

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/06/2018.



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

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

**CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO**

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

BOTUCATU - SP

- 2017 -

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

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

**CLARISSA HAMAIO OKINO DELGADO**

**PROF<sup>a</sup> ADJUNTA LUCIANA FRANCISCO FLEURI**  
**ORIENTADORA**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES**  
**CO-ORIENTADORA**

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

**BOTUCATU - SP**  
**- 2017 -**

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

Clarissa, Hamaio Okino Delgado.

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

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

Orientadora: Luciana Francisco Fleuri

Co-orientadora: Márcia Ortiz Mayo Marques

Assunto CAPES:

1. Bioquímica vegetal

CDD

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



## DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese à minha família.*

*Aos meus pais que são meu porto seguro.*

*À minha irmã, minha maior incentivadora e amiga.*

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

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



## Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ÍNDICE GERAL

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



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

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

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

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

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

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

### CAPÍTULO 1

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

### CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Balanço de massas de suco de laranja de diferentes variedades (safras de 07/08 a 15/16) .....	55
--	----

Figura 2.2 Balanço de massas dos resíduos do processamento de suco de laranja de diferentes variedades, safras de 2007/08 a 2015/16.....	56
--	----

Figura 2.3 Atividade de lipase de laranja variedade Hamlin em substratos p-NP (para-nitrofenil).....	57
--	----

Figura 2.4 Estudo de pH ótimo de extratos resíduos de laranja Hamlin.....	58
---	----

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

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

## CAPÍTULO 5

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

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

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

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

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

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

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

### CAPÍTULO 3

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

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

### CAPÍTULO 4

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

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

### CAPÍTULO 5

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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



## INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

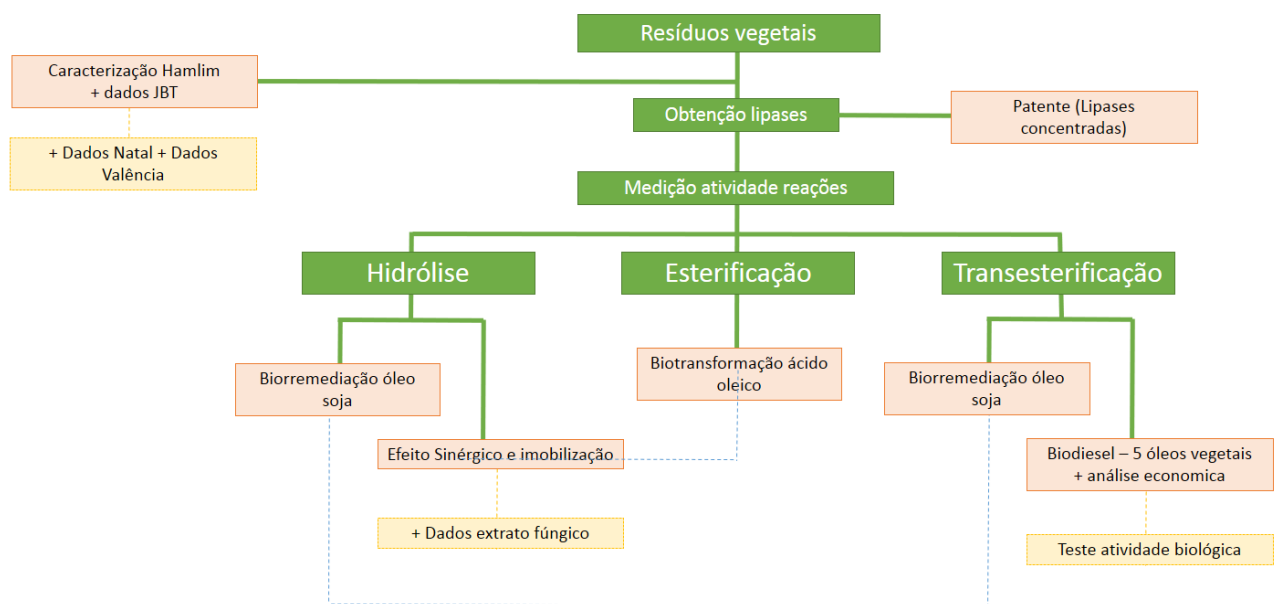


Figura I.1 Fluxograma de experimentos e produtos científicos gerados

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



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

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

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



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

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

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

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CONAB (2015) Boletim Hortigranjeiro 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acessado em maio de 2017.

Dhillon G.S.; Kaur S.; Oberoi H.S.; Spier M.R. Brar S.K. (2016) Chapter 2 – Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications. Em: Protein byproducts - transformation from environmental burden into value-added products. Academic-press, 21–36.

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

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

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

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

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

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

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



## CONCLUSÃO GERAL

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

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

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

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

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



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

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