrás*, 1:90.

Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:235.

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*, 31:3:1.

Oliveira C., Rosa M. F. (2006) Enzymatic Transesterification of Sunflower Oil in an Aqueous-Oil Biphasic System. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83:1:21-25.



Pereira E. B., Zanin G. M. Castro H. F. (2003) Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20:4:343-355.

Shuang-yan H., Jun-hui Z., Zhen-lin H., Sui-ping Z., Ying L. (2011) Combination of site-directed mutagenesis and yeast surface display enhances *Rhizomucor miehei* lipase esterification activity in organic solvent. *Biotechnol Lett*, 33:2431–2438

Shah S., Sharma S., Gupta M. N. (2004) Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. *Energy Fuels*, 18:154–159.