



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ERIC CÉSAR MANO MESQUITA

USO DE PROCESSO ENZIMÁTICO VISANDO A OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES
DA TORTA RESIDUAL DE DENDÊ

BELÉM

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ERIC CÉSAR MANO MESQUITA

OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES DA TORTA RESIDUAL DE DENDÊ UTILIZANDO
PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Nadia Cristina Fernandes Corrêa

BELÉM

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M578o Mesquita, Eric César Mano.
OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES DA TORTA RESIDUAL DE DENDÊ UTILIZANDO PRÉ-
TRATAMENTO ENZIMÁTICO / Eric César Mano Mesquita, . — 2017.
64 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Nadia Cristina Fernandes Corrêa
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de
Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.
1. Carotenoides, Enzimas, Mesocarpo do dendê (TMD) . I. Título.

CDD 664.022

ERIC CÉSAR MANO MESQUITA

OBTENÇÃO DE CAROTENOIDES DA TORTA RESIDUAL DE DENDÊ UTILIZANDO
PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

DATA DA AVALIAÇÃO: ___/___/___

CONCEITO: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nadia Cristina Fernandes Corrêa – Orientadora
(PPGCTA/ITEC/UFPA)

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Sousa - Membro
(PPGCTA/ITEC/UFPA)

Profa. Dra. Marilena Emmi Araujo – Membro Externo
(PPGEQ/ITEC/UFPA)

Profa. Dra. Vanessa Albres Botelho da Cunha – Membro Suplente
(FEA/ITEC/UFPA)

**Dedico este trabalho a Deus e a Nossa
Senhora de Nazaré e a minha Família: Mãe,
Antônia Praxedes e aos meus amigos
Rogerio Vieira e Jaqueline Moraes.**

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora de Nazaré por sempre guiar meus caminhos em todos os momentos de minha vida e por sempre colocar pessoas em minha vida as quais tenho como anjos.

A Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), por proporcionar essa oportunidade e contribuir para a formação da minha vida profissional.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa. Á VALE pelo apoio financeiro e complementação do laboratório através de Projeto, e a BIOPALMA pelo fornecimento da matéria-prima usada nos experimentos da Dissertação.

A empresa Novosymes pela doação das enzimas utilizadas neste trabalho.

Aos professores Nadia Corrêa e França, pela receptividade, pelos ensinamentos, pela paciência, preocupação e principalmente pela contribuição científica e profissional, pois sei que estas serão as precursoras da minha carreira.

Aos membros da banca Jesus Nazareno e Vanessa Botelho pelas valorosas sugestões.

A minha Mãe Edna Maria pelos momentos que deixei de viver ao seu lado, ao amor que irrestritamente me dedica! Pela compreensão, carinho, força, amor, colo e tudo que sempre fez e faz por mim, TE AMO!

Aos meus “pais tortos” Rogerio Vieira e Jaqueline Moraes pela ajuda nos momentos de desespero e pelo cuidado e atenção, irei sempre lembrar tudo que aprendi com vocês e todos os dias peço a Deus que continue abençoando e protegendo cada um, só posso dizer muito OBRIGADO!

A minha Mãe de coração Marizeth Lisboa, pelo cuidado nos momentos que minha Família não estava do meu lado devido à distância, e ela preencheu com carinho e cuidado!

A meu irmão Carlos Eduardo, sem palavras TE AMO.

A minha avó Toinha Mesquita e tias Acássia Mesquita, Katia Mesquita pelo amor que transborda sem que elas percebam e o extremo cuidado que sempre dedicaram a mim.

A meus primos Lívia Mesquita, Junior Mesquita, Benjamin Acácio (Meu levado) e Antonella (Nega do biscoito), por serem minha alegria sempre, AMO VOCÊS!

A tia Licinha pela confiança e carinho e cuidado que não é pouco, adoro você.

Ao Sebastião Cidreira, por sempre confiar no meu potencial e pelo incentivo na pesquisa, devo muito a você.

A minhas amigas Ronielle Araújo, Cleuma Araújo pela parceria de sempre!

As minhas irmãs tortas Manuela Lisboa e Adriane Lago por todo carinho, apoio e amor a mim dedicados.

A família LAOS, que me receberam e ajudaram nos momentos de duvidas que não foram poucas, Adriano Marçal, Karina Rodrigues, Ramon Barros, Rennan Tupinambá, e aos agregados Mayara Martins, Rafaella Cristina, Fernanda Wariss.

E a todos aqueles que torceram por mim, direta ou indiretamente, meu muito obrigado!

RESUMO

As fibras residuais da produção de óleo de palma apresentam-se como uma potencial fonte de carotenoides de elevada importância econômica, destacando-se o β -caroteno, em virtude de suas características biológicas na saúde humana e sua atividade pro-vitamínica A. As enzimas celulolíticas vêm sendo uma forte alternativa para aumentar o rendimento no processo de extração de óleos, utilizadas particularmente para o pré-tratamento do material constituinte dos vegetais, pois favorece a liberação do óleo dentro da célula vegetal, contribuindo para o aumento da quantidade de óleo a ser extraído e ainda diminuindo o tempo de extração, proporcionando dessa forma a eficiência dos processos de extração de compostos de interesse industrial. Na torta prensada do mesocarpo do dendê (TMD) foi realizado um pré-tratamento com as enzimas celulase (CELLUCLAST) e pectinase (PECTINEX) nos tempos de 3,6, 12, 24, 48 e 60 h para avaliar o maior rendimento em volume extraído a menor degradação de carotenoides. Em seguida, foi avaliado o efeito da adição da enzima lipase através de um planejamento experimental composto central rotacional 2^3 , sobre a qualidade do óleo, em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$). Os resultados para a TMD pré-tratada indicam que 6 horas seriam suficientes para alcançar esse objetivo, obtendo 55% de massa de carotenoides. Para os resultados com adição da lipase foi observado que na maior concentração ocorria uma diminuição na acidez e uma elevação no teor dos carotenoides. No presente estudo nota-se que não ocorreu à hidrólise em função da quantidade de água no meio reacional favorecendo a reação contrária, a esterificação dos ácidos graxos livres.

Palavras-chaves: Carotenoides, Enzimas, Mesocarpo do dendê (TMD).

ABSTRACT

The residual fibers from the production of palm oil are a potential source of carotenoids of great economic importance, particularly β -carotene, due to its biological characteristics in human health and its pro-vitamin A. The enzymes cellulite have been shown to be a strong alternative to increase the yield in the oil extraction process, used particularly for the pretreatment of the constituent material of the plants, as it favors the release of the oil inside the plant cell, contributing to the increase of the amount of oil to be extracted and still reducing the extraction time, thus providing the efficiency of the extraction processes of compounds of industrial interest. In the pressed mesocarp pie (TMD), a pre-treatment with the enzymes cellulase (CELLUCLAST) and pectinase (PECTINEX) at the times of 3.6, 12, 24, 48 and 60 h was carried out to evaluate the highest volume yield carotenoid degradation. Then, the effect of the addition of the lipase enzyme was evaluated through a rotational central composite experimental design 2^3 , on the quality of the oil, in terms of β -carotenes ($\mu\text{g} / \text{gTMD48}$). The results for the pre-treated TMD indicate that 6 hours would be enough to reach this goal, obtaining 55% mass of carotenoids. For the results with addition of lipase, it was observed that in the highest concentration there was a decrease in acidity and an increase in the content of carotenoids. In the present study it was observed that hydrolysis did not occur as a function of the amount of water in the reaction medium favoring the opposite reaction, the esterification of the free fatty acids.

Keywords: Carotenoids, Enzymes, Palm oil mesocarp (TMD).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do β -caroteno	18
Figura 2- Representação do modelo Ping-Pong Bi Bi	21
Figura 3 - Mecanismo de hidrólise de triglicerídeos por lipase	21
Figura 4 - Perfil granulométrico da TMD seca	36
Figura 5 - Comportamento da extração do óleo da TMD48 versus o tempo do tratamento enzimático	37
Figura 6 - Comportamento do índice de acidez do óleo da TMD48 versus o tempo do tratamento enzimático	39
Figura 7- Evolução dos carotenoides em termo de β -caroteno, durante o tratamento enzimático da TMD48	40
Figura 8 - Micrografia da TMD <i>in natura</i> (a) e TMD tratada (b).....	42
Figura 9- Diagrama de pareto (95% de confiança) para o índice de acidez.....	47
Figura 10- Curva de contorno do processo enzimático realizado a 50°C	48
Figura 11- Diagrama de Pareto (95% de confiança) para a concentração de carotenoides	51
Figura 12- Curva de contorno da concentração de carotenoide em função da atividade de hidrólise.....	52
Figura 13 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase em termos do rendimento e tempo de extração do óleo.....	53
Figura 14 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase em termos do Índice de acidez do óleo residual.....	54
Figura 15 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e lipase em termos do teor de carotenoides totais, em termos de β -caroteno.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento experimental do processo enzimático.....	32
Tabela 2 - Características físico-químicas da TMD <i>in natura</i>	34
Tabela 3 - Composição das frações celulósicas da TMD antes e após o pré-tratamento enzimático.....	40
Tabela 4 - Qualidade do óleo residual, em termos do Índice de Acidez e Teor de carotenoides, da TMD após o processo enzimático	43
Tabela 5 - Efeitos calculados das variáveis independentes do processo enzimático sobre a acidez do óleo residual da TMD.....	44
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do processo enzimático sobre a acidez do óleo residual da TMD	46
Tabela 7 - Efeitos estimados dos parâmetros sobre a concentração de carotenos.....	48
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para concentração de carotenos resultante do processo enzimático.....	50
Tabela 9 - Composição dos ácidos graxos do óleo da TMD.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 ÓLEO DE DENDÊ.....	16
3.2 IMPORTÂNCIA DOS CAROTENÓIDES.....	17
3.2.1 ESTRUTURA DOS CAROTENÓIDES	17
3.3 EXTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES	18
3.4 PROCESSO ENZIMÁTICO	19
3.4.1 AÇÃO ENZIMÁTICA EM MATRIZES LIGNOCELULÓSICAS.....	22
3.4.1.1 Celulose.....	22
3.4.1.2 Pectinase.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 MATERIAL	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA TMD.....	26
4.2.1 FÍSICO-QUÍMICA.....	26
4.2.2 ANÁLISE DO ÓLEO RESIDUAL DA TMD	26
4.2.2.1 ÍNDICE DE ACIDEZ E TEOR DE CAROTENÓIDES	26
4.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO.....	27
4.2.3 FRAÇÕES DA CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA.....	27
4.2.4 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	30
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	30
4.3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE TMD.....	30
4.3.1.1 ANÁLISE DA TMD SELECIONADA.....	30
4.3.2 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA TMD48	31
4.3.2.1 USO DE CELULASE E PECTINASE.....	31
4.3.2.2 USO DE CELULASE/PECTINASE SEGUIDO DE LIPASE.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 CARACTERÍSTICAS DA TMD	34
5.2 AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	37
5.2.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA CELULASE E PECTINASE SOBRE A EXTRAÇÃO DE ÓLEO.....	37

5.2.2 CARACTERÍSTICAS DAS FRAÇÕES LIGNOCELULÓSICAS DA TMD.....	40
5.2.3 MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA TMD	41
5.3 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO VIA AÇÃO DA CELULASE/PECTINASE SEGUIDO DE LIPASE SOBRE O ÍNDICE DE ACIDEZ E TEOR DE CAROTENÓIDES DO ÓLEO RESIDUAL DA TMD.....	42
5.3.1 AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA LIPASE SOBRE A ACIDEZ DO ÓLEO RESIDUAL DA TMD	43
5.3.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO ENZIMÁTICO SOBRE A QUANTIDADE DE CAROTENÓIDES DA TMD.....	48
5.3.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SECAGEM NO TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA TMD COM CELULASE/PECTINASE E LIPASE	52
5.4 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA TMD	56
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

A extração do óleo é favorecida pela aplicação de pré-tratamento que quebra ou degrada a estrutura da parede celular, facilitando a liberação de óleo e também o acesso do solvente. Estudos recentes sobre a extração assistida por enzimas têm demonstrado que extração é mais rápida, maior recuperação, uso de solvente reduzido e menor consumo de energia quando comparado aos métodos não enzimáticos (PURI et al., 2012; PEREZ et al., 2013).

As enzimas têm sido utilizadas particularmente para o tratamento do material constituinte dos vegetais antes dos métodos convencionais de extração, as enzimas tais como celulases, pectinases e hemicelulases, rompem a estrutura da parede celular da planta, que resulta no aumento do rendimento da extração de compostos bioativos. A fibra do mesocarpo dendê constitui cerca de 15,7% de biomassa sólida de material celulósico alongado com comprimento de 30-50 mm, onde se encontra retido cerca de 5-7% de óleo na torta, depois da extração do óleo de palma bruto, sendo utilizado como combustível de caldeiras (LAU et al., 2008; PURI et al., 2012).

As fibras residuais da produção de óleo de palma contêm entre 4000 e 6000 ppm de carotenoides, cerca de seis vezes maior do que a encontrada no óleo de palma esmagado. Entre os carotenóides, o β -caroteno é um dos mais importantes e amplamente estudados, devido as suas funções biológicas na saúde humana, como a sua atividade pro-vitâmica A (FRANCA e MEIRELESS de 1997; FRANÇA e MEIRELES, 2000; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). As lipases (EC 3.1.1.3) têm aplicações versáteis, importância e significado na indústria oleoquímica, devido à sua grande variedade nas reações. O papel fisiológico das lipases é hidrolisar os triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. A produção de ácidos graxos livres pela hidrólise de triglicerídeos de várias fontes é um componente importante na exploração econômica dessas matérias-primas renováveis produzidos naturalmente (RAMANI et al., 2010; ABDELMOEZ et al., 2013; AVELAR et al., 2013).

2.OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é investigar a aplicação de enzimas para aumentar o rendimento e a qualidade, em termos dos carotenóides, do óleo extraído da torta resultante do processo de prensagem industrial do mesocarpo do dendê.

2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a torta residual da prensagem;
- Avaliar os efeitos dos parâmetros do processo de pré-tratamento enzimático (temperatura e tempo) na concentração dos carotenóides;
- Estudar a cinética da hidrólise enzimática em função da concentração de carotenóides;
- Avaliar as características (carotenóides totais em termo de β -caroteno e índice de acidez) dos concentrados da fibra antes da hidrólise e depois da hidrólise
- Avaliar o método de tratamento na TMD e concentração de carotenoides
- Analisar o perfil de carotenóides em amostras selecionadas a partir da avaliação dos carotenóides totais em termo de β -caroteno e índice de acidez;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleo de dendê

A região Norte do Brasil apresenta condições favoráveis para o crescimento da cultura do dendê, sendo o Estado do Pará um dos maiores produtores (AUGUSTO et al., 2011). Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção de dendê no Estado do Pará, superou os demais estados em 2009, com 916.663 toneladas de cacho de dendê.

Dentre os maiores produtores mundiais estão à Indonésia que produziu 90 milhões toneladas de fruto de palma em 2010 (ISROI, et al., 2012), e a Malásia com 79,3 milhões de toneladas em 2006 (TABI et al., 2008). Apesar da boa produção brasileira, a Indonésia e Malásia correspondem 80% da produção mundial de óleo de palma (CONAB, 2006). O Brasil ocupa a décima colocação com a produção de 265.000 MT/ano (FAO, 2009) de óleo de palma.

Segundo Castro et al., (2010), a cultura do dendê é uma das mais importantes atividades agroindustriais das regiões tropicais úmidas, contribuindo como fonte geradora de empregos no meio rural além de ser considerada uma cultura com forte apelo ecológico, por apresentar baixos níveis de agressão ambiental, adaptando-se bem a solos pobres, protegendo-o contra a lixiviação e erosão.

O óleo de dendê ou óleo de palma ocupa o 2º lugar na produção mundial de óleos e ácidos graxos, representando 18,49 % do consumo mundial. Devido ao seu baixo custo de produção, boa qualidade e ampla utilização, o óleo de dendê é um dos mais requeridos como matéria-prima para diferentes segmentos nas indústrias oleoquímicas, farmacêuticas e de cosméticos. O fruto do dendê rende aproximadamente 19,50 % de óleo de palma, 2 % de óleo de palmiste, 12 % de sementes, 6,50 % de amêndoas, 6 % de casca das sementes, 2,50 % de torta e 51,50 % de efluentes, cachos vazios e outros. As amêndoas rendem cerca de 39,50% de óleo de palmiste, 49% de torta e 11,50 % de impurezas (MAPA, 2006; BARBOSA, 2010).

A extração dos óleos derivados do dendê apresenta um rendimento médio entre 3 a 5 mil kg de óleo de dendê/ha/ano e de 300 a 500 kg de óleo de palmiste/ha/ano, e devido a sua alta produtividade ela é considerada superior a outras oleaginosas produzidas no Brasil, inclusive a soja cujo rendimento médio é de apenas 375 kg de óleo/ha (LOBO, 2009).

Após o processamento dos cachos para a extração do óleo de dendê é gerada uma série de subprodutos como: torta e cachos vazios usados como adubo orgânico; casca das amêndoas usadas como fonte alternativa de energia para alimentar as caldeiras; torta de palmiste usada na

alimentação animal ou adubo orgânico e ainda uma quantidade significativa de efluentes líquidos, denominados POME (*Palm Oil Mill Effluent*). Dentre esses subprodutos destaca-se a torta de dendê, produto resultante da prensagem do dendê após a extração do óleo. São geradas, cerca de 3 toneladas de torta de dendê para cada 100 toneladas de cachos de frutos beneficiados. (WAN ZAHARI e ALIMON, 2004; REDSHAW, 2003; ENRIQUEZ et al., 2003).

Uma das características de óleo de palma é o seu teor de carotenóides e tocoferóis podendo variar de 500 a 1500 mg/Kg, dependendo da espécie do fruto de palma a partir da qual o óleo é obtido. Os principais carotenóides de óleo de palma são α e β -caroteno, que constituem cerca de 90% dos carotenóides totais (SAMPAIO et al., 2013; ABDALLAH et al., 2015).

A composição físico-química da torta do mesocarpo do dendê apresenta em média, 48% de carboidratos, 3 % de lipídeos, 19 % de proteínas, 11 % de umidade e 4% de cinzas (VIEGAS e MULLER, 2000). Vale ressaltar que seu percentual de proteína bruta (PB) é superior em relação aos resíduos agroindustriais de açaí (10,85 %), de maracujá (6,65 %) e de palha de vagem de feijão caupi (5,46 %) (RODRIGUES FILHO et al., 1987; BARBOSA, 2010), além de apresentar uma quantidade significativa de carotenóides, como identificados no estudo realizado por França e Meirelles (1997).

3.2 Importância dos carotenóides

Os carotenóides são pigmentos largamente distribuídos na natureza como um dos grupos de pigmentos que possuem uma diversidade estrutural e inúmeras funções, sendo responsáveis pelas colorações laranja, amarela e vermelha das frutas, hortaliças, flores, algas, bactérias, fungos e leveduras mais de 750 carotenóides naturais já foram identificados Representando os pigmentos lipossolúveis mais difundidos e onipresentes na natureza e, até agora, (BRITTON et al., 2004; RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008).

Os carotenóides desempenham alguns papéis fundamentais na saúde humana, sendo essenciais para a visão devido à sua atividade de pró-vitamina A. O β - caroteno, α -caroteno e a β -criptoxantina são os carotenos percussores da pró-vitamina A, onde a estrutura da pró-vitamina A (retinol) é composta pela metade da molécula do β -caroteno, com uma molécula de água adicionada ao final da cadeia poliênica (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008; VON LINTIG, 2012).

As fontes mais ricas em carotenoides são provenientes de óleos de palma, os quais contém β -caroteno (4,7 mg/100 ml), α -caroteno (3,7 mg/100 mL), e outros carotenoides

(MUSTAPA, 2011).O óleo de palma tem 15 vezes mais retinol do que a cenoura e 300 vezes maior do que o tomate (CAZZANIGA et al., 2012).

3.2.1 Estrutura dos carotenóides

Os carotenóides são quimicamente definidos como tetraterpenos (C_{40}), compostos por oito unidades isoprenóides (C_5H_8), formando uma cadeia carbônica longa com duplas ligações conjugadas. Nas extremidades da cadeia, há grupos lineares ou cíclicos, podendo ter a inclusão de grupos com oxigênio, como hidroxí-, ceto- ou epóxi-. Ao grupo de carotenóides que contém oxigênio na sua estrutura dá-se o nome de xantofilas, e aqueles que possuem somente a cadeia hidrocarbônica denominam-se carotenos (OLIVER e PALOU, 2000; RAO e RAO, 2007).

O β -caroteno (Figura 1) apresenta a maior atividade pró-vitáminica dentre os demais carotenos. Este antioxidante está presente em diversos tipos de materiais vegetais, como, por exemplo, no óleo de palma, que apresenta uma coloração laranja característica. Possui grande importância comercial, pela sua aplicação como corante natural em produtos comestíveis e farmacêuticos (SILVA et al., 2010, MUHAMMAD; KHAN; CHOONG, 2013).

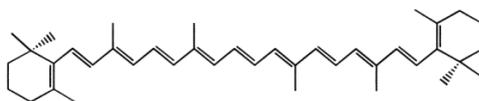


Figura 1 - Estrutura química do β -caroteno

Fonte: (BOON et al., 2010)

3.3 Extração de carotenóides

A análise de carotenóides tem sido estudada durante anos e têm culminado no refino dos métodos analíticos, identificação das fontes de erros e os meios adequados para evitá-los, assim como na implementação de sistemas de garantia da qualidade e metodologias estão sendo estudadas, além da extração por solvente e instrumentação analíticas, mas também o aprofundamento dos conhecimentos sobre o papel destes compostos na saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA et al., 2008). Várias tecnologias estão sendo estudadas, para recuperação de β -caroteno de matrizes de origem vegetal, tais como: Sólido-líquido, extração enzimática e com fluido supercrítico.

RIVERA e CANELA et al., (2012), estudaram a influência do solvente no carotenóides em milho. Eles relataram que as combinações de metanol com outros solventes menos polares

foram mais eficazes do que o etanol, acetona e acetona/etanol/hexano. Eles também observaram que as amostras que foram hidratadas antes da extração acetona apresentaram maior eficiência de extração, que pode ser atribuído à água aumentando a penetração acetona no endosperma.

KAMFFER et al., (2010), desenvolveram um método para a extração de carotenóides e clorofilas de bagos de uva e afirmam que estes compostos eram mais estáveis em éter etílico /hexano do que em acetona. Não ocorreu a degradação de carotenóides e clorofilas, quando foi utilizado em 30min de extração com éter etílico/hexano, o tempo de extração de carotenóides foi ótimo sem ocorrer degradação.

LAVECCHIA e ZUORRO (2008) estudaram a obtenção de licopeno de pele de tomate, subproduto da indústria de processamento, por métodos enzimáticos, empregando pectinases, celulasas e hemicelulasas.

RANVEER et al., (2013) otimizaram um processo de extração de licopeno a partir de resíduos de processamento de tomate da indústria por comparação da eficácia dos tratamentos de enzimas sobre a extração de licopeno, que foi superior a 1,5% e 2% de celulase e pectinase, respectivamente. Os autores relatam que 4 horas de incubação seria ótimo quando se utiliza enzimas celulase e pectinase, e afirmou que o mais fino do tamanho de partícula maior será a recuperação de licopeno.

FRANÇA e MEIRELLES (1997) estudaram a extração com fluido supercrítico dos carotenóides de óleo de dendê retido na torta de prensagem. FRANÇA et al., (1999), reportaram a utilização de CO₂ supercrítico na extração de carotenóides do fruto de buriti, alcançando valores em torno de 10.000 ppm de carotenóides, em termos de β -carotenos.

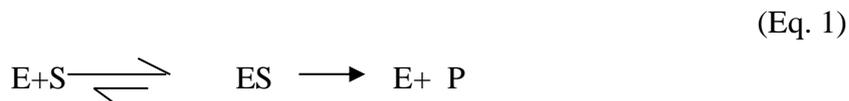
CONTADO et al., (2010), estudaram dois métodos de extração de carotenóides de cenoura por fluido supercrítico e convencional, e concluíram que a extração de carotenóides por fluido supercrítico é uma técnica de separação viável e eficiente, pois o fluido é inerte, não deixa resíduo final e não agride o meio ambiente.

3.4 Processo Enzimático

A cinética enzimática é a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas e os fatores que influenciam nesta velocidade. A cinética de uma enzima [E] é estudada avaliando-se a quantidade de produto [P] formado ou a quantidade de substrato [S] consumido por unidade de tempo de reação. O complexo enzima-substrato [ES] tem uma energia de ativação ligeiramente menor que a do substrato isolado, e a sua formação leva ao

aparecimento do estado de transição “Ts”. A formação do produto a partir de [ES] é a etapa limitante da velocidade da reação (BUENO, 2005).

A reação enzimática transcorre através da formação de um complexo enzima-substrato [ES] em equilíbrio com a enzima [E], que se decompõem dando origem aos produtos da reação [P], como expressado pela equação abaixo.



Segundo Bueno (2005), a cinética enzimática é determinada pela concentração de enzima, concentração de substrato e sua biodisponibilidade, concentração de co-fatores, concentração de inibidores ativadores, pH e temperatura.

Vários mecanismos têm sido propostos para reações de hidrólise catalisadas por lipases. O modelo cinético mais simples é baseado no clássico mecanismo de Michaelis-Menten aplicado a sistemas emulsionados óleo/água (GAN et al., 2000), onde propuseram um modelo de equilíbrio para reações enzimáticas envolvendo apenas um substrato, considerando a reação como um processo de duas etapas (MARANGONI, 2003). Inicialmente ocorre uma reação reversível, onde o substrato liga-se a uma enzima formando um complexo intermediário instável denominada enzima/substrato (ES) caracterizado por ser uma etapa de reação rápida.

A constante de equilíbrio (Ks) relativa à dissociação deste complexo é uma medida da afinidade da enzima em relação ao substrato, correspondendo à concentração deste quando a velocidade de reação é igual à metade de seu valor máximo, ou seja, $Ks = \frac{1}{2} Vm$ (MARANGONI, 2003).

(Eq. 2)



O mecanismo cinético mais aceito para descrever a ação das lipases é o Ping-Pong Bi Bi (CUNHA, 2007). O fenômeno conhecido como “ativação interfacial” foi originado de estudos cinéticos recentes de reações lipolíticas e relaciona o aumento da atividade da lipase com a presença de substratos insolúveis, que formam emulsão. Isso porque o sítio ativo de algumas lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao

mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. Este modelo de ativação interfacial tem exceções tais como as cutinases, que não apresentam tampa cobrindo o sítio ativo (GAMA, 2000; CASTRO et al., 2004; BUENO, 2005). A Figura 2 representa de forma esquemática o modelo Ping-Pong Bi Bi considerando a existência de múltiplos substratos e produtos.

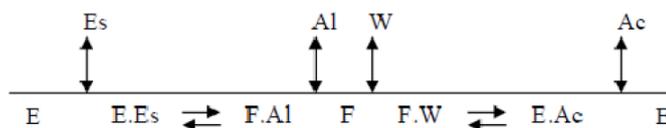


Figura 2- Representação do modelo Ping-Pong Bi Bi

Fonte: (BEVILAQUA, 2005)

Onde: E representa a enzima; Es: representa o éster; E.Es: representa o complexo intermediário enzima-éster; Al: representa o álcool; F: representa o produto 1; F.Al: representa o complexo produto-álcool; W: representa a molécula de água; F.W: complexo produto-água; Ac: representa o ácido; E.Ac: representa o complexo enzima-ácido.

O mecanismo atual da ação da lipase em triglicerídeos do óleo é mostrado na Figura 3. A figura representa a ligação do grupo acila (RCOO^-) no lado positivo da cadeia (NH_3^+) e o íon hidrogênio (H^+) no lado negativo da cadeia (COO^-) do sítio ativo da enzima. Isto, por sua vez, acarreta a liberação de ácidos graxos livres (RCOOH) no sistema de solvente bifásico e a lipase também pode ser recuperada após a extração da fase do solvente (SHARMA, CHAURASIA e DALAI, 2013).

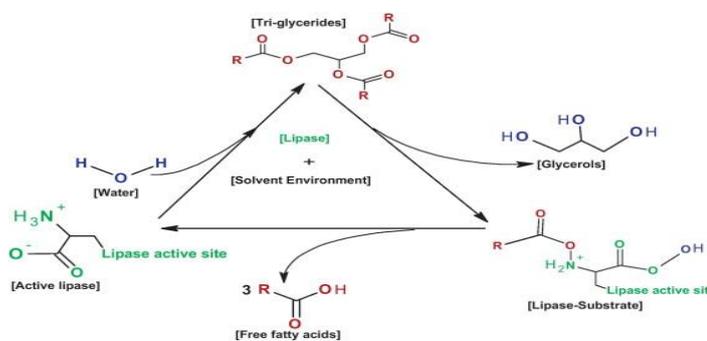


Figura 3- Mecanismo de ação de triglicerídeos por lipase

Fonte: SHARMA; CHAURASIA; DALAI (2013)

3.4.1 Ação enzimática em matrizes lignocelulósicas

O processo enzimático é uma etapa prévia importante para a extração de óleo de matérias lignocelulósicas. Esta etapa inclui processos físicos, para a redução do tamanho da biomassa, assim, a porosidade será aumentada redistribuindo a lignina e favorecendo a ação das enzimas sobre os constituintes lignocelulósicos, podendo atingir uma hidrólise efetiva. Esta etapa do processo deve destruir a cadeia de hemicelulose que liga a lignina e a celulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porção amorfa que é a mais suscetível ao ataque enzimático (YANG, 2008; HARMSSEN, 2010).

As enzimas coletivamente denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, celulases, xilanases e proteases. Estas enzimas podem apresentar ação tanto sinérgica como sequencial na degradação dos substratos. A proporção e a distribuição da celulose, da hemicelulose, de substâncias pécicas, das proteínas e da lignina são variáveis de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (WULFF, 2002). Segundo Lynd et al., (2002), as enzimas celulolíticas quando atuam em conjunto, apresentam um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais. As enzimas celulolíticas não atuam individualmente no substrato celulósico e conseqüentemente não hidrolisam a celulose de maneira eficiente, sendo necessária uma ação de sinergismo.

A aplicação das enzimas celulolíticas é uma alternativa para aumentar o rendimento do processo de extração de óleos, pois consegue elevar a quantidade extraída e diminuindo o tempo de extração (WU et al., 2009). Estas enzimas degradam a parede celular, rompendo sua estrutura celular e facilitando dessa forma assim a extração de óleos (JUGE, 2006).

3.4.1.1 Celulase

Celulases são enzimas que hidrolisam as ligações de tipo β -1,4 glicosídicas da celulose, sendo classificadas de acordo com a *Enzyme Commission*(EC) com o código 3.2.1.x. Estão presentes em 13 das 82 famílias de hidrolases identificadas por análise de sequência. Esse grupo de enzimas hidrolisam as ligações glicosídicas na matriz celulósica gerando como produtos primários glicose, celobiose e celo-oligosacarídeos. É o grupo de enzimas mais estudado, composto de endoglucanases (EnG), exoglucanases (ExG) e β -glicosidases (BG). Estas três classes de enzimas, em conjunto, apresentam especificidade por ligações β -1,4 e sinergismo na atuação. As celulases destacam-se como o mais importante grupo de enzimas necessárias para

a degradação de paredes celulares de plantas vasculares (SINGHANIA et al., 2010; SAHA et al., 2006).

Celulase é um termo geral para as enzimas celulolíticas, das quais três classes são reconhecidas com base no modo de ações enzimáticas e as especificidades de substrato. A Endo- β -glucanases (1,4- β -D-glucana-4-glicano-hidrolase, EC 3.2.1.4) possui ação randômica sobre as regiões da celulose, principalmente nas regiões amorfas, causando mudança rápida no grau de polimerização e produzindo celo-oligossacarídeos (glicose e celobiose) a serem clivados por celobio-hidrolases. (MARTINEZ et al., 2008; RAGHUWANSHI et al., 2014). Já as Exo- β -glucanases (EC 3.2.1.74 e 3.2.1.91) são formadas por dois grupos ativos sobre celulose cristalina: enquanto a glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) libera a glicose diretamente do polímero, a celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) hidrolisa os terminais redutores e não redutores das extremidades expostas da cadeia por divisão da celobiose, respectivamente (MARTINEZ et al., 2008; RAGHUWANSHI et al., 2014). E as celobiasas (β -glicosídeo glico-hidrolases, EC 3.2.1.21) hidrolisam as moléculas de celobiose nas ligações glicosídicas β -1,4 e pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose. Eles são membros das famílias de enzimas betaglicosidases, que se hidrolisam oligossacáridos e / ou polissacáridos (MARTINEZ et al., 2008; LEE et al., 2015).

3.4.1.2.Pectinase

O complexo pectinolítico é constituído por enzimas desesterificantes e despolimerizantes, devido à função de degradar a pectina localizada na lamela média da parede celular primária das células vegetais e são classificadas em poligalacturonase (PG), pectinase liase (PL) e pectinesterase (PE). As enzimas pectinolíticas ou pectinases são capazes de reconhecer ligações glicosídicas do tipo α -1,4 entre monômeros do ácido galacturônico ou seu derivado metoxilado. Podem ser produzidas por plantas e microrganismos com fungos e bactérias (DARTORA et al., 2002; DA SILVA, et al., 2005; SILVA et al., 2005).

De acordo com o mecanismo de ação das pectinases estão descritas a forma de atuação e sua classificação (JAYANI et al., 2005). A enzima poligalacturonase (EndoPG; EC 3.2.1.15) clivam as ligações glicosídicas α - 1,4 existentes nos segmentos de homogalacturonana. A enzima ataca o substrato de maneira randômica e libera ácido poligalacturônico. As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática, mostrando uma maior capacidade para hidrolisar substratos não-esterificados e apresentam decréscimo da atividade com o aumento do grau de metilesterificação, possuindo pH ótimo de atividade na região

levemente ácida e temperatura ótima entre 30° e 50°C. Elas são as enzimas mais bem estudadas dentro do complexo pectinolítico (JAYANI et al., 2005; VORAGEN et al., 2009).

A pectinaliase é capaz de despolimerizar a região menos ramificada da pectina por β -eliminação, entre dois resíduos de ácido galacturônico esterificados, resultando na formação de uma ligação insaturada $\Delta 4,5$ na extremidade não-redutora do ácido galacturônico formado. A atividade da pectinaliase é considerada chave no processo de degradação da pectina, pois é a única capaz de degradar uma molécula de pectina altamente ramificada sem o auxílio prévio de pectinesterase (CAMARGO et al., 2005; JAYANI et al., 2005). Pectinases, associadas com outras carbohidrolases, como celulases, vêm sendo estudadas visando à sua aplicação na extração de óleos vegetais, como óleo de oliva, soja, semente de abóbora e dendê (TEIXEIRA et al., 2013; JIAO et al., 2014). O uso de enzimas durante a maceração para extração de óleo torna o processo mais brando e aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extra-virgem (UENOJO; PASTORE, 2007).

LIPASES

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (principais componentes de óleos e gorduras) produzindo monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol atuando na interface óleo-água, onde ocorre um aumento da atividade da enzima. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meios aquo-restritos (SHIMADA et al., 2002; JAEGER e EGGERT, 2002).

Possuem propriedades características, com especificidades, sendo esta um fator crucial para a aplicação industrial e habilidade para catalisar reações em sistemas solúveis e insolúveis em água. A diferença para as estas clássicas é que seus substratos naturais são insolúveis em água e sua atividade é máxima quando a enzima está adsorvida na interface óleo-água (GHOSH et al., 1996).

3.9.1 Especificidade das lipases

Grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos (especificidade de substrato), em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (GUPTA et al., 2004).

Lípases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais, podendo ser específicas com

relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. Ainda, segundo estes autores, as lípases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade (CASTRO et al., 2004):

a) Lípases não específicas catalisam a hidrólise completa dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, apresentando monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários, atuando de modo aleatório. As moléculas de acilglicerol são quebradas na posição randômica produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

b) Lípases 1,3 específicas catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados ao C1 e C3 do glicerol, produzindo ácidos graxos 2-monoacilgliceróis ou 1,2- ou 2,3-diacilgliceróis, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3- diacilgliceróis e 1- ou 3- monoacilgliceróis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

A matéria-prima, torta prensada do mesocarpo do dendê (TMD), foi cedida pela empresa Biopalma S.A, localizada no município de Moju-PA e transportada diretamente para o Laboratório de Operações de Separação (LAOS), na Universidade Federal do Pará (Belém-PA). As enzimas celulase e pectinase, na forma de solução (*Celluclast 1,5L*, *Pectinex Ultra SP-L*) e a lipase (*Lipozyme CALB L*) foram gentilmente cedidas pela Novozyme (Novozyme, Espanha).

4.2 Caracterização da matéria-prima

4.2.1 Físico-Química

Na caracterização físico-química da TMD foram realizadas as análises de teor de água segundo o método 920.151 da AOAC (2000); teor de resíduo mineral fixo segundo o método da AOAC 930.05 (2000); teor de lipídeos conforme o método 948.22 da AOAC (2000); proteína total foi determinada pela metodologia da AOAC 950.48 (2000); carboidratos totais foi obtido por cálculo de diferença da composição segundo a Resolução RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003); análise de fibra bruta pelo método de van Soest (1967); a atividade de água foi determinada por leitura direta em termo-higrômetro (Marca AQUA LAB-Modelo 4TE), com controle interno de temperatura a 25°C; a determinação do pH foi realizado de acordo com AOAC método n° 981.12, por leitura direta em pHmetro portátil PHTEK, modelo pH 100, previamente calibrado com as soluções tampão 4,0 e 7,0.

4.2.2 Análise do óleo residual

O óleo foi extraído segundo o método 948.22 da AOAC (2000), com éter de petróleo usando sistema Soxhlet, e ao final da extração o solvente foi separado do óleo por um sistema de rota evaporação.

4.2.2.1 Índice de Acidez e Teor de Carotenoides

O óleo foi submetido às análises de Índice de Acidez (método Cd3d-63, A.O.C.S, 1999), sendo convertido para % em ácido oleico. O teor de carotenoides foi realizado de acordo (FRANÇA e MEIRELES, 2000), em termos de β -carotenos, no óleo foi convertido para mg de carotenóides por 100 g de TMD através da Equação 3.

$$C = \frac{M_o}{M_a} \times C' \quad (\text{Eq.3})$$

Onde M_o é a massa de óleo em gramas, M_a é a massa de TMD em gramas e C' é a concentração de carotenóides, em termos de β -carotenos, em $\mu\text{g/g}$ de TMD.

4.2.2.2 Determinação do teor de ácidos graxos do óleo

Os ésteres de ácidos graxos foram determinados no laboratório de medidas físicas FEA/UFPA com base na metodologia proposta por Rodrigues et al., (2010). A análise ocorreu em cromatógrafo gasoso Varian (modelo CP3380) associado a uma coluna capilar CPSil 88 de 60 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μm da Varian Inc., acoplado a um detector de ionização de chama (DIC). A operação foi realizada com gás Hélio, como fase móvel, a uma vazão volumétrica de 1 cm^3/min com temperatura do injetor a 250°C e volume de amostra de 1 μL . A temperatura da coluna foi programada para 80 °C em 4 min. De maneira subsequente, a temperatura foi elevada até atingir 205°C, com taxa de aquecimento de 4°C/min. Os picos foram identificados e posteriormente quantificados a partir do tempo de retenção, com base na amostra padrão de ácidos graxos (Nu-check-prepInc, EUA). Os cálculos para a quantificação das áreas dos picos foram realizados com auxílio do *software* Varian Star e os resultados determinados em gramas de ácido graxo/ 100g óleo.

4.2.3 Frações de celulose, hemicelulose e lignina

- Fibra Detergente Ácido (FDA)

Para determinação de fibra utilizando o detergente ácido aplicou-se o método de van Soest – FDA (1963), adicionando, aproximadamente, 1 g de amostra (triplicata) em envelopes sintetizados para análise. Em seguida, colocou-se os envelopes, fechados, dentro de um béquer com água destilada, para que não ocorra a formação de aglomerados de amostra, sofrendo homogeneização manual por 15 minutos. Em seguida as amostras foram colocadas no suporte do analisador de fibras (TECNAL, TE-149), e mergulhadas em uma misturada a 2L de solução de ácido sulfúrico 1,25% (0,255N). O equipamento aqueceu a solução até 100°C e, ao atingir a temperatura, contou-se 60 minutos. Após o tempo estipulado, retirou-se a solução ácida do interior do equipamento e adicionou-se água a 100°C, deixando os envelopes imersos por 5 minutos. Depois removeu-se a água e, em seguida, adicionou-se água a 100°C novamente, essa operação repetiu-se por 4 vezes. Finalizando essa etapa as amostras foram imersas em um

béquer contendo álcool absoluto (Etanol P.A 99,6%-Marca), efetuou-se agitação manual do conteúdo por 3 minutos, realizou-se outra vez o mesmo procedimento, mas utilizando acetona P.A (ver percentual e marca). Para promover a remoção do solvente colocou-se as amostras em cadinhos de porcelanas e transferidos para uma estufa (QUIMIS, Q314M242) a 105°C por 4 horas, sendo, posteriormente, retiradas e colocadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente. O conjunto cadinho-envelope-extrato foram levados ao forno mufla por 1 hora a 550°C, e, posteriormente, colocados em dessecador para esfriar. A determinação da porcentagem de fibra detergente ácido (FDA) foi obtida a partir da Eq. 4.

$$FDA(\%) = \frac{(A-B)}{\text{Peso Amostra}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: B é a massa do envelope vazio e A é a massa do conjunto cadinho-envelope-extrato, em grama.

- Fibra Detergente Neutro (FDN)

Para determinação de fibra detergente neutro foi utilizado o método de van Soest e Wine – FDN (1967), o procedimento é o mesmo empregado para obtenção de fibra detergente ácido, mudando que a amostra passa apenas por digestão em solução de hidróxido de sódio 1,25% (0,313N) por 60 minutos. A determinação da porcentagem de fibra detergente Neutro (FDN) foi obtida a partir da Eq. 6.

$$FDN(\%) = \frac{(C-B)}{\text{Peso Amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Onde: B é a massa do envelope vazio e C é a massa do conjunto cadinho-envelope-extrato, em g.

- Celulose

Para determinação de celulose, os envelopes sinterizados proveniente da análise de FDA, com massa conhecido, foram adicionados de ácido sulfúrico 72% (p/p) e submetidos a agitação vigorosa. Em seguida, foram colocados em equipamento determinador de fibras (TECNAL, TE-149), após o escoamento completo do ácido, os envelopes foram lavados com água destilada a 100°C, por quatro vezes. Em seguida foram secos em estufa a 105°C, até peso

constante, sendo resfriados em dessecador e pesados. A massa de celulose (CEL) foi obtida pela diferença da massa do saquinho sinterizado antes e depois da adição da solução de ácido sulfúrico a 72%. O resultado foi calculado de acordo com a Eq. 6.

$$CEL(\%) = \frac{(A-B)}{\text{Peso Amostra}} \times 100 \quad (6)$$

Onde: A é a massa do envelope sinterizado com extrato depois de lavado e seco, antes da adição do ácido sulfúrico e B é a massa do envelope sinterizado com extrato depois da adição do ácido sulfúrico, em g.

- Lignina

Para determinação de lignina, as amostras provenientes da análise de celulose, foram incineradas em mufla a 550°C. Após a completa incineração, os saquinhos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente. O teor de lignina foi calculado pela diferença entre a massa do envelope sinterizado antes da incineração e a massa do envelope sinterizado após incineração e resfriamento em dessecador. O resultado da massa de lignina (LIG) foi calculado de acordo com a Eq. 7.

$$LIG(\%) = \frac{(A-B)}{\text{Peso Amostra}} \times 100 \quad (7)$$

Onde: A é a massa do envelope sinterizado contendo resíduo lavado e seco depois da adição do ácido sulfúrico, antes da adição do ácido sulfúrico e B é a massa do saquinho sinterizado contendo resíduo depois de incinerados em mufla, em g.

- Hemicelulose

Para determinação do teor de hemicelulose, o cálculo foi feito com base na diferença entre a massa da amostra remanescente da análise de FDN e a massa da amostra remanescente da análise de FDA. O resultado da massa de hemicelulose (HEM) foi calculado de acordo com a Eq. 8.

$$HEM(\%) = \frac{(A-B)}{\text{Peso Amostra}} \times 100 \quad (8)$$

Onde: A é a massa da amostra remanescente da análise de FDA e B é a massa da amostra remanescente da análise de FDN, em g.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises da TMD foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura – LABMEV do Instituto de Geociências da UFPA. O equipamento utilizado foi um MEV modelo LEO-1430. As amostras foram metalizadas com ouro e o tempo de recobrimento foi de 1,5 min. As condições de análises para as imagens de elétrons secundários foram: corrente do feixe de elétrons = 90 μ A, voltagem de aceleração constante = 10 kV, distância de trabalho = 15 mm.

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Preparação da matéria-prima

A TMD foi seca em estufa a 50°C durante 24 h e acondicionada em saco de polietileno de cor escura e mantida na ausência de luz até o momento dos ensaios. Para redução do tamanho da TMD, foi usado um processador doméstico da marca Philips Walita, onde cerca de 100 g de amostra era moída por 5 min. Este procedimento foi feito por várias vezes até que cerca de 10 Kg de material fosse processado. Este material foi homogeneizado e submetido ao procedimento de quarteamento para separação de amostra representativa do lote destinada a seleção granulométrica.

Para selecionar uma fração de partícula, utilizou-se 100 g de amostra utilizando um conjunto de peneiras Série Tyler (8, 9, 14, 48, 60 e 65 mesh) e submetido ao agitador de peneiras durante 15 min.

4.3.1.1 Análise da TMD selecionada

As Frações de celulose, hemicelulose e lignina da TMD48 foram determinadas de acordo com o item 3.3.3.

Para determinar a quantidade mínima de água a ser incorporada na TMD na ocasião da inserção da solução enzimática, foi feita previamente a determinação da Capacidade de Retenção de Água da TMD48.

- Capacidade de retenção de água da TMD

A TMD foi colocada em contato com água na razão de 1:10, durante 2 horas, em temperatura ambiente de 25°C. Após, a mistura foi filtrada e a massa da TMD úmida foi pesada.

Esse procedimento foi feito em triplicata. A capacidade de retenção de água foi calculada pela Equação 9 e o grau de umidade pela Equação 10.

$$CRA = \frac{[Pu - (Pv + Pss)]}{Pss} \quad (\text{Eq. 9})$$

Onde CRA = capacidade de retenção de água pelo substrato (g água / g TMD); Pu = peso do cadinho + TMD úmida (g); Pv = peso do cadinho (g); Pss = peso seco da TMD (g)

$$GU\% = \frac{[Pu - (Pv + Pss)] \cdot 100}{(Pu - Pv)} \quad (\text{Eq. 10})$$

Onde GU% - grau de umidade; Pu – peso do cadinho + TMD úmida (g); Pv – peso do cadinho (g); Pss – peso seco da TMD (g)

4.3.2 Tratamento Enzimático da TMD48

4.3.2.1 Uso de celulase e pectinase

Uma solução de enzima foi preparada com 160 mL de solução tampão acetato de sódio pH $5,0 \pm 0,3$ (50 M) 0,5% (v/m) de Celluclast e 0,5% (v/m) de Pectinex Ultra SP-L em relação a matéria seca de TMD48 a ser hidrolisada. Os experimentos foram realizados em batelada num sistema contendo béquer de 100 mL em um banho de aquecimento, com 100 g de TMD em contato com a solução de enzima a 50°C. Foram realizados seis experimentos nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48 e 60 h, em triplicata. Ao final de cada experimento, a mistura era seca em estufa de recirculação de ar a 50°C durante 6 h. O material seco foi submetido à extração com éter de petróleo PA via Soxhlet, onde o ponto final de extração foi definido quando o solvente na câmara de extração manteve-se incolor. O óleo era separado do solvente num rota evaporador, o qual foi destinado para a análise do rendimento da extração (item 2.2), índice de acidez (item, 2.3) e massa de carotenóides (item, 2.3).

Para verificar a influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e lipase, em termos do rendimento, índice de acidez e os teores de carotenóides do óleo foram feitos ensaios em triplicata, a partir da TMD *in natura*, TMD48 *in natura* e TMD48 seca. As amostras foram submetidas ao tratamento enzimático durante 6 horas.

4.3.2.2 Uso de celulase/pectinase seguido de lipase

Os experimentos foram realizados no mesmo sistema descrito no item 3.3.2.1, em duas etapas. A primeira consistiu em fazer o pré-tratamento de 100 g de TMD48 com a celulase e a

pectinase, na condição que resultou maior rendimento em carotenóides (item 3.3.2.1) e, a segunda, consistiu em adicionar ao sistema reacional 50 mL da solução tampão (pH 5) contendo lipase (Lipozyme CALB L) de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1.

Utilizou-se um planejamento composto central rotacional (2^3) que consistiu em 8 ensaios nos pontos fatoriais (efeitos lineares), com 6 ensaios nos pontos axiais (efeitos quadráticos) e 2 ensaios nos pontos centrais, observando os efeitos da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo de reação (h) e lipase (% m/m) sobre o Índice de Acidez do óleo (item, 2.3) e carotenoides (item, 2.3) de acordo com a Tabela 1. A quantidade de lipase foi calculada em percentagem referente à matéria seca de TMD48 e o pH foi mantido a $5,0 \pm 0,3$.

Tabela 1- Planejamento experimental do processo enzimático para lipase

Experimento	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de reação (h)	Lipase (% m/m)
1	(-1) 45,00	(-1) 1,00	(-1) 0,25
2	(-1) 45,00	(1) 6,00	(-1) 0,25
3	(1) 55,00	(-1) 1,00	(-1) 0,25
4	(1) 55,00	(1) 6,00	(-1) 0,25
5	(-1) 45,00	(-1) 1,00	(1) 1,25
6	(-1) 45,00	(1) 6,00	(1) 1,25
7	(1) 55,00	(-1) 1,00	(1) 1,25
8	(1) 55,00	(1) 6,00	(1) 1,25
9	(0) 50,00	(0) 3,50	(-1,68) 0,00
10	(0) 50,00	(0) 3,50	(1,68) 1,59
11	(-1,68) 42,00	(0) 3,50	(0) 0,75
12	(1,68) 58,40	(0) 3,50	(0) 0,75
13	(0) 50,00	(-1,68) 0,70	(0) 0,75
14	(0) 50,00	(1,68) 7,70	(0) 0,75
15	(0) 50,00	(0) 3,50	(0) 0,75
16	(0) 50,00	(0) 3,50	(0) 0,75

Um modelo polinomial foi ajustado aos pontos experimentais utilizando-se o programa Statistica versão 7.0 (Equação 11). Através da análise dos efeitos dos parâmetros e análise de variância (ANOVA) testou-se a preditividade do modelo, a falta de ajuste e o coeficiente de

correlação (R^2) pelo teste de Fischer (teste F). Os testes de ajuste e predição do modelo foram realizados ao nível de significância de 5%. As curvas de contorno foram determinadas em função dos parâmetros mais influentes de acordo com o diagrama de Pareto.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (\text{Eq.11})$$

Onde: Y = variável resposta; β_0 = constante; β_i = coeficiente linear; β_{ii} = coeficiente para o coeficiente quadrático; β_{ij} = coeficiente para a interação entre as variáveis; X_i e X_j os valores codificados para as variáveis x_i e x_j , respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características da TMD

A Tabela 2 mostra os valores obtidos da composição físico-química da TMD *in natura*, ou seja, com as características resultantes do processo industrial de extração do óleo.

Tabela 2- Características físico-químicas da TMD *in natura*

Parâmetro	Média ± Desvio padrão
Teor de água (%)	32,45 ± 1,71
Cinzas (%)	2,34 ± 0,07
Lipídeos (%)	5,40 ± 0,30
Proteínas (%)	3,73 ± 0,11
Fibra bruta (%)	38,45±1,71
Carotenoides totais, em termos de β-caroteno no óleo (ppm)	1041 ±28,03
Carotenoides em termos de β-caroteno μg/g de TMD	56,187± 2,22
Ph	6,9 ±0,3
Atividade de água (a _w)	0,992 ± 0,001

A TMD *in natura* apresentou teor de água abaixo do reportado por Lauet al., (2008), (37,8%), indicando que o processo de obtenção de óleo pode contribuir para a umidade residual da TMD, além das características intrínsecas do fruto de dendê.

O teor de cinzas foi similar àquele analisado por Iberahim et al., (2013) para a TMD, que obteve 2,6%. No entanto, está abaixo do valor dos 5,8% encontrado por Zakaria et al., (2014). Características como variedade do fruto, influências climáticas e tipo de adubação do solo podem contribuir para a constituição do fruto, principalmente quanto aos teores de minerais.

O teor de lipídeos residual na TMD está fortemente ligado ao processo de obtenção do óleo do fruto. O valor encontrado de 5,40% é similar ao obtido por Chee (2012) que foi (5,70%). Durante o processo industrial do dendê, o óleo que permanece na torta resultante pode variar em torno de 5%, no entanto, a fim de evitar a quebra da amêndoa do fruto, a pressão pode ser reduzida, resultando num aumento na retenção de óleo em torno de 10 a 12% (CORLEY e TINKER, 2003; OBIBUZOR et al., 2012).

Quanto ao teor de proteína de 3,73%, o mesmo está abaixo daquele obtido por Toro-Cardenas et al., (2015), que encontraram 6,3 %, essa diferença pode ser justificada pelos aspectos da planta, como a variedade do fruto, clima, condições de solo. Outro aspecto que pode contribuir para o valor de proteína residual na TMD é o tratamento térmico aplicado ao fruto para facilitar a extração do óleo da palma, visto que o processo realiza a esterilização em autoclaves e jatos de vapor, podem contribuir para a desnaturação das proteínas e ainda podendo ocorrer à lixiviação das proteínas para o óleo durante a prensagem.

O conteúdo de fibra bruta da TMD 38,45% foi elevado quando comparado a de outros frutos, como a do tucumã, que apresentou um valor em torno de 19% de fibra bruta de acordo com Ferreira et al., (2008). A literatura não apresenta dados para o teor de fibra bruta para a TMD.

A TMD apresentou um pH levemente ácido, provavelmente causado pela presença de ácidos graxos livres no óleo residual, pois, sabe-se que o pH pode variar dependendo da constituição de cada substância (metais, ácidos, etc). O processo pelo qual o óleo de dendê foi obtido, envolvendo etapas de esterilização dos frutos, bem como a elevada temperatura no processo de extração por prensagem podem ter contribuído para esse valor.

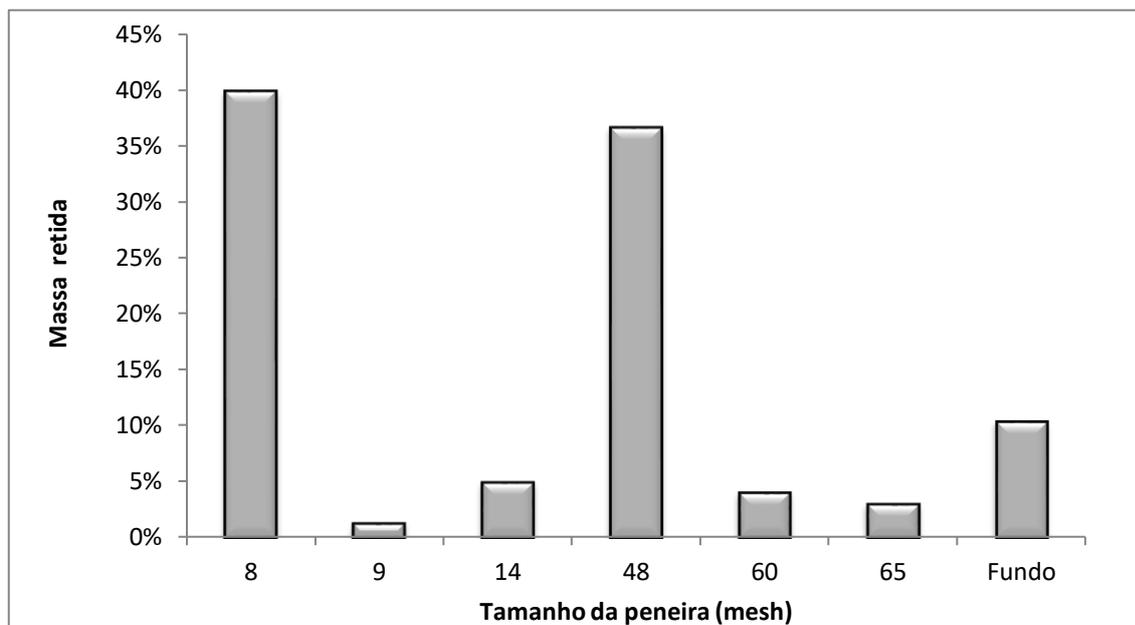
O elevado valor de atividade de água apresentado pela TMD também se deve ao processo de extração industrial do óleo de dendê e às características intrínsecas do fruto, influenciadas pelo tipo de solo que a planta foi cultivada, nível pluviométrico da região de plantação, nível de adubação, etc. Diante dessa característica, a água disponível pode atuar como veículo de transporte das lipases presentes na TMD o que pode influenciar na degradação enzimática no óleo, além de ser um fator importante para o crescimento microbiano que podem ocasionar a partir do seu metabolismo reações de degradação indesejáveis no óleo e conseqüentemente, no conteúdo de carotenóides da TMD.

- Seleção do Tamanho de Partícula da TMD

A classificação granulométrica da TMD seca e moída resultou no comportamento apresentado na Figura 4. Como pode ser observado, as peneiras 8 e 48 mesh apresentaram os maiores percentuais de retenção do material, considerando que o processo de moagem das partículas da TMD não apresentou uma boa homogeneidade, devido à estrutura física da TMD. Por outro lado, o aumento do tempo de moagem poderia fazer com que o atrito entre as partículas sólidas gerasse calor, contribuindo, assim, para que os carotenóides fossem degradados. Diante deste resultado, decidiu-se usar a fração retida na peneira 48 mesh (0,295

mm), a fim de aumentar a superfície de contato entre a matriz sólida e a solução enzimática, denominada de TMD48. De acordo com Gardossi (2009), a redução do tamanho da partícula proporciona uma melhor acessibilidade das enzimas na célula da planta, influenciando no aumento do rendimento de extração se apresenta de forma significativa.

Figura 4- Perfil granulométrico da TMD seca



Identificação da CRA e GU da fração de TMD48

A capacidade de retenção de água da TMD foi realizada após a granulometria, sendo utilizada a fração de 48 mesh (0,295 mm). A TMD48 apresentou um valor médio de CRA de $1,74 \pm 0,02$ g H₂O/g de TMD, em relação ao grau de umidade da TMD, o resultado obtido foi de 62,2% apresentando uma a_w de 0,998. Sawet et al., (2008) ao analisarem as propriedades de hidratação da torta do dendê em diferentes tamanhos de partícula (mm), especificamente para a peneira de diâmetro 0,319 mm, obteve-se um CRA de 3,22 g H₂O/g TMD, valor superior ao encontrado neste estudo. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que quanto maior for o teor de óleo da partícula, menor será a capacidade de hidratação da mesma devido a restrição de entrada de moléculas de água na fibra. O resultado prévio da CRA foi utilizado para indicar a quantidade de água mínima para adicionar na TMD durante o tratamento enzimático.

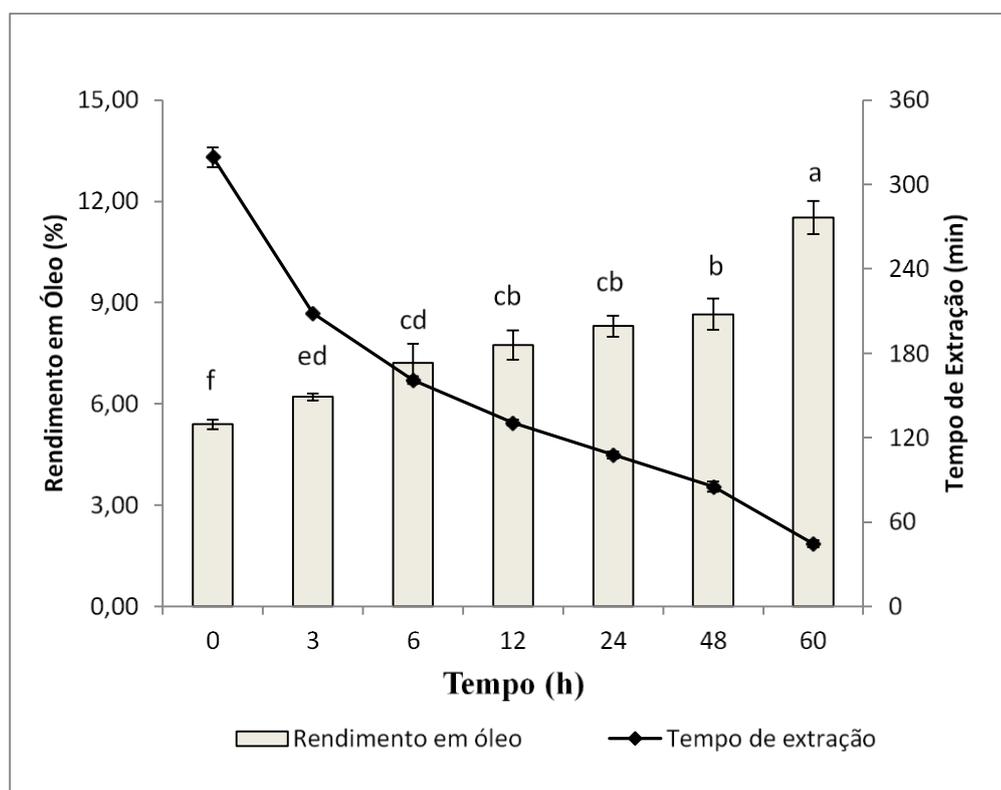
5.2 Avaliação do pré-tratamento enzimático

5.2.1 Avaliação da Ação da Celulase e Pectinase sobre a Extração de Óleo

A eficiência da ação da celulase e da pectinase na extração de óleo da TMD48 foi medida através dos parâmetros Rendimento em óleo (%), Índice de Acidez do óleo e do teor de carotenóides.

Na Figura 5, pode-se observar a evolução do rendimento em óleo da TMD e do tempo de extração do óleo via Soxhlet em função do tempo do tratamento com as enzimas Celluclast 1,5L e Pectinex Ultra SP-L. O ponto 0 (zero) representa a extração de óleo da TMD48 sem tratamento enzimático.

Figura 5 - Comportamento da extração do óleo da TMD48 versus tempo do tratamento enzimático



Observa-se que, em termos de rendimento em óleo, houve um aumento menos acentuado de 32% nas primeiras 6 h de processo enzimático, seguido de um crescimento até 48 h, e que de 48 para 60h de processo tem-se um novo pico significativo de aumento, 33%. Este comportamento mostra que a mistura de enzima age tão logo quando entra em contato com a superfície da TMD e, a partir daí, passa por uma etapa de difusão da solução dentro das partículas, diminuindo a sua ação efetiva, conseguindo alcançar a parte central da partícula a

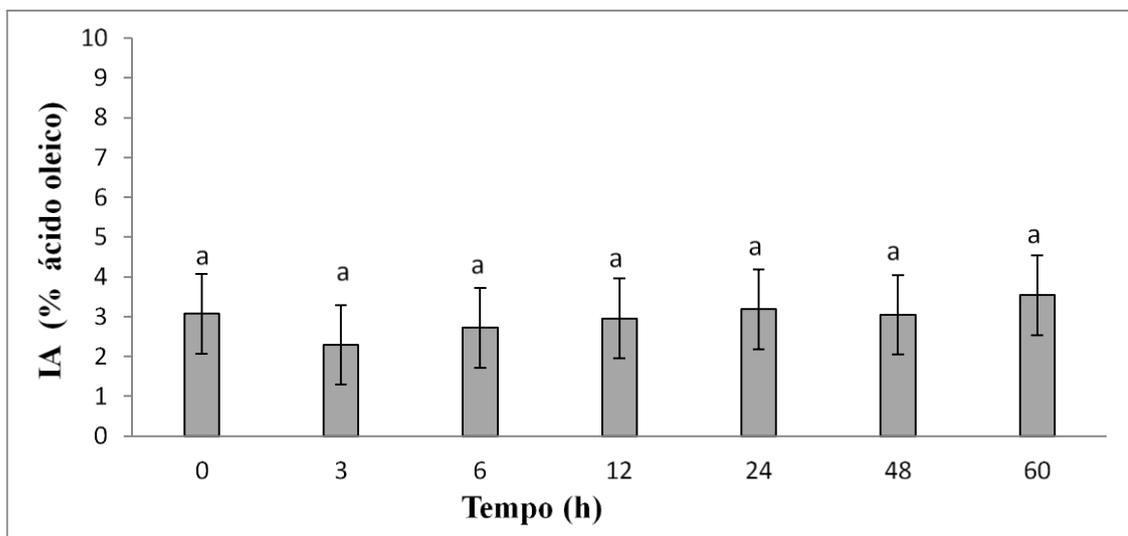
partir de 48 horas de processo, ou seja, quando toda a porosidade da partícula é tomada pela solução e, dessa forma, promovendo a sua ação na parede celulósica da TMD48, liberando o óleo remanescente.

Um aspecto importante a ser considerado no processo foi a redução do tempo de extração, como mostrado na Figura 5, o que reforça a ação do tratamento enzimático com as celulases e pectinases na desestruturação da parede lignocelulósica da TMD48. Pode-se verificar que a TMD48 submetida ao tratamento enzimático de 6h, apresentou uma redução em 50,4% no tempo de extração quando comparado a TMD sem tratamento enzimático. A redução do tempo de extração continua com o aumento do tempo de tratamento enzimático, chegando a 85%, quando comparada com a extração de óleo da TMD48 sem tratamento enzimático. A redução do tempo de extração é justificado pela maior acessibilidade do solvente, ocasionada pela ação das enzimas que atuam desestruturando a parede celular reduzindo assim o tempo de extração, facilitando o acesso do solvente no material e a liberação de óleo durante o processo de extração. Hosni et al., (2013) estudaram o efeito de distintos pré-tratamentos enzimáticos (celulase, hemicelulase e mistura celulase/hemicelulase) sobre a extração de óleo essencial de tomilho e alecrim e, obtiveram o maior rendimento (109,32%) para a mistura de celulase e hemicelulase, confirmando um efeito sinérgico cooperativo mais eficiente do que a utilização de uma única enzima (63,55% para celulase e 23,72% para hemicelulase). Sowbhagya et al., (2011) estudaram a extração enzimática de compostos voláteis de sementes de cominho, (*Cuminum cyminum* L.) e observaram que amostras tratadas com enzima liberavam o óleo a uma taxa maior em comparação com amostra controle (sem tratamento enzimático).

A Figura 6 mostra o efeito do tempo do tratamento enzimático no Índice de acidez do óleo residual da TMD48. Observa-se que o Índice de Acidez manteve-se constante durante todo o processo, não apresentando diferença de 5% de significância, indicando que a presença das enzimas não alterou esta característica do óleo residual da TMD durante o tratamento enzimático, atuando somente na parede celular da TMD para maior liberação do óleo. Vale ressaltar que o óleo da TMD após o processo de extração com pré-tratamento se encontra dentro da legislação Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999, onde estabelece que para o Índice de Acidez óleo de dendê bruto deva estar abaixo 5% (em ácido oleico). Estudo realizado por Taieb-Hadj et al., (2012) que estudou a otimização de extração do azeite de oliva e a quantificação de compostos minoritários usando formulações enzimáticas, relatou que o índice de acidez foi reduzido nos ensaios tratados enzimaticamente ao serem comparados ao ensaio

controle (sem enzima), ressaltou também que o perfil de ácidos graxos do óleo obtido com a adição das enzimas (pectinase e celulase), não houve efeito estatisticamente significativo.

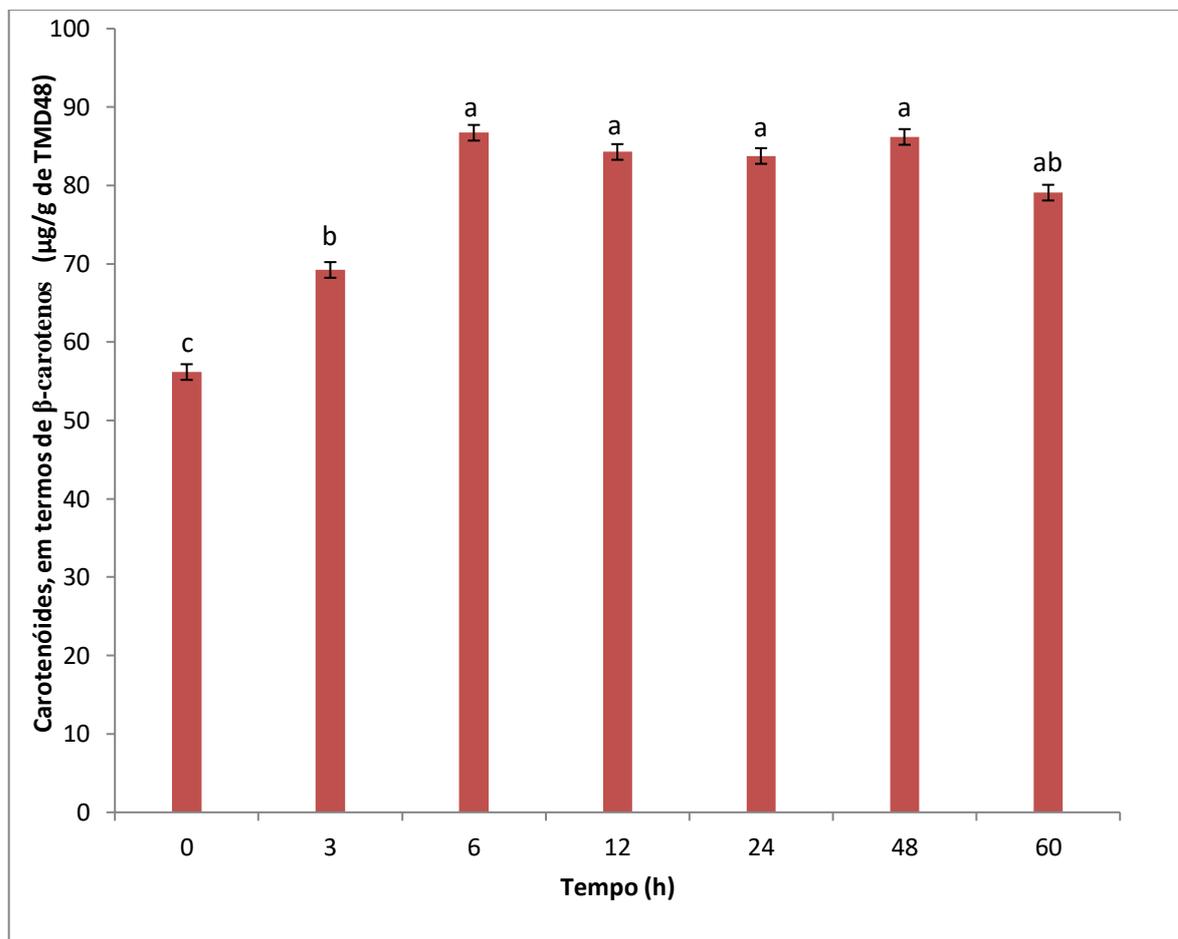
Figura 6- Comportamento do Índice de Acidez do óleo da TMD48 versus tempo do tratamento enzimático.



A Figura 7 apresenta o comportamento do teor de carotenóides durante o tempo de tratamento enzimático da TMD. Observa-se que a ação das enzimas sobre a estrutura física da TMD foi responsável por obter um aumento significativo de 55% de óleo em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$) ($p < 0,05$) em 6 horas de processo. A partir daí, verificou-se que não há diferença significativa até 60 h de tratamento enzimático, pois, as massas de carotenóides em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$), não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) mostrando que estes não são degradados durante o tratamento enzimático. Ranveer et al., (2013) estudaram a extração assistida por enzimas do licopeno nos resíduos de processamento de tomate, e observaram que com o aumento do tempo de incubação que variou de 1 hora a 4 horas ocorreu uma redução na concentração de licopeno. No entanto, o presente estudo ocorreu uma diminuição na concentração de carotenos, contudo a massa extraída de carotenoides manteve-se estatisticamente constante. Este comportamento contribui para a teoria de que as enzimas exigem condições satisfatórias para o seu desempenho, fomentando a necessidade de otimização de parâmetros no processo enzimático específicos que incluem a natureza da matriz a ser tratada.

Os resultados para a TMD48 indicam que para o intervalo de tempo de tratamento enzimático estudado, 6 horas seriam suficientes para alcançar o limite de concentração de carotenóides.

Figura 7- Evolução dos carotenóides, em termos de β -carotenos, durante o tratamento enzimático da TMD48.



5.2.2 Características da fração lignocelulósica da TMD

A Tabela 3 apresenta os valores da celulose, hemicelulose e lignina para a TMD48 antes (tempo 0) e após o tratamento enzimático em 6h com a celulase/pectinase.

Tabela 3- Composição das frações celulósicas da TMD antes e após o pre-tratamento enzimático

% teor	TMD48 sem tratamento	TMD48 com tratamento
Celulose	34,4±0,7	25,1±0,5
Hemicelulose	17,9±0,8	15,5±0,4
Lignina	45,2±0,5	74,5±0,3

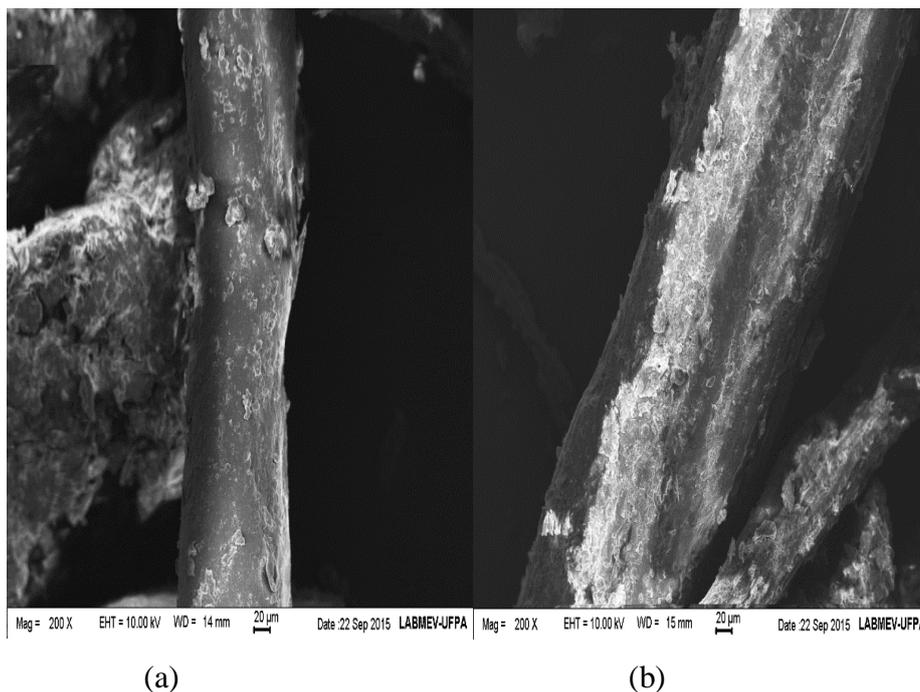
A TMD48 apresentou valores consideráveis de lignina e celulose, (45,2% e 34,4%. Quando comparado por SHINOJ et al., (2011) que analisaram a fibra de dendê e seus componentes encontrou uma faixa de percentuais para celulose (42 a 65%) e lignina (13,2 a 25,31%). Observou-se que os valores obtidos para celulose apresentou-se abaixo da faixa citada, enquanto que os teores de hemicelulose e lignina foram superiores ao presente estudo. A composição química da TMD varia, sempre, pois esta relacionada com a idade da planta, condições do tempo, fase de colheita, tempo de maturação dos frutos e composição do solo (ROWELL, 2008).

Observa-se na Tabela 3, que a TMD48 após o tratamento enzimático utilizando a celulase e pectinase, apresentou uma significativa redução de 27% na celulose e um aumento em 65% em lignina. Estes comportamentos ocorreram, pois a lignina não é o substrato para as preparações enzimáticas utilizadas, o seu aumento ocorreu em decorrência da ação enzimática sobre a celulose e hemicelulose.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura da TMD

As estruturas morfológicas da TMD *in natura* e TMD pré-tratada com as enzimas celulase e pectinase durante 6 h são mostradas nas Figuras 8 (a) e (b), respectivamente. Observa-se na Figura 11 (a) que a superfície da fibra contém impurezas, além de ser homogênea, com algumas porções rugosas dispersas, ou seja, verifica-se que as estruturas lignocelulósicas do material não apresentam diferenças visuais comparando com a literatura. Na Figura (b) observou-se que o pré-tratamento acarretou modificações morfológicas no material analisado. Os efeitos do pré-tratamento sugerem que houve a quebra da estrutura celulósica devido a ação enzimática, desse modo observa-se que a estrutura, antes lisa, apresentou conformação rugosa. A alteração morfológica ocasiona o desligamento das frações celulósicas da fibra, ou seja, as estruturas que antes eram interligadas, formando o feixe de fibra, passaram a apresentar alteração em sua disposição morfológica por conta de quebra da celulose, permitindo que as frações de hemicelulose e lignina ficassem soltas em determinadas áreas do feixe de fibra.

Figura 8 - Micrografia da TMD *in natura* (a) e TMD tratada (b)



5.3 Avaliação do Tratamento Enzimático via ação de celulase/pectinase seguido de Lipase sobre o Índice de Acidez e Carotenóides do óleo residual da TMD

A Tabela 4 apresenta os resultados dos experimentos realizados de acordo com o planejamento composto central rotacional, para verificar a influência da temperatura (°C), tempo de ação da enzima (h) e percentual de lipase (%) sobre a qualidade do óleo extraído da TMD48, após o processo enzimático, através de seu Índice de Acidez (IA) e Carotenóides. Os valores dos carotenóides foram convertidos para $\mu\text{g/g}$ de TMD.

Observa-se que o menor Índice de Acidez ocorreu no experimento 8, e o experimento 9 apresentou maior Índice de Acidez em termos de ácido oleico. De acordo a RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999, o Índice de Acidez das amostras analisadas se apresentaram abaixo do exigido pela legislação (<5%). Este comportamento mostra que o processo enzimático dentro dos parâmetros estudados não afetou a qualidade do óleo residual. No entanto, a maior concentração em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$) foi observada no experimento 8, evidenciando que a solubilidade dos carotenóides é maior nos triacilgliceróis do que nos ácidos graxos livres.

Tabela 4 - Qualidade do óleo residual, em termos do Índice de Acidez e Teor de Carotenoides, da TMD após processo enzimático

Variável independente			Variável dependente		
Experimento	T (°C)	t (h)	Lipase (%)	IA (% em ácido oleico)	Carotenóides, em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$)
1	45	1,0	0,25	4,25	177,12
2	45	6,0	0,25	4,06	210,97
3	55	1,0	0,25	3,75	194,44
4	55	6,0	0,25	3,67	222,09
5	45	1,0	1,25	3,48	197,19
6	45	6,0	1,25	3,01	240,26
7	55	1,0	1,25	2,20	251,94
8	55	6,0	1,25	1,83	302,92
9	50	3,5	0,00	4,80	179,92
10	50	3,5	1,59	2,53	184,50
11	42	3,5	0,75	4,43	196,89
12	58	3,5	0,75	3,33	201,48
13	50	0,7	0,75	3,61	163,85
14	50	7,7	0,75	3,23	226,85
15	50	3,5	0,75	4,76	189,66
16	50	3,5	0,75	4,61	184,84

5.3.1 Avaliação da ação da lipase sobre a acidez do óleo residual da TMD

Os dados experimentais, foram tratados estatisticamente e os valores dos efeitos das variáveis independentes Temperatura, Tempo e Concentração de Enzima e suas respectivas interações, sobre a acidez do óleo residual da TMD.

Nota-se que os efeitos das variáveis Temperatura (linear), Tempo (quadrático) e Lipase (linear), dentro de $p < 0,05$, apresentaram efeitos negativos sobre o Índice de Acidez do óleo, ou seja, os parâmetros promoveram a redução do Índice de acidez do óleo residual da TMD. Também não houve influência significativa das interações entre os parâmetros estudados.

Tabela 5- Efeitos calculados das variáveis independentes do processo enzimático sobre a acidez do óleo residual da TMD

Fator	Efeito	Erro Puro	Teste t	P
Média	4,71583	0,074764	63,0761	0,010092
Temperatura (L)	-0,76190	0,057428	-13,2671	0,047894
Temperatura (Q)	-0,71529	0,069780	-10,2506	0,061909
Tempo (L)	-0,25627	0,057428	-4,4625	0,140341
Tempo (Q)	-1,04125	0,069780	-14,9219	0,042600
Lipase (L)	-1,32264	0,057428	-23,0314	0,027624
Lipase (Q)	-0,86764	0,069780	-12,4340	0,051090
Temperatura*Tempo	0,05250	0,075000	0,7000	0,611200
Temperatura*Lipase	-0,39250	0,075000	-5,2333	0,120198
Tempo*Lipase	-0,14250	0,075000	-1,9000	0,308428

Através da Tabela 5, percebe-se que o parâmetro Temperatura (L), apresentou efeito negativo sobre a resposta, significando que com um aumento na temperatura de 50 a 55°C houve a redução do Índice de Acidez do óleo. As temperaturas estudadas foram baseadas de acordo com a faixa de temperaturas de trabalho de cada enzima (celulase: 50 a 60°C) e lipase (30 a 60°C). A estabilidade térmica da lipase explica os diferentes efeitos sobre a reação, com o aumento da temperatura ótima da enzima na reação (acima de 55°C) promoveu uma melhoria no aumento na atividade da lipase.

É importante notar que o Tempo (Q) apresentou um efeito quadrático, indica que há um aumento no índice de acidez para uma subsequente redução devido à ação da lipase.

A variável Lipase (L) apresentou um efeito negativo sobre o índice de acidez, ou seja, à medida que aumenta a concentração de lipase ocorreu um declínio na acidez. O que mostra que a hidrólise do óleo residual da TMD foi suplantada devido a quantidade de água presente no meio reacional foi insuficiente e favoreceu a reação reversa, ou seja, a esterificação dos ácidos graxos livres.

Diante desse comportamento, tem-se que dentro da faixa dos parâmetros operacionais do processo enzimático estudada, a metodologia usada contribuiu para a desacidificação do óleo. Cabe ressaltar, a informação da CRA da TMD48 indicou a quantidade de água a ser usada nos experimentos, pois atentou-se para a minimização do tempo de secagem da TMD, etapa necessária para a extração de óleo e manutenção dos carotenóides, visto que os mesmos

poderiam ser degradados por oxidação em virtude do tempo de exposição da matéria-prima ao ar atmosférico durante a operação de secagem.

De acordo Makasçi e Arisoy (1996), a ação das lipases catalisam as reações de hidrólise dos triacilgliceróis e a esterificação dos ácidos graxos, entretanto, o deslocamento do equilíbrio destas reações é favorecido em função do conteúdo de água presente na amostra, desta forma, em um ambiente com uma quantidade de água restrita, a reação de esterificação torna-se dominante, enquanto que, à medida que há o aumento de água no meio reacional, as reações de hidrólise são favorecidas. A função biológica das lipases é hidrolisar ésteres, especialmente triacilglicerois, no entanto, também são capazes de catalisar reações de síntese, dependendo, para isso, de baixa atividade de água no meio reacional (KOBBLITZ, 2008).

Ressalta-se que em todos os experimentos, o material lipídico obtido ao final da extração por via Soxhlet apresentava rápida solidificação em temperatura ambiente (25°C), levando a crer que houve uma possível reordenação dos ácidos graxos saturados livres (por exemplo, ácido palmítico) nos triacilglicerois formados pela reação de esterificação.

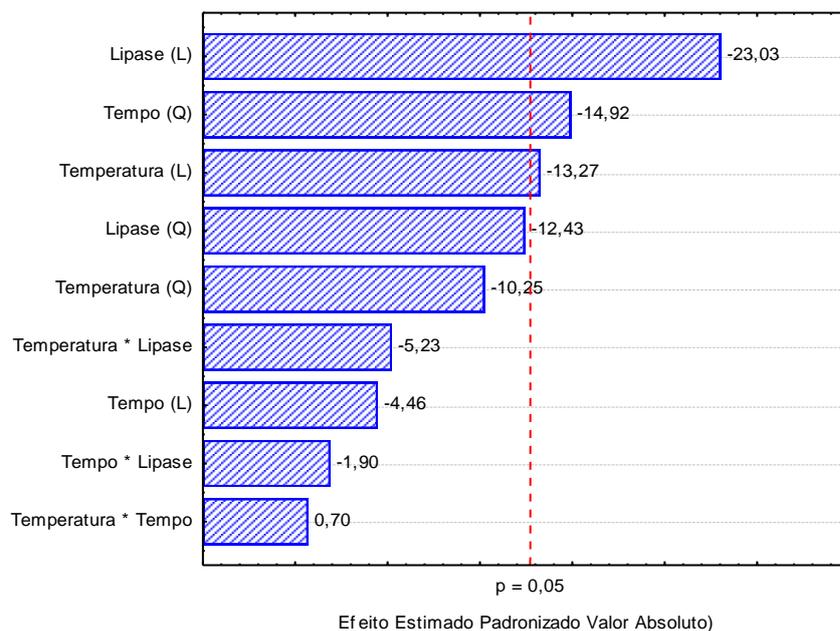
A Tabela 6 mostra a análise de variância aplicada aos dados experimentais do processo enzimático sobre a acidez do óleo residual da TMD. Observou-se que os efeitos Temperatura (L), Tempo (Q) e Lipase (L) foram significativos ($p > 0,05$). Verificou-se que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9711, indicando que 97,11% do Índice de Acidez pode ser explicado pelo modelo, que não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$) podendo ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 6- Análise de variância (ANOVA) do processo enzimático sobre a acidez do óleo residual da TMD

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	P
Temperatura (L)	1,98018	1	1,980183	176,0163	0,0478
Temperatura (Q)	1,18210	1	1,182102	105,0757	0,0619
Tempo (L)	0,22403	1	0,224034	19,9142	0,1403
Tempo (Q)	2,50497	1	2,504974	222,6644	0,0426
Lipase (L)	5,96750	1	5,967501	530,4445	0,0276
Lipase (Q)	1,73929	1	1,739290	154,6036	0,0510
Temperatura*Tempo	0,00551	1	0,005512	0,4900	0,6112
Temperatura*Lipase	0,30811	1	0,308113	27,3878	0,1201
Tempo*Lipase	0,04061	1	0,040612	3,6100	0,3084
Falta de ajuste	0,33450	5	0,066900	5,9467	0,3012
ErroPuro	0,01125	1	0,011250		
Total	11,96614	15			

A Figura 9 mostra a hierarquização dos efeitos através do Diagrama de Pareto, possibilitando a verificação, de forma decrescente, a influência das variáveis independentes sobre as dependentes, neste caso, a resposta é o Índice de Acidez. Visualizou-se que a lipase (linear) apresenta o maior efeito sobre a acidez ($p > 0,05$), ela é a principal responsável pela redução da acidez, ratificando assim a esterificação dos ácidos graxos do óleo residual da TMD submetida ao processo enzimático. Em seguida, têm-se o tempo (quadrático) e a temperatura (linear) apresentando a mesma resposta sobre a acidez ($p > 0,05$).

Figura 9 - Diagrama de Pareto (95% de confiança) para o Índice de Acidez

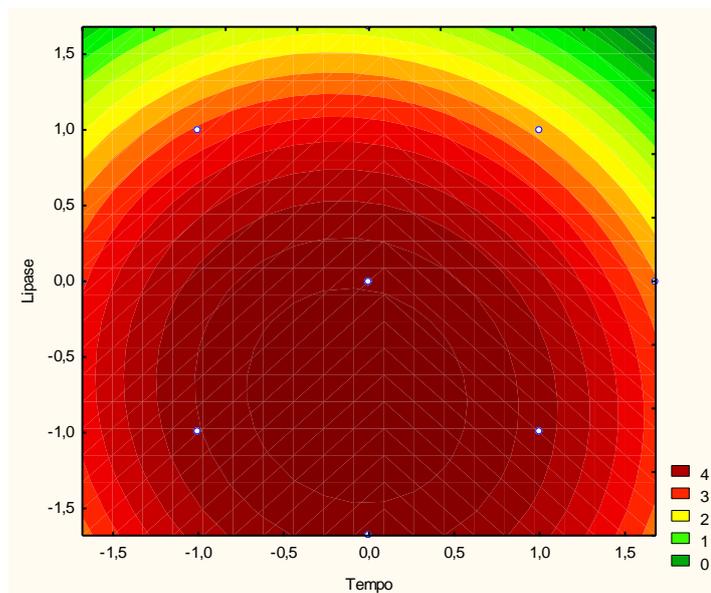


Na Figura 10, são visualizadas as curvas de contorno da acidez do óleo em função do tempo do processo enzimático e da quantidade da enzima, na temperatura de 50°C. Em virtude de a temperatura ser menos influente dentre as demais variáveis, de acordo com o diagrama de Pareto, optou-se por mantê-la constante no ponto central e também em virtude do ponto de vista operacional. Verificou-se que as regiões com maiores quantidades de enzima (1,25 %) e maiores tempos (6 h) foram obtidos os menores Índices de Acidez do óleo. A Equação 12 representa o modelo polinomial obtido das curvas de contorno.

$$IA (\% \text{ ácido oleico}) = 4,7158 - 0,3809 \times \text{Temperatura} - 0,5206 \times \text{Tempo}^2 - 0,6613 \times \text{Lipase}$$

Eq. (12)

Figura 10 - Curvas de contorno do processo enzimático realizado a 50°C



5.3.2 Avaliação do processo enzimático sobre a quantidade de carotenóides na TMD

A análise estatística aplicada aos dados experimentais do processo enzimático realizado com as enzimas simultaneamente demonstrado na (Tabela 7) é apresentada através do cálculo dos efeitos estimados e seus respectivos erros para os carotenóides do óleo residual da TMD48.

Tabela 7 - Efeitos estimados dos parâmetros sobre a concentração de carotenóides

Fator	Efeito	Erro Puro	Teste t	P
Média	184,0554	2,402089	76,62305	0,008308
Temperatura (L)	22,5077	1,845093	12,19870	0,052071
Temperatura (Q)	23,4860	2,241957	10,47568	0,060588
Tempo (L)	38,3145	1,845093	20,76563	0,030634
Tempo (Q)	20,7721	2,241957	9,26515	0,068446
Lipase (L)	28,6396	1,845093	15,52201	0,040957
Lipase (Q)	11,4568	2,241957	5,11019	0,123024
Temperatura*Tempo	0,4256	2,409667	0,17664	0,611200
Temperatura*Lipase	22,2411	2,409667	9,22995	0,120198
Tempo*Lipase	8,1392	2,409667	3,37773	0,183241

As variáveis independentes Tempo (Linear) e Lipase (Linear) demonstraram efeitos significativos positivos sobre a concentração de carotenóides ($p < 0,05$), ou seja, ocorreu um aumento significativo em termos de β -carotenos ($\mu\text{g/gTMD48}$), após o processo enzimático via lipase, a posterior extração via Soxhlet.

O parâmetro tempo apresentou influência sobre a concentração de carotenóides na TMD48. Devido algumas inconsistências nos resultados será necessário um estudo mais aprofundado.

O triacilglicerol apresenta conformação espacial bastante ramificada, deste modo a interação do carotenóides com o triglicerídeo pode não ser eficiente, formando assim camadas com baixa interação. Quando ocorre o rearranjo do triglicerídeo a partir da esterificação sua estrutura também passa a ser mais linear, permitindo assim, que o carotenoide linear presente interaja de forma mais efetiva, aumentando, assim, sua disponibilidade após a hidrólise (PAPOVA et al., 2013).

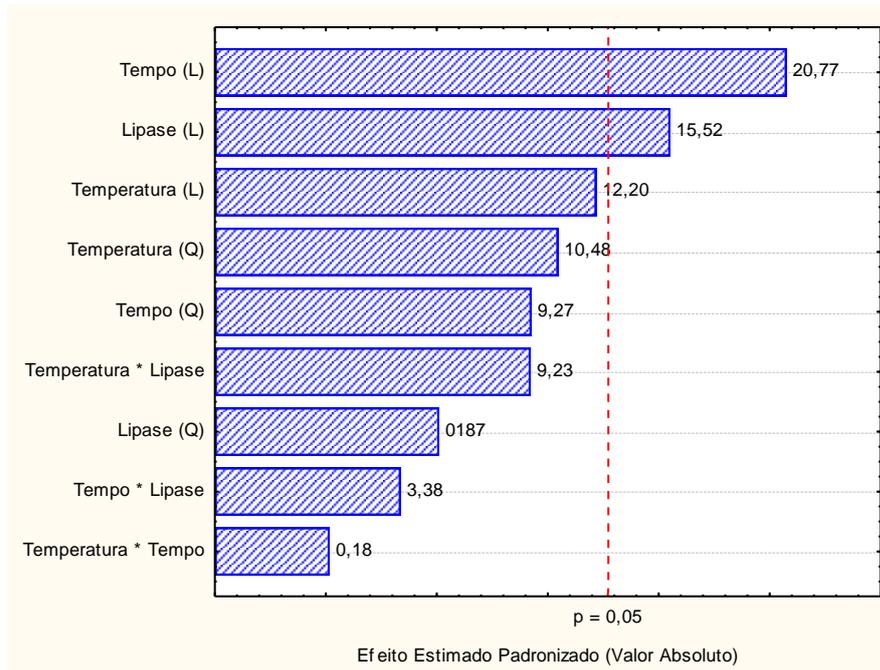
A Tabela 8 demonstra a análise de variância aplicada aos dados experimentais do processo enzimático sobre os carotenoides da TMD48. Verificou-se que apenas os efeitos lineares do tempo e lipase foram significativos ($p < 0,05$), confirmando os resultados demonstrados na Tabela 6. O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,6949, indicando que 69,49% para o teor de carotenóides foi capaz de explicar a variabilidade dos valores experimentais, logo o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$).

Tabela 8- Análise de variância (ANOVA) para concentração de carotenos resultante do processo enzimático.

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	P
Temperatura (L)	1728,11	1	1728,110	148,8084	0,052071
Temperatura (Q)	1274,41	1	1274,408	109,7399	0,060588
Tempo (L)	5007,65	1	5007,651	431,2112	0,030634
Tempo (Q)	996,89	1	996,893	85,8429	0,068446
Lipase (L)	2797,95	1	2797,949	240,9327	0,040957
Lipase (Q)	303,26	1	303,262	26,1140	0,123024
Temperatura*Tempo	0,36	1	0,362	0,0312	0,888697
Temperatura*Lipase	989,33	1	989,333	85,1920	0,068705
Tempo*Lipase	132,49	1	132,494	11,4091	0,183241
Falta de ajuste	5517,60	5	1103,519	95,0246	0,077720
Erro Puro	11,61	1	11,613		
Total	18127,16	15			

A Figura 11 mostra a distribuição dos efeitos dos parâmetros estudados sobre a concentração de carotenos na TMD, através do Diagrama de Pareto. Vale ressaltar que o efeito do tempo teve maior influência, visto que o aumento do tempo favorece a interação as enzimas e substrato.

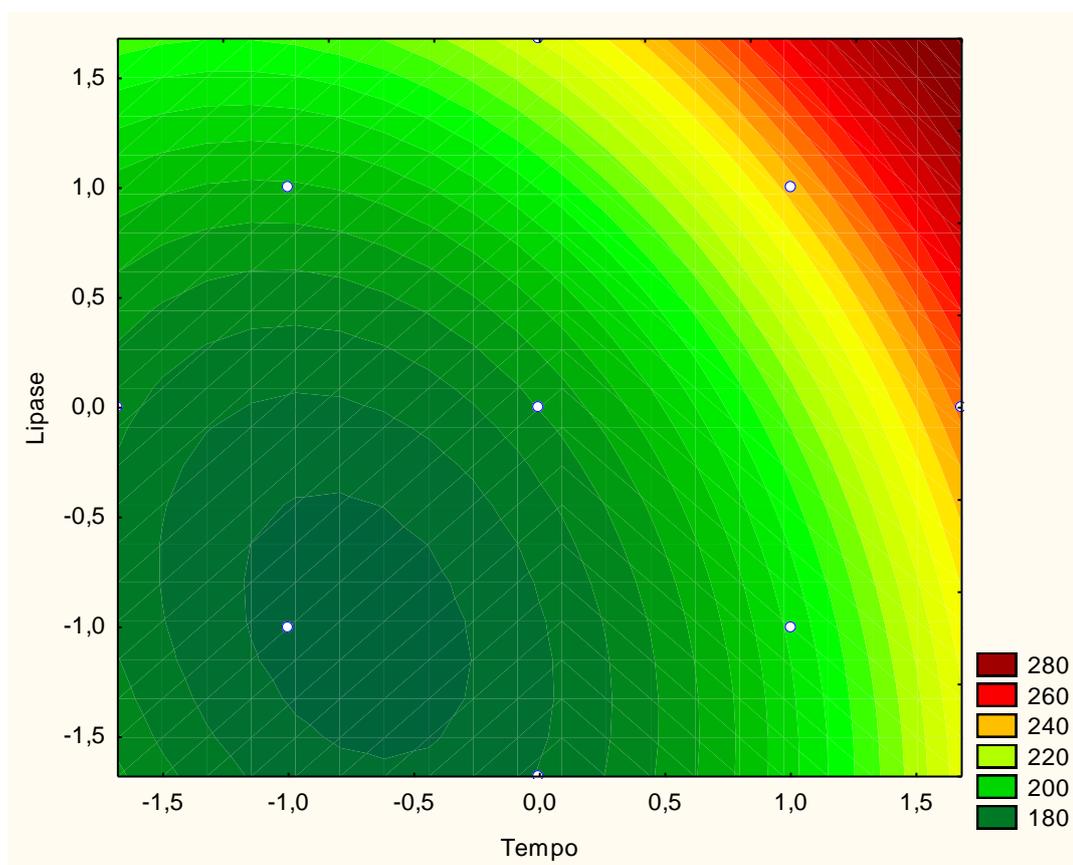
Figura 11 - Diagrama de Pareto (95% de confiança) para a concentração de carotenoides



A Figura 12 mostra as curvas de contorno dos efeitos do tempo e concentração da lipase sobre a massa de carotenos na TMD, optando-se pela temperatura de 50°C por ser o ponto central, pois a temperatura não apresentou influência significativa ($p > 0,05$) de acordo com o Diagrama de Pareto. Observou-se que a partir de 1,4% (p/v) de lipase e 6 horas de processo enzimático obtiveram-se as maiores concentração de carotenoides. A Equação 13 representa o modelo polinomial obtido das curvas para o caroteno.

$$\text{Carotenos} = 184,0554 + 38,3145 \times \text{Tempo} + 28,6396 \times \text{Lipase} \quad \text{Eq.(13)}$$

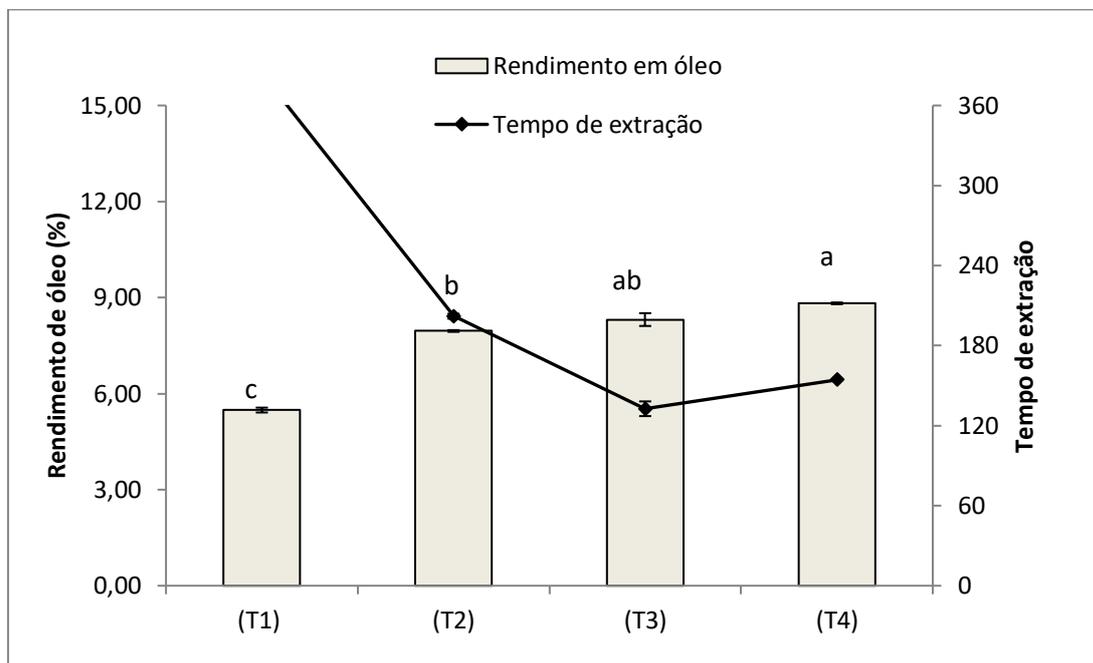
Figura 12 - Curva de contorno da concentração de carotenoides em função da atividade de hidrólise a 50°C.



5.3.2.1 Avaliação do efeito da secagem no tratamento enzimático da TMD com Celulase /Pectinase e Lipase.

A influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e a lipase, em termos do rendimento, IA e teor de carotenoides do óleo, está apresentada nas Figuras 13, 14 e 15, respectivamente.

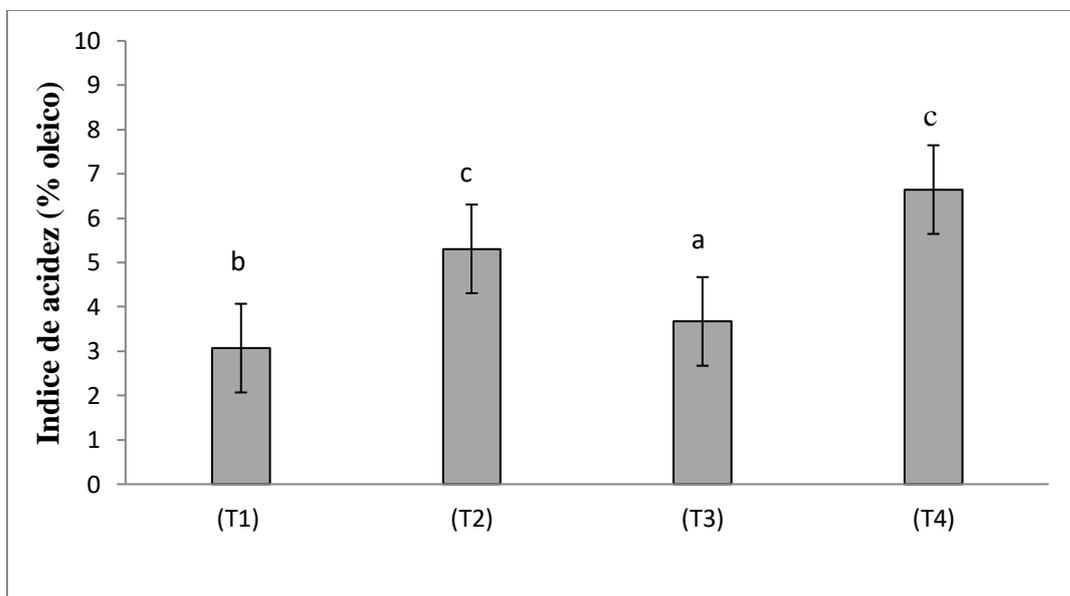
Figura 13 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e lipase em termos do rendimento e tempo de extração do óleo.



T1 e T2 representam, respectivamente, a TMD *in natura*, sem seleção granulométrica e com tratamento enzimático; T3 e T4 representam, respectivamente, TMD48 seca (Teor de Água = 5% b.s.) e *in natura* (Teor de Água = 32% b.s.), com seleção granulométrica e tratamento enzimático em 12 horas de processo.

Nota-se que o experimento feito com T1 foi o que apresentou o menor rendimento de óleo (5,49%) e o maior tempo de extração (360 min) e, quando comparado com T2, apresentou diferença significativa (> 95% de confiança) entre os rendimentos alcançados, evidenciando que as enzimas celulase e pectinase romperam as estruturas celulósicas da TMD liberando o óleo retido das mesmas. Avaliando-se a influência do tamanho da partícula da TMD, observou-se que para T2 e T4, os respectivos rendimentos diferiram estatisticamente, logo, o menor tamanho de partícula tende favorecer a ação enzimática, isto porque ocorre o aumento da área de contato entre o sólido e a solução enzimática. Comparando-se T3 e T4, observou-se que os rendimentos não diferiram estatisticamente, ou seja, o teor de água da amostra *in natura* (32%) não potencializou a ação das enzimas sobre TMD48. Em virtude desta comparação entre os ensaios a TMD48 seca pode ser considerada uma matéria-prima mais estável microbiologicamente por apresentar uma atividade de água reduzida $a_w = 0,457$, aumentando sua vida-de-prateleira em um armazenamento adequado.

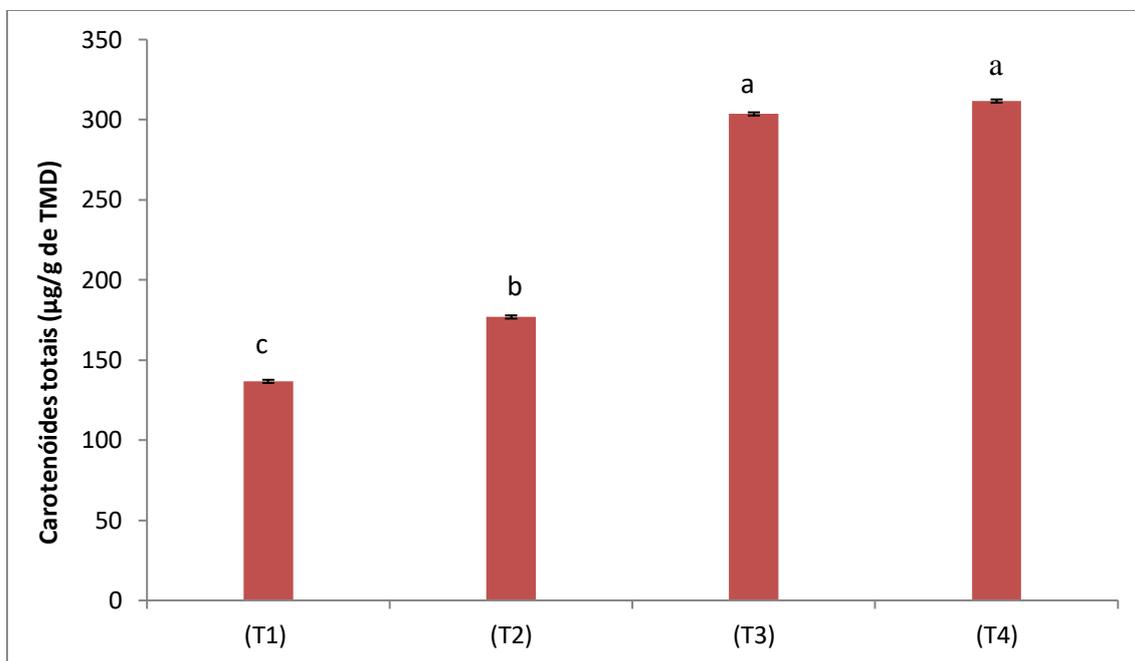
Figura 14 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e lipase em termos do Índice de acidez do óleo residual



T1 e T2 representam, respectivamente, a TMD *in natura*, sem seleção granulométrica e com tratamento enzimático; T3 e T4 representam, respectivamente, TMD48 seca (Teor de Água = 5% b.s.) e *in natura* (Teor de Água = 32% b.s.), com seleção granulométrica e tratamento enzimático de 12 horas de processo.

Nota-se que os experimentos feitos com T1 e T3 resultaram em valores diferentes estatisticamente do Índice de Acidez do óleo, logo a T3 foi submetida ao tratamento de secagem juntamente com o processo enzimático contribuiu para a esterificação do óleo e consequentemente a redução da acidez. No entanto, os experimentos T2 e T4 que resultaram em valores do Índice de Acidez estatisticamente iguais.

Figura 15 - Influência da secagem da TMD na ação da celulase/pectinase e lipase em termos do teor de carotenóides totais, em termos de β -caroteno.



T1 e T2 representam, respectivamente, a TMD *in natura*, sem seleção granulométrica e com tratamento enzimático; T3 e T4 representam, respectivamente, TMD48 seca (Teor de Água = 5% b.s.) e *in natura* (Teor de Água = 32% b.s.), com seleção granulométrica e tratamento enzimático de 12 horas de processo.

Observa-se na Figura 15, que os resultados para T1 e T2, foram significativamente diferentes, logo a ação das enzimas provocaram a liberação de óleo da estrutura celulósica da TMD simultaneamente com os carotenóides. Para T3 e T4 não se observa diferença estatisticamente (> 95% de confiança), logo o teor de água nas amostras não promoveu a degradação dos carotenóides. Ao se comparar T2 e T4 tem-se que a diminuição do tamanho de partícula favoreceu de forma significativa o aumento da concentração de carotenóides na TMD, o que pode ser justificado pela maior superfície de contato da TMD.

5.4 Composição dos ácidos graxos do óleo da TMD

Na Tabela 9 está exposta a composição dos ácidos graxos analisado por CG (Cromatografia Gasosa) do óleo da TMD in natura e hidrolisado.

Tabela 9 – Composição dos ácidos graxos do óleo da TMD in natura e hidrolisado.

Ácidos Graxos	Óleo da TMD <i>antes do tratamento enzimático</i> (g/100g)	Óleo da TMD após tratamento enzimático com lipase (g/100g)
Ácido Caprílico (C8:0)	0,3104	0,6095
Ácido Cáprico (C10:0)	0,3327	0,5574
Ácido Lauríco (C12:0)	5,1475	7,9768
Ácido Tridecanóico (C13:0)	0,0000	0,0000
Ácido Mirístico (C14:0)	2,4787	3,5792
Ácido pentadecilico (C15:0)	0,0480	0,0488
Ácido palmítico (C16:0)	37,7836	33,8763
Ácido palmitoléico (C16:1, ω -7)	0,0529	0,1352
Ácido margárico (C17:0)	0,1054	0,0974
Ácido esteárico (C18:0)	4,5363	4,2621
Ácido oléico (C18:1, ω -9)	37,8435	37,6808
Ácido linoléico (C18:2, ω -6)	10,5678	10,4256
Ácido linolênico (C18:3, ω -3)	0,3318	0,2536
Ácido araquídico (C20:0)	0,4003	0,4187
Ácido beênico (C22:0)	0,6010	0,0787
Total		

Na Tabela 9, apresenta o perfil dos ácidos graxos do óleo da TMD *in natura* e da TMD após os tratamentos enzimáticos. Pode-se observar que a composição dos ácidos graxos do óleo *in natura* caracteriza-se em sua maior proporção em ácidos graxos saturados, destacando-se os ácidos palmítico (37,78%), láurico (5,15%), esteárico (4,54%) e mirístico (2,48%). Enquanto que para os ácidos graxos insaturados destacou-se os ácidos oleico (37,84%), linoleico (10,57%) totalizando em 98,36% da massa de óleo. Em estudo realizado por TanHui – Choon et al., (2009) avaliaram as propriedades do óleo de palma relataram que os principais ácidos graxos saturados foram palmítico (43,7%) e esteárico (4,5%), e os principais ácidos graxos insaturados foram oleico (40,2%) e ácido linoléico (9,6%) mostrando valores similares encontrados neste estudo.

Já no óleo da TMD após os tratamentos enzimáticos apresentaram teores de ácidos palmítico (33,88%), láurico (7,98%), esteárico (4,26%) e mirístico (3,58%), enquanto que para os ácidos graxos insaturados destacou-se os ácido oleico (37,68%) e linoleico (10,43%) e totalizando em 97,8% da massa de óleo.

Os valores dos ácidos graxos C10:0, C8:0, C14:0 e C12:0 evidenciaram um aumento percentual, respectivamente de 67%, 96%, 44% e 54% quando comparados aos demais ácidos graxos saturados da composição inicial. Indicando que o tratamento afetou o perfil de ácidos graxos do óleo, levando a crer que o uso de enzimas celulases e pectinases (Celluclast 1.5 L e Pectinex Ultra SP-L) contribuem tanto para o rendimento de extração como no perfil dos ácidos graxos. Faveriet al., 2008 relataram em seu estudo sobre extração de composto fenólicos de azeitona que as preparações enzimáticas, contribuíram para o aumento da extração de óleo e conseqüentemente para uma elevação no teor compostos fenólicos. Vierhuis et al 2001 ao trabalhar com azeitonas do cultivar *Maraiolo*, relataram que as enzimas pectolíticas pode ter reduzido a complexação de compostos fenólicos com os polissacarídeos pécnicos da fruta, aumentando assim a concentração dos fenóis livres na pasta e em seguida, a sua libertação para o azeite durante o processamento.

Os ácidos graxos saturados da amostra *in natura* (C16:0, C17:0, C18:0) apresentaram valores superiores aos encontrados no óleo da TMD tratada enzimaticamente, apresentando um aumento de 11%, 0,8% e 0,6% respectivamente.

A quantidade de ácidos graxos insaturados na amostra *in natura* foi ligeiramente superior ao encontrado na amostra hidrolisada podendo ser justificado por uma possível oxidação, em contrapartida, para o ácido palmitoleico observa-se um efeito contrário, quando comparando com a amostra *in natura*.

Como a lipase utilizada (Lipozyme CALB L) atua sobre as ligações éster dos triglicerídeos e realiza a interesterificação de ácidos graxos em ambientes com conteúdo restrito de água, modificou as proporções dos ácidos graxos dos triglicerídeos a partir da esterificação, formando triglicerídeos com maior proporção de ácidos graxos saturados, assim promovendo a mudança de estado físico da amostra, caracterizando-se como uma espécie de gordura.

6 CONCLUSÃO

- A TMD apresentou um teor de lipídeos residual de 6,4% estando fortemente ligado ao processo de obtenção do óleo do fruto.
- A TMD48 (0,295 mm) foi escolhida por apresentar a menor partícula e apresentando CRA de $1,74 \pm 0,02$ g H₂O/g TMD, e o grau de umidade da TMD 62,2%.
- As enzimas celulase e pectinase em pH 5, auxiliaram no aumento do rendimento de óleo de 7,22% em 6h e uma redução no tempo de extração via Soxhlet em virtude da duração do tratamento enzimático.
- O índice de acidez manteve-se constante durante todo o processo enzimático com as enzimas celulase e pectinase, apresentando-se em conformidade com o estabelecido pela Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999, com índice de acidez abaixo de 5%.
- A TMD em 6 horas de processo apresentou com 55% de massa de carotenos, onde se mantiveram constantes até 60 h, inferindo-se que o tempo de 6 horas seria suficiente para o tratamento enzimático, contribuindo dessa forma para a redução do custo do processo.
- Verificou-se que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9711, indicando que 97,11% do Índice de Acidez pode ser explicado pelo modelo, que não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$) podendo ser utilizado para fins preditivos.
- Verificou-se que as regiões com maiores quantidades de enzima (1,25 %) e maiores tempos (6 h), obtiveram os menores Índices de Acidez do óleo.
- O coeficiente de determinação (R^2) obtido foi 0,6949, indicando que 69,49% do teor de carotenóides foi capaz de explicar a variabilidade dos valores experimentais, logo o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$).
- Observou-se em condições experimentais de 1,4% (p/v) de lipase e 6 horas de processo enzimático a 50°C obtiveram-se as maiores concentração de carotenoides
- Os resultados mostraram que a hidrólise com a lipase foi suplantada em função da quantidade de água no meio reacional favorecendo a reação contrária, a esterificação dos ácidos graxos livres.

REFERÊNCIAS

ABDELMOEZ, W.; MOSFATA, N. A.; MUSTAFA, A., Utilization of chemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**. v.59. p.290-297.2013.

AUGUSTO, S.; ALVES, O.; LEMOS, O. F. DE; GOMES, B.; LUÍS, A. In vitro embryo rescue of interspecific hybrids of oil palm (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, p. 1–6, 2011.

AVELAR, M. M. H et al. Hydrolyses of vegetable oils catalysed by lipase extract powder from castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**. v 44 p 452- 458, 2013.

BARBOSA, N. G. S. Torta de amêndoa de dendê: consumo, Digestibilidade, metabolismo ruminal e desempenho leiteiro em bubalinos. Belo Horizonte, 2010. 177f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

BUENO, T. Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. Lorena. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

CASTRO, A. M. G de; LIMA, S. M. V; SILVA, J. F. V. Complexo Agroindustrial de Biodiesel no Brasil: competitividade das cadeias produtivas de matérias-primas. Brasília: Embrapa Agroenergia. 2010.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n.1, p.146-156, 2004.

CHEE, K. L.; LING, H. K.; AYOB, M. K.; Optimization of trypsin-assisted extraction, physico-chemical characterization, nutritional qualities and functionalities of palm kernel cake protein. **Food Science and Technology**.v.46. p. 419-427. 2012.

CORLEY, R. H. V., TINKER, P. B. The products of the oil palm and their extraction. **Blackwell Science Ltd**. v. 4. p. 445-466. 2003.

CUNHA, A. G.; Purificação e imobilização de lipases microbianas em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade. Dissertação (Mestrado), Programa de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, 2007.

ENRIQUEZ, G.; SILVA, M. A.; CABRAL, E. Biodiversidade da Amazônia: usos e potencialidades dos mais importantes produtos naturais do Pará. Belém: NUMA/ UFPA, 179 p., 2003.

FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Alimentos e Nutrição Araraquara**. ISSN. 0103-4235. v.19, n.4, p. 427-433, out./dez. 2008.

FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A. Modeling of extraction of carotene and lipids from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 18, p.35-47. 2000.

FRANÇA, L. F.; MEIRELES, M. A. A.; Extraction of oil from pressed palm oil (*Elaeis guineensis*) fibers using supercritical CO₂. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n. 4, p.384-388, 1997.

GAMA, M. F. C. P. J. S.; Purificação e caracterização de lipases de *Penicillium restrictum*. Dissertação (Mestrado), Programa de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

GAN, Q.; BAYKARA, F.; RAHMAT, H.; WEAHERLE, L. R. Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system. *Catalysis Today*, v.56, n. 1-3, p. 179-190, 2000.

HOSNI, K.; HASSEN, I.; CHAABANE, H.; JEMLI, M. ; DALLALI, S.; SEBEI, H.; CASABIANCA, H.; Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**. v. 47. p. 291-299. 2013.

IBERAHIM, N. I.; JAHIM, J. M.; HARUN, S.; NOR, M. T. M.; HASSAN, O.; Sodium Hydroxide Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Mesocarp Fiber. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**. v. 4. p. 101-105. 2013.

ISROI; ISHOLA, M. M.; MILLATI, R.; SYAMSIAH, S.; CAHYANTO, M. N.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Structural changes of oil palm empty fruit bunch (OPEFB) after fungal and phosphoric acid pretreatment. *Molecules*, v. 17, n. 12, p. 14995–5002, 2012.

LAU, H. L. N.; CHOO, Y. M.; MA, A. N.; CHUAH, C. H. Selective extraction of palm carotene and vitamin E from fresh palm-pressed mesocarp fiber (*Elaeis guineensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**. v.84, p.289–296. 2008.

LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A. Improved lycopene extraction from tomato peels using cell-wall degrading enzymes. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 228, p. 153-158, 2008.

LOBO, C. Cultura do dendê pode ser a solução para a região bragantina. Secretaria de Estado de desenvolvimento, Ciência e Tecnologia – SEDECT. 2009. Disponível em: <www.seduct.pa.gov.br/index.php?q=node/420>. Acesso em: 26 jan. 2015.

MAKASÇI, A.; ARISOY, K.; Deacidification of High Acid Olive by Immobilized Lipase. **J. Chemistry**. v. 20. p. 258-264. 1996.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Dendeicultura da Bahia. CONAB, agosto, 2006.

MARANGONI, A. G. Enzyme Kinetics- A modern Approach. 1. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MUSTAPA, A.N.; MANAN, Z.A.; MOHD AZIZI, C.Y.; SETIANTO, W.B.; MOHD OMAR, A.K. Extraction of β -carotenes from palm oil mesocarp using sub-critical R134a. **Food Chemistry**. v. 125, p.262-267. 2011.

OBIBUZOR, J. U., OKOGBENIN, E. A., ABIGOR, R. D., Oil recovery from palm fruits and palm kernel. **Palm oil: Production, processing, characterization and uses**. P 299-328. 2012.

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

PEREZ, E. E., FERNÁNDEZ, M. B., NOLASCO, S. M., CRAPISTE, G. H., Effect of pectinase on the oil solvent extraction from different genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Food Engineering**. v. 117. p. 393-398. 2013.

PURI, M., SHARMA, D., BARROW, C. J., Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**. v. 30. N. 1. 2012.

RAMANI, K., BOOPATHY, R., VIDYA, C., KENNEDY, L. J., VELAN, M., SEKARAN, G., Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil. **Process Biotechnol.** v. 45. p.986-992. 2010.

RANVVER, R. C., PATIL, S. N., SAHOO, A. K., Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. **Food and Bioproducts Processing**. v. 91. p. 370-375. 2013.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

REDSHAW, M. Utilization of field residues and mill by-products.). Oil Palm: management for large and sustainable yields. In: Fairhurst, T.; Härdter, R. Ed. Singapore: PPI: PPIC; Basel: IPI. p. 307-320, 2003.

RODRIGUES FILHO, J. A.; BATISTA, H. A. M.; CAMARÃO, A. P.; SILVA, E. D. Composição química e digestibilidade “in vitro” da matéria seca de resíduos agroindustriais no estado do Pará. Belém: Embrapa-Amazônia Oriental: EMBRAPA-CPATU, 1987.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. Fontes brasileiras de carotenóides – Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos, Ministério do Meio Ambiente, 100 p., 2008.

S. Rivera, R. Canela, Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize, *Molecules* 17 (2012) 11255–11268.

SAW, H. Y.; JANAUN, J.; SUBBARAO, D.; Hydration properties of palm kernel cake. **Journal of Food Engineering**. v. 89 p. 227-231. 2008.

SHARMA, A.; CHAURASIA, P.S.; DALAI, A. K.; Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p 93-100, 2013.

SOWBHAGYA, H. SRINIVAS, P.; PURNIMA, K.T.; KRISHNAMURTHY, N.; Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (*Cuminumcyminum* L.) seeds. **Food Chemistry**. v. 127. p. 1856-1861. 2011.

TABI, A. N. M.; ZAKIL, F. A.; FAUZAN, W.N.; FAUZAI, M.; ALI, N.; HASSAN, O. The usage of empty fruit bunch (efb) and palm pressed fibre (ppf) as substrates for the cultivation of pleurotusostreatus. **JurnalTeknologia**, v. 49, p. 189–196, 2008.

TAIEB-HADJ, N.; GRATI, N.; AYADI, M.; , ATTIA, I.; BENSALÉM, H.; GARGOURI, A.; Optimisation of olive oil extraction and minor compounds content of Tunisianolive oil using enzymatic formulations during malaxation. v. 62. p. 79-85. 2012.

TORO-CARDENAS, F. P.; ALAY-ALCÁZAR, S. C.; COUTINHO, J. P.; GODOY, H. T.; CARNEIRO, T. F.; MEIRELES, M. A. A.; Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. **FoodandBioproducts Processing**.v.94. p. 90-100.

VIEGAS, I. J.; MULLER, A. A. A cultura do Dendezeiro na Amazônia Brasileira. Manaus: EMBRAPA-AMAZONIA ORIENTAL, 374p. 2000.

VON LINTIG, J., 2012. Metabolism of carotenoids and retinoidsrelated to vision. **J. Biol. Chem.** 287, 1627–1634.

WAN ZAHARI, M.; ALIMON, A. R. Use of palm kernel cake and oil palm by-products in compound feed. **Palm Oil developments**, v.8, n.40, p.5-9, 2004.

Yahya, A.R.M., Anderson, W.A., Moo-Young, M., 1998. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme Microb. Technol.** 23, 438–450.

ZAKARIA, M. R.; HIRATA, S.; HASSAN, M. A.; Combined pretreatment using alkaline hydrothermal and ball milling to enhance enzymatic hydrolysis of oil palm mesocarp fiber. **Bioresource Technology**. v.169. p. 236-243. 2014.