

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – DCT CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE JEQUIÉ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DHIÉSSICA DOS SANTOS RIBEIRO

Aplicação de enzimas obtidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 em formulações de detergentes através da fermentação da casca da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Jequié – BA

Dezembro de 2020

DHIÉSSICA DOS SANTOS RIBEIRO

Aplicação de enzimas obtidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 em formulações de detergentes através da fermentação da casca da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do

Nascimento Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Gildomar

Valasques Junior

Jequié - Ba

Dezembro de 2020

R484a Ribeiro, Dhiéssica dos Santos.

Aplicação de enzimas obtidas por Penicillium camemberti ATCC 4845 em formulações de detergentes através da fermentação da casca da jaca (Artocarpus heterophyllus Lam.) / Dhiéssica dos Santos Ribeiro.- Jequié, 2020.

80f.

(Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior e coorientação do Prof. Dr. Gildomar Valasques Júnior)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

DHIÉSSICA DOS SANTOS RIBEIRO

Aplicação de Enzimas obtidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 em Formulações de Detergentes através da fermentação da Casca da Jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior (UFRJ, Rio de Janeiro - RJ,2008) (Orientador)

Prof. Dr. Gildomar Lima ValasquesJunior (UEFS, Feira de Santana – BA, 2014) (Coorientador)

> Profa. Dra. Tatielle Pereira Silva (UFAL, Maceió - AL,2020)

Prof. Dr. Nívio Bastista Santana (UESC, Ilhéus – BA, 2017)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 18/12/2020

Ao meu maravilhoso Deus, que tanto me ajudou nos momentos difíceis, esteve sempre cuidado de mim. A minha família e amigos que me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o autor da vida, aquele me ama e cuida tão bem de mim. Palavras não são suficientes para expressar tamanha gratidão, a todo instante Jesus demonstrou o seu cuidado, nos momentos alegres eu sabia que Ele estava comigo e nos momentos difíceis permanecia ao meu lado me dando forças, me sustentando a cada dia. Me sinto honrada por ser filha de Deus, pois como diz uma canção: "Eu não sou mais escrava do medo, eu sou filha de Deus.". Ele é o meu sustento, o meu refúgio, a minha fortaleza, Ele é tudo, nada sou sem a presença do Senhor na minha vida. Por momentos eu pensei que não iria conseguir, mas o Senhor me mostrou que os filhos de Deus são criados para vencer, aqui estou. Eu venci! Glórias a Deus, o maravilhoso Deus!

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, por acreditarem em mim, confiarem e sempre estarem me apoiando em tudo. Vocês são minha inspiração, me motivam todos os dias a continuar seguindo independente das circunstâncias, porque o amanhã virá e ele será melhor do que o dia que se passou. São exemplos de determinação, honestidade, dignidade, força e fé. Amo vocês!

Ao meu irmão por sempre torcer por mim, mesmo que em alguns momentos me tire a paciência, sei que me ama e que sempre deseja o melhor pra mim. Amo você!

Aos meus amigos, em especial a Jabson, Alexsandra e Romário por todo apoio que me deram, não imaginam o bem que me fazem e o quanto sou grata a Deus pela vida de vocês. Que Jesus vos abençoe hoje e sempre.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre me motivaram e desejaram meu bem.

Aos amigos que fiz nessa jornada, tanto em laboratório, como em outros lugares. O apoio de cada um foi muito importante pra mim.

Não podia deixar de agradecer as pessoas que me ajudaram desde o início, na época da graduação, Kátia Iro, Nivio Batista, Marcelo Franco e Graziele Sales. Aprendi muito com vocês e sou imensamente grata por cada oportunidade.

A minha IC Layla Valasques, que me deu suporte na produção deste trabalho. Você foi mais que uma IC, uma amizade foi construída e sou grata pela ajuda, pelas palavras que

foram ditas a mim. Você é uma pessoa maravilhosa, dedicada e desejo muito sucesso a você.

Agradeço a todos os funcionários da UESB, em especial aos funcionário do setor de transporte dos três campus (Itapetinga, Vitória da conquista e Jequié) e dos serviços gerais por toda ajuda e acolhimento. Nos momentos que mais precisei de ajuda com "minhas jacas" vocês estavam lá comigo.

A família do sítio, no cajueiro da cidade de Jequié/Bahia, por ter me concedido as jacas e por ter nos recebido tão bem no lar deles.

Aos meus colegas de turma por todo apoio e por toda alegria que transmitiram.

A todos os professores que fizeram parte do meu processo de formação.

A professora coordenadora do laboratório, Maíra.

Ao meu orientador Prof. Dr. Baraquizio que aceitou me orientar neste trabalho. Sou muito grata a Deus por todo suporte e apoio que me deu durante esse período e até mesmo na época da graduação por ter me concedido a oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica. Aprendi muito com o senhor, não só em relação a vida acadêmica, mas também no geral, aprendi com o ser humano que o senhor é. No momento que estava precisando muito de ajuda o senhor foi compreensivo comigo, me aconselhou, me ajudou da forma que estava ao seu alcance e sou imensamente grata por isso. No mundo em que vivemos é muito difícil encontrar pessoas que se coloquem no lugar do outro e o senhor faz isso. Que Jesus te abençoe cada vez mais, muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gildomar por todos os ensinamentos, por todo suporte que me deu durante o trabalho.

A UESB, e ao Programa de Pós-graduação em Química.

A CAPES pela ajuda financeira.

Aos membros da banca

Aplicação de enzimas obtidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 em formulações de detergentes através da fermentação da casca da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Discente: Dhiéssica dos Santos Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

RESUMO

As enzimas obtidas por microrganismos tem sido alvo de investigações por apresentarem uma variedade de aplicações em setores industriais distintos. Diante da variedade de aplicações, estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de encontrar combinações ideias para obtenção destas com características vantajosas para aplicação industrial. O objetivo deste trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar as enzimas amilase, celulase e lipase produzidas por Penicillium camemberti ATCC 4845 e aplicá-las como aditivo em formulações de detergentes. As Condições experimentais ótimas para a produção das enzimas foram estabelecidas utilizando um planejamento Box-Behnken, com três níveis. As variáveis foram concentração de esporos (10^x esp/grama de resíduo), temperatura (°C) e tempo (dias). Os Resultados mostraram que as melhores condições de produção para a enzima amilase (17,32 ± 0,029 U/mL) foram 5 dias de fermentação, 25 °C e concentração de esporos de $10^7/g$. Para a enzima celulase (19,09 ± 0,010 U/mL) foram 5 dias de fermentação, 35 °C e concentração de esporos de 10⁷/g, já para a enzima lipase (16,42 ± 0,009 U/mL) foram 10 dias de fermentação, 25 °C e concentração de esporos de 10⁵/g. As melhores condições apresentadas para determinação da atividade das enzimas foram em pH 7,0 e temperatura de 50 °C. Os ativadores das enzimas foram Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Fe³⁺, no geral, os inibidores foram Zn²⁺ e o aumento da concentração de Fe³⁺. Os dados valores obtidos dos parâmetros cinéticos foram, K_m 3,6 mM e $V_{máx}$ 0,27 mmol min⁻¹, para a amilase, K_m 8,42 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 0,12 mmol min⁻¹, para celulase e K_m 0,14 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 6,78 mmol min⁻¹, para lipase. Uma prospecção tecnológica de patentes sobre o uso de enzimas em formulações para detergentes foi realizada para direcionar uma aplicação das enzimas em estudo. O extrato multienzimático foi adicionado a um detergente comercial, para avaliar sua eficiência na remoção de sujidades em tecidos de algodão, com molho de tomate, gema de ovo e óleo de soja. As enzimas se mostraram compatíveis com a composição do detergente comercial e eficientes na remoção de manchas, destacando um potencial destas enzimas na aplicação em formulações de detergentes. Com isso, o trabalho destaca a importância das enzimas no setor industrial e a necessidade de avaliar as condições ideias para produção das mesmas.

Palavras-chave: Amilase, celulase, lipase, prospecção tecnológica e remoção de manchas.

SUMÁRIO

1. Introdução geral	18
2. Objetivos	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
CAPITULO 1	21
Resumo	21
1.1 Introdução	21
1.2 Metodologia	23
1.3 Resultados e discussão	24
1.3.1 Associação das palavras-chave com os códigos CIP e CCP	24
1.3.2 Depósito de patentes por ano	26
1.3.3 Países depositantes de patentes	27
1.3.4 Mapeamento de enzimas aplicadas na formulação de detergentes	29
1.4 Considerações finais	30
1.5 Referências	30
CAPÍTULO 2	32
Resumo	32
2.1 Introdução	32
2.2 Resíduos agroindustriais	33
2.3 Processo de fermentação para produção de enzimas	35
2.4 Penicillium camemberti	36
2.5 Enzimas	37
2.5.1 Amilase	37
2.5.2 Celulase	38
2.5.3 Lipase	39
2.6 Aplicação biotecnológica e industrial de enzimas	40
2.7. Considerações finais	41
2.8. Referências	42
CAPÍTULO 3	47
Resumo	47
3.1. Introdução	47
3.2 Materiais e métodos	48
3.2.1 Microrganismo e preparo do inoculo	48

	3.2.2 Obtenção e preparação do resíduo	. 50
	3.2.3 Obtenção do extrato sem fermentar	. 50
	3.2.4 Determinação das condições ótimas para produção das enzimas	. 50
	3.2.5 Processo de fermentação e obtenção do extrato enzimático bruto	. 51
	3.2.6. Determinação da atividade enzimática	. 52
	3.2.7 Fracionamento das enzimas em sulfato de amônio	. 53
3.	2.8. Caracterização enzimática	. 54
	3.2.8.1 Determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo <i>Penicillium Camemberti</i> (ATCC 4845)	
	3.2.8.2 Efeito de íons sobre a atividade das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo <i>Penicillium Camemberti</i> (ATCC 4845)	. 54
	3.2.8.3 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas amilase, celulase e lipa produzidas pelo <i>Penicillium Camemberti</i> (ATCC 4845)	
	3.2.9 Aplicação das enzimas em formulação de detergentes	. 55
	3.2.9.1 Compatibilidade e estabilidade das enzimas amilase, celulase e lipase com detergentes de roupas comerciais	. 55
	3.2.9.2 Teste de lavagem	. 55
3.	3 Resultados e discussão	. 56
	3.3.1 Caracterização físico-química do resíduo da casca da jaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.)	. 56
	3.3.2 Prospecção enzimática no extrato sem fermentar	. 57
	3.3.3 Condições ótimas de fermentação para produção das enzimas amilase, celulas e lipase	
	3.3.4 Caracterização enzimática	62
	3.3.4.1 Determinação do pH e temperatura ótimos	62
	3.3.4.2 Influência de sais	. 68
	3.3.4.3 Parâmetros cinéticos	. 70
	3.3.5 Aplicação das enzimas em formulações de detergentes	. 72
	3.3.5.1 Compatibilidade e estabilidade das enzimas em detergentes comerciais	. 72
	3.3.5.2 Teste de lavagem	. 74
3.	6 Considerações finais	. 76
3.	7 Referências	. 76
1.	3 Considerações finais gerais	. 80

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Distribuição do número de patentes por classe, referente a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CIP nas bases de dados INPI e EPO25
Figura 2. Distribuição do número de patentes por classe, referente a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CCP na base de dados EPO
Figura 3. Número de depósitos de patentes por países de origem relacionados a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CIP e CCP
Figura 4. Países depositantes de patentes relacionadas a utilização de enzimas em formulação de detergentes, nas bases INPI e EPO
Figura 5. Depositantes de patentes relacionadas a utilização de enzimas em formulação de detergentes, nas bases INPI e EPO
Figura 6. Enzimas utilizadas na formulação de detergentes, destacadas nas patentes depositadas nas bases INPI e EPO
Capítulo 3
Figura 1. Esquema ilustrado do inoculo do <i>Penicillium Camemberti</i> (ATCC 4845), crescimento e procedimentos utilizados para obtenção da solução de esporos49
Figura 2. Fruto coletado, em estufa de secagem com circulação de ar e triturado50
Figura 3. Esquema ilustrando a fermentação em estado sólido, obtenção do extrato enzimático bruto e a dosagem enzimática
Figura 4. Superfície de resposta da desejabilidade global

Figura 5. Diagrama de Pareto para concentração de esporos 10^x , temperatura (°C) e tem	ıpo
(dias) para otimização da obtenção das enzimas amilase, celulase e lipase p	or
PenicilliumCamemberti através da fermentação em estado sólido	.61
Figura 6. Superfície de resposta para a enzima amilase	.63
Figura 7. Superfície de resposta para a enzima celulase	.63
Figura 8. Superfície de resposta para a enzima lipase	.64
Figura 9. Gráfico de pareto para a enzima amilase	.65
Figura 10. Gráfico de pareto para a enzima celulase	.65
Figura 11. Gráfico de pareto para a enzima lipase	.66
Figura 12. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de amilase	.69
Figura 13. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de celulase	.69
Figura 14. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de lipase	.70
Figura 15. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da amilase Penicillium camemberti ATCC 4845	
Figura 16. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da celulase Penicillium camemberti ATCC 4845	
Figura 17. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da lipase Penicillium camemberti ATCC 4845	
Figura 18. Compatibilidade das enzimas amilase, celulase e lipase secretadas prenicillium camemberti ATCC 4845 com fórmulas comerciais de detergente	-
Figura 19. Estabilidade das enzimas amilase, celulase e lipase <i>Penicillium camembe</i> ATCC 4845 incubadas 50°C com detergente D2	
Figura 20. Tecidos sem tratamento, manchados com: com molho de tomate (a), gema ovo (b) e óleo de soja (c)	
Figura 21. Remoção de manchas em tecido com molho de tomate (a), gema de ovo (b) óleo de soja (c) através da solução detergente-enzimas: (1) peças incubadas com ág destilada; (2) peças incubadas com água destilada e 1mL de detergente; (3) peç	gua

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Estratégia de busca de patentes usando os bancos de dados INPI e EPO24
Capítulo 3
Tabela 1. Matriz do planejamento Box-Behnken para avaliação das condições ótimas na produção das enzimas estudas quanto à concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação
Tabela 2. Planejamento Doehlert para determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas, amilase, celulase e lipase
Tabela 3. Tratamentos para avaliar a eficiência da solução detergente-enzimas56
Tabela 4. Caracterização físico-química da casca da jaca (<i>Artocarpus heterophllu</i> . Lam.)
Tabela 5. Atividade das enzimas em estudo no extrato da casca da jaca mole (<i>Artocarpu. heterophyllus</i> Lam.) sem fermentar
Tabela 6. Atividade enzimática após fermentação de acordo com planejamento experimental para as enzimas amilase, celulase e lipase
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) pela desejabilidade em 95 % de intervalo de confiança
Tabela 8. Matriz Doehlert empregada na otimização das condições (pH e temperatura) de reação com amilase, celulase e lipase de <i>Penicillium camemberti</i> ATCC 4845
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) com 95 % de intervalo de confiança para a enzima amilase
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) com 95 % de intervalo de confiança para a

enzima celulase......67

Tabela	11. <i>A</i>	Análise	de vari	ância	(ANOVA) com	95 %	de de	interval	o de	confiança	para a
enzima	lipas	se										67

LISTA DE ABREVIATURAS

- atm Atmosfera
- °C Graus Celsius
- CCP Classificação Cooperativa de Patentes
- CIP Classificação Internacional de Patentes
- Cm Centímetros
- CMC Carboximetilcelulose
- CL Celulose
- CZ Cinzas
- D1 Detergente comercial um
- D2 Detergente comercial dois
- D3- Detergente comercial um três
- DNS Ácido 3,5 dinitrosalicílico
- EE Extrato Etéreo
- EPO European Patent Office
- F Teste de Fisher
- FES Fermentação em Estado Sólido
- FDA Fibra em Detergente Ácido
- FDN Fibra em Detergente Neutro
- FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz
- g Gramas
- GL- Grau de liberdade
- HC Hemicelulose
- INPI Instituto Nacional da Propriedade Intelectual
- K_m- Constante de Michaelis
- LG Lignina
- min Minuto
- mg miligrama
- mL Mililitro
- mm Milímetro
- mol.L⁻¹ Mol por litro
- mM Milimol
- umol Micromol
- MM Matéria Mineral
- MS Matéria Seca
- MSR Metodologia de Superfície de Resposta
- m/v Relação massa por volume
- nm Nanômetro
- P Nível de Probabilidade
- P.A. Para Análise
- PDA Potato Dextrose Agar
- *p*-NPP Paranitrofenol
- p/v Relação peso por volume
- PB Proteína Bruta
- QM Quadrado médio
- R² Coeficiente de Determinação
- SQ Soma dos Quadrados
- T-Temperatura

T - tempo

UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

U/mL - Relação Unidade de atividade enzimática por mililitros de extrato multienzimático

V_{max} − Velocidade máxima de reação v/v − Relação volume por volume

1. Introdução geral

A Prospecção Tecnológica proporciona o levantamento de tecnologias desenvolvidas ou em desenvolvimento. A busca é realizada em bases de acesso livres e/ou privadas. Através das informações coletadas é possível identificar quais as lacunas de uma determinada tecnologia, os inventores, países de origem das patentes, países onde ocorrem os depósitos, as empresas depositantes ou se são depositantes independentes, a classificação das patentes de acordo com catálogo da Classificação Cooperativa de Patentes (CCP) ou da Classificação Internacional de Patentes (CIP), entre outros dados (DE OLIVEIRA et al., 2005; LIMA et al., 2019; SPEZIALI et al., 2015; QUINTELLA, et al. 2011).

Essa ferramenta influência na tomada de decisões, podendo nortear o desenvolvimento de uma pesquisa, permite que o pesquisador se aproprie da Propriedade Intelectual (PI) e estimula os sistemas de inovação (QUINTELLA, et al. 2011).

As enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica e são de grande interesse industrial. Elas podem ser obtidas através de animais, vegetais e microrganismos. Enzimas provenientes de microrganismos se destacam devido as características que estas apresentam. De forma geral, possuem menor tempo de produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade (PENHA, et al. 2016; SINGH et al., 2016).

O uso de enzimas em escala industrial ainda é limitado por apresentar um elevado custo de produção. Por esse motivo, estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de obtê-las com alto rendimento e baixo custo (WANDERLEY, et al. 2011).

Um dos processos que pode ser utilizado para produção de enzimas é o de fermentação em estado sólido, onde pode ser aplicado os resíduos agroindustriais juntamente com microrganismos. Nesse caso, o resíduo também chamado de substrato atua como suporte para o crescimento dos microrganismos e fonte de nutrientes como carbono, nitrogênio, minerais, entre outros (GEOFFRY et al., 2018).

A fermentação em estado sólido apresenta algumas vantagens como, a baixa quantidade de água necessária para conduzir o processo fermentativo, possibilidade de utilizar fontes de nutrientes alternativas, como os resíduos agroindustriais, tornando o processo economicamente viável, contribuindo para a redução dos custos de produção de enzima (ARORA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

As enzimas por ser uma alternativa aos catalisadores químicos tem se destacado em processos biotecnológicos (SILVA et al., 2017). Elas se sobressaem como um dos principais componentes em diferentes processos industriais e biotecnológicos (FERREIRA et al., 2020). As indústrias de detergentes são exemplos do grupo de consumidores de enzimas, tanto em termos de volume quanto de valor. Seu uso em formulações de detergentes aumenta a capacidade de remover manchas difíceis, além disso torna-os produtos ambientalmente amigáveis (DE SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

2. Objetivos

2.1 Geral

Produzir, caracterizar e aplicar as enzimas amilase, celulase e lipase produzidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 e aplicá-las como aditivo em formulações de detergentes.

2.2 Específicos

- Realizar uma prospecção tecnológica do uso de enzimas em formulações para detergentes;
- Realizar uma revisão narrativa sobre aplicação de resíduos da agroindústria na fermentação em estado sólido;
- Avaliar a eficiência do resíduo casca de jaca (Artocarpus heterophyllus Lam.)
 como substrato para a produção das enzimas amilase, celulase e lipase por Penicillium camemberti ATCC 4845 em fermentação sólida;
- Otimizar o processo de produção das enzimas;
- Avaliar as características físico-química quanto ao pH, temperatura, Influência de íons e K_m e $V_{m\acute{a}x}$;
- Avaliar a aplicação destas no processo de remoção de manchas.

CAPITULO 1

Prospecção tecnológica de patentes sobre o uso de enzimas em formulações de detergentes

Resumo

Algumas enzimas apresentam potencial para sua utilização em formulações de detergentes, pois melhora a capacidade de remoção de sujidades e o torna menos prejudicial ao meio ambiente. Com isso, elas vem ganhando espaço em pesquisas, sendo cada vez mais utilizadas pelas industriais do setor. O objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção tecnológica do uso de enzimas em formulações para detergentes, avaliando os países depositantes dessas patentes, os anos de depósitos, as empresas detentoras dessa tecnologia e as enzimas mais aplicadas. Para isso, a prospecção foi realizada utilizando duas bases de dados livres de depósitos de patentes, o European Patent Office (EPO) e o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI). Os dados obtidos foram apresentados em forma de gráficos através do software Microsoft Office Excel® versão 2007 e analisados. Os resultados demonstraram que a Alemanha e o Brasil aparecem como maiores depositantes, os maiores números de patentes foi depositado nos anos de 2016 e 2017, a maioria realizados por empresas privadas. As patentes encontradas no INPI eram mais antigas, não se enquadravam no critério dos últimos dez anos. As enzimas mais aplicadas em formulações de detergentes são as amilases, celulases e lipases. Com este estudo fica clara a importância de uma prospecção tecnológica, porque a coleta de dados sobre patentes de uma determinada tecnologia auxilia no desenvolvimento de trabalhos inovadores. Sendo assim, o trabalho contribui de forma positiva para pesquisas na área de aplicação de enzimas em formulações de detergentes.

Palavras-chave: Propriedade intelectual, patentes, remoção de sujidades, inovação.

1.1 Introdução

As enzimas apresentam um potencial interessante para o setor industrial, pois podem fazer com que reações ocorram em condições suaves. Os processos de obtenção de enzimas tem evoluído, com o intuito de aumentar seu rendimento, baixar custo de produção, facilitar o processo de produção, diminuir tempo de processamento e baixar consumo de energia. Por esse motivo, houve um aumento de suas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, agricultura, produtos químicos, entre outras (PENHA, et al. 2016; SINGH et al., 2016).

Para que esse processo de catálise ocorra a partir de uma enzima, é necessário que ela se ligue a um ou mais reagentes, que são chamados de substratos e para que uma enzima exerça sua atividade é necessário a presença de moléculas, denominadas cofatores e/ou coenzimas. A parte da enzima que se liga ao substrato e/ou ao cofator é chamado de sítio ativo. No sítio ativo é onde acorre a interação entre a enzima-substrato de forma instável, que em seguida se desfaz liberando o produto, mesmo tendo participado da reação a enzima permanece intacta. As interações que ocorrem são intermoleculares, as quais promovem um estado de transição, que diminui a energia de Gibbs, consequentemente aumentando a velocidade da reação (STRYER, 2014). Se a função da enzima estiver diretamente ligada a quebra de gordura, proteínas, amido, que são consideradas impurezas em um tecido, ela irá remover estas impurezas podendo assim, serem incorporadas à formulação de detergentes para roupas, que são chamados de detergentes enzimáticos.

Uma das aplicações mais promissoras de enzimas é na formulação de detergentes para roupas e louças. Geralmente são utilizadas as amilases, celulases, lipases e proteases, sendo que cada uma atua no seu respectivo substrato (MITIDIERI et al., 2002). Os detergentes que apresentam enzimas em sua composição tendem a ser mais eficientes, mesmo com baixas concentrações das mesmas, quando comparado aqueles que apresentam os fosfatos como base e representam 40% da produção mundial total de detergentes. A utilização de enzimas para a produção de detergentes traz benefícios ao meio ambiente, pois os produtos auxiliam na diminuição de impactos ambientais por se tratar de um produto biodegradável, e os produtos químicos tóxicos que seriam descartados na natureza são substituídos por insumos biodegradáveis (HEMLATA et al., 2016).

A prospecção tecnológica é um meio em que se pode avaliar o desenvolvimento da ciência e tecnologia, podendo assim, dar um direcionamento ao pesquisador, diante dos dados coletados. Com essa ferramenta pode-se ampliar a capacidade de antecipação e estimular a organização dos sistemas de inovação, nos setores industrias e acadêmicos. Através da mesma é possível avaliar o estágio de uma determinada tecnologia e como ela está inserida na sociedade, além de indicar quais são as lacunas ainda existentes nesta tecnologia (DE OLIVEIRA et al., 2005; LIMA et al., 2019; SPEZIALI et al., 2015).

Essa ferramenta possibilita também o conhecimento e acesso a patentes nacionais e internacionais. Com o aumento da demanda de patentes foi necessário criar formas de organizar, catalogar e arquivar os documentos de patentes, de uma forma que

posteriormente uma determinada patente fosse facilmente encontrada. Nesse objetivo, foram criadas a Classificação Internacional de Patentes (CIP), que apresenta 70 mil grupos e a Classificação Cooperativa de Patentes (CCP), com 200 mil grupos. Com o grupo selecionado fica fácil identificar patentes relacionadas ao tema em questão. Diante das vantagens apresentadas, este trabalho buscou realizar um mapeamento tecnológico sobre a utilização de enzimas em formulações de detergentes, avaliando quais enzimas geralmente são utilizadas, a quantidade de depósitos, o perfil dos depositantes e os países com maior número de patentes, apresentando de forma geral o desenvolvimento tecnológico da aplicação das enzimas neste setor.

1.2 Metodologia

A prospecção tecnológica foi realizada no período de junho a setembro de 2019 e revisado no período de agosto a setembro de 2020, considerando os últimos 10 anos (2010 – 2020), avaliando os pedidos de patentes depositadas em bases de acesso livre, European Patent Office (EPO), também conhecida como Espacenet e o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), relacionadas a composição de detergentes contendo enzimas em sua composição.

Para coleta de informações nos bancos de dados foram utilizados os termos: enzimas (enzymes), detergentes (detergentes), amilase (amylase), celulase (celulase) e lipase (lipase), a fim de identificar o maior número de patentes com a temática em estudo. Além disso, utilizou-se alguns recursos de pesquisa, como o operador booleano (AND), o símbolo de truncatura (*) e a junção das palavras-chave, com o objetivo de auxiliar na obtenção de uma quantidade maior de documentos.

Os critérios utilizados para validar os documentos foram: que apresentassem as palavras-chave no título e/ou resumo e que tivessem relação direta com a aplicação de enzimas na formulação de detergentes. Das patentes encontradas foram realizadas leituras dos resumos e dos documentos, quando estes eram disponíveis. Alguns indicadores foram considerados para análise dos dados obtidos na busca: códigos de classificação, ano de depósito, país depositantes, perfil dos depositantes e enzimas aplicadas. Todos os dados coletados foram tabelados e colocados em formato de gráfico através do software Microsoft Office Excel® versão 2007.

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Associação das palavras-chave com os códigos CIP e CCP

A partir da estratégia apresentada anteriormente, sobre a busca de patentes no INPI e EPO, com a utilização de palavras-chave, suas associações e truncadores, foram obtidos os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Patentes encontradas nos bancos de dados INPI e EPO a partir da estratégia de busca.

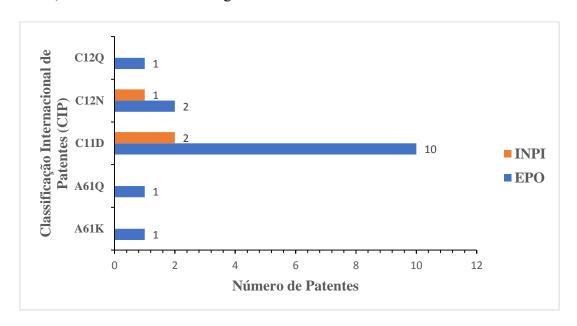
			Número de	Total de	Seleciona
	Palavras-chave	Códigos	patentes	Patentes	das
IN	Enzimas and				
PΙ	Detergentes		10		
	Amilase and	C11D			
Detergentes		C11D3/386	6	24	3
	Celulase and				
	Detergentes		4		
	Lipase and				
	Detergentes		4		
EP	Enzymes*and				_
O	Detergents*		23		
	Amylase* and	C11D			
	Detergents*	C11D3/386	15	52	15
	Cellulase* and				
	Detergents*		7		
	Lipase* and				
	Detergents*		7		

Na base de dados INPI, foram encontrados um total de 24 patentes, dentre estas foram selecionadas 3. Já na base de dados EPO foram encontradas 52 patentes e 15 destas foram selecionadas. As patentes selecionadas foram de maior relevância, uma vez que estas se enquadraram bem ao tema discutido no presente trabalho. Com isso, totalizam 18 documentos selecionados.

A classificação de patentes foi criada com o objetivo de organizá-las, pois assim, a busca por patentes se torna mais acessível. A CIP é adotada pelo INPI e EPO, enquanto que a CCP é adotada pela EPO, sua criadora. A CIP apresenta uma divisão composta por oito seções, sendo que cada uma apresenta classes e subclasses, as quais, classificam as patentes. Através de uma busca avançada nas bases destacadas, associando as palavraschave apresentadas na tabela 1, houve um enquadramento das mesmas com duas seções,

A (Necessidades Humanas), com 2 patentes e C (Química; Metalurgia), com 16 patentes (figura 1).

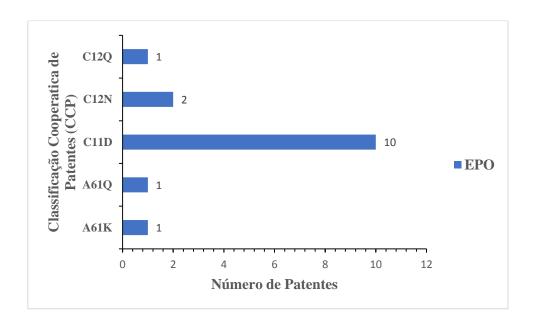
Figura 1. Distribuição do número de patentes por classe, referente a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CIP nas bases de dados INPI e EPO.



De acordo com os dados apresentados na Figura 1, das duas seções em que a pesquisa se enquadrou, destaca-se a sessão C por obter um maior número de patentes, tanto no INPI (3 patentes) quanto na EPO (13 patentes). A subclasse com maior número de patentes no INPI foi a C11D (Composições de detergentes; Uso de substâncias isoladas como detergentes; Sabão ou fabricação de sabão; Sabões de resina; Recuperação do glicerol), com 2 patentes, e uma patente para a C12N (Microrganismos ou enzimas; Suas composições preservação, ou manutenção de microrganismos ou tecido; Engenharia genética ou de mutações; Meios de cultura). Já na EPO, a subclasse que apresentou maior número de patentes foi a C11D, com 10 patentes, ficando em segundo lugar a C12N, com 2 patentes.

O banco de dados da EPO permite fazer a busca de patentes associando as palavraschave com o CCP, além da CIP. A Figura 2 apresenta os dados obtidos da busca utilizando a CCP na base de dados EPO. Ela demonstra que foram encontradas 15 patentes, as quais se enquadravam em duas seções, A e C. A subclasse com maior número de depósito foi a C11D, com 10 patentes.

Figura 2. Distribuição do número de patentes por classe, referente a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CCP na base de dados EPO.

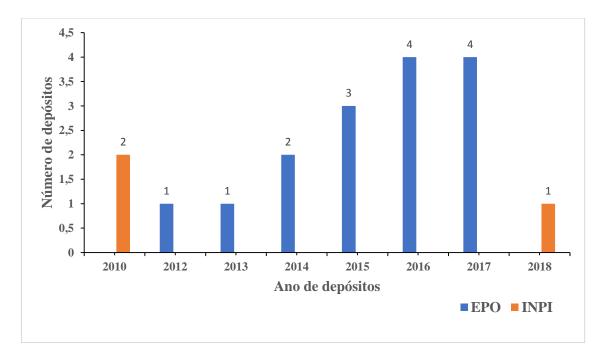


O mapeamento realizado na base de dados EPO, utilizando os códigos da CIP e CCP demonstram semelhança, visto que as patentes selecionadas foram sobre invenção de detergentes contendo enzimas para lavar louça e tecidos, para auxiliarem na remoção de sujeira.

1.3.2 Depósito de patentes por ano

A Figura 3 demonstra que nos anos de 2016 e 2017 foram depositadas o maior número de patentes. Nos últimos 10 anos o número de patentes depositadas no banco de dados do INPI foi menor, comparado ao banco de dados da EPO. A EPO é uma base internacional, por esse motivo abrange um maior número de países depositantes e isso pode justificar esse resultado.

Figura 3. Número de depósitos de patentes por países de origem relacionados a associação das palavras-chave, enzimas, detergentes, amilase, celulase e lipase, utilizando o operador "AND", o truncador "*" e os códigos da CIP e CCP.



No geral, as patentes encontradas no banco de dados do INPI não foram depositadas nos últimos 10 anos, sendo mais antigas, entre os anos de 1995 – 1998. Isso demonstra que o interesse por aplicação de enzimas em formulações de detergentes já existe por muito tempo. Além disse, que o Brasil ficou parado por muito tempo, apesar de ser uma tecnologia de grande interesse industrial. Esse interesse se dá devido as características que elas dão aos detergentes, pois os mesmo se tornam melhores na remoção de sujidades e os torna mais seguros ambientalmente.

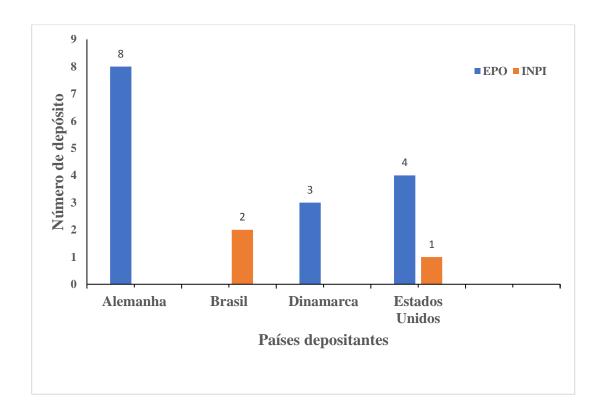
É importante destacar que o levantamento destes dados apresentam dificuldades devido à pouca disponibilidade de informações anexadas aos documentos, o que impede de fazer uma análise mais aprofundada das patentes depositadas.

1.3.3 Países depositantes de patentes

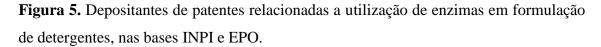
O mapeamento dos países que mais depositaram patentes relacionadas a utilização de enzimas em formulações de detergentes está apresentado na Figura 4.

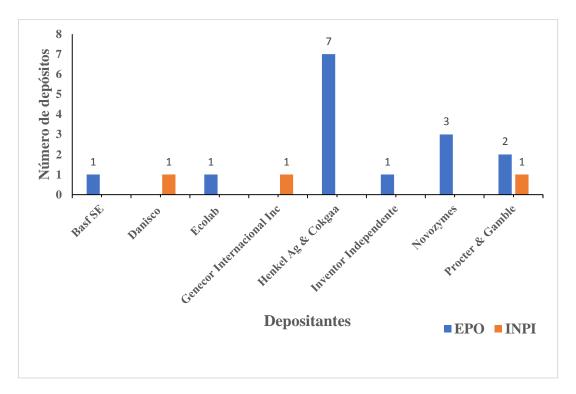
Os países depositantes de patentes no INPI foram, Brasil e Estados Unidos. A base INPI desta o Brasil por apresentar o maior número de patentes. Já a EPO, tem destaca a Alemanha, em seguida os Estados Unidos.

Figura 4. Países depositantes de patentes relacionadas a utilização de enzimas em formulação de detergentes, nas bases INPI e EPO.



A maioria das patentes foram depositadas por empresas como destaca a Figura 5. As empresas são dos mais variados setores industriais. A base de dados EPO destaca a empresa Hekel Ag & Cokgaa, com 7 patentes. Na base INPI, mostra a Procter & Gamble e Danisco com 1 patente cada. A Procter & Gamble é uma empresa responsável por marcas bastante conhecidas, como a Pantene, Always, Pampers, Ariel, Gillette, Oral-B, entre outras.



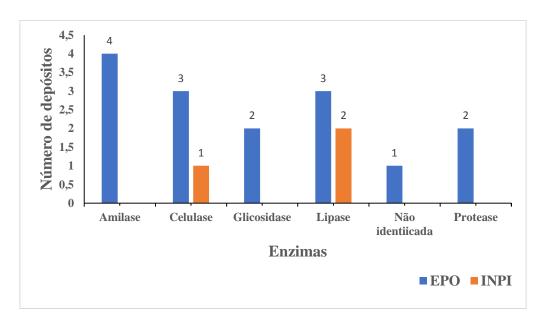


1.3.4 Mapeamento de enzimas aplicadas na formulação de detergentes

Uma das industrias que mais utilizam enzimas são as produtoras de detergentes, no geral, onde as enzimas mais utilizadas na formulação de detergentes são as amilases, celulases, lipases e proteases (DE SOUZA e MAGALHÃES, 2010). A Figura 6 demonstra que os resultados obtidos no banco de dados do INPI foram bem próximos aos da EPO.

A enzima que se destaca no INPI, para esta finalidade são as lipases (2) e na base EPO se destacam as amilases (4). Vale ressaltar que as enzimas estudadas no trabalho são as mesmas encontradas na literatura que mais são aplicadas em detergentes.

Figura 6. Enzimas utilizadas na formulação de detergentes, destacadas nas patentes depositadas nas bases INPI e EPO.



1.4 Considerações finais

Através da prospecção tecnológica, foi constatado que as enzimas mais aplicadas em detergentes são as amilases, celulases e lipases, além disso, possibilitou realizar um mapeamento sobre essa temática, permitindo a identificação dos países detentores das patentes e o público de interesse. Apresenta também a importância de fazer uma busca de dados em bases de patentes como o INPI e EPO, principalmente para alunos e professores que desenvolvem pesquisa, pois os dados coletados podem auxiliar na tomada de decisões, incentivando o desenvolvimento de trabalhos inovadores. Sendo assim, o presente trabalho traz uma contribuição para as pesquisas nessa área.

1.5 Referências

BUAINAIN, A. M.; SOUZA, R. F.; VIEIRA, A. C. P.; BUENO, C. S.; FERRARI, V. E.; SABINO, W.; *Propriedade intelectual, inovação e desenvolvimento: desafios para o Brasil*, 1a ed., **ABPI**: Rio de Janeiro, 110p, 2018.

DE OLIVEIRA, L. G.; SUSTER, R.; PINTO, A. C.; RIBEIRO, N. M.; DA SILVA, R. B. Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. *Química Nova* **2005**, *28*, 1678.

DE SOUZA, P. M. e MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α-amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850 - 861, 2010.

HEMLATA, B.; UZMA, Z.; TUKARAM, K.Substrate kinetics of tiol activated hyperthermostable alkaline lípase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in biodetergent formulation. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 104-111, 2016.

http://www.espacenet.com/. Acesso em: 16 de julho de 2019.

http://www.inpi.gov.br/. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

https://www.wipo.int/. Acesso em: 21 de junho de 2020.

KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555 - 569, 2012.

LIMA, J. A. C.; FREITAS, J. R.; SILVA, J. F.; FILHO, M. C.; FREITAS, J. C. R. *O Estado da Técnica do Eugenol:* Uma Prospecção Tecnológica Fundamentada em Base de Dados de Patentes e Periódicos. **Revista Virtual de Química**, 11, 699, 2019

MAYERHOFF, Z.D.V.L. Uma análise sobre estudos de prospecção tecnológica. **Cadernos de prospecção**, 1, 9, 2008.

MITTIDIERI, S., MARTINELLII, A.H.S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, 97:1217-1224, 2006.

MONTEIRO V.N.; SILVA; R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. Anápolis, v.3; n.5; p. 9-23, 2009.

PENHA, E, M; VIANA, L, A, N; GOTTSCHALK, L, M, F; TERZI, S, C; SOUZA, E, F; DE FREITAS, S, C; SANTOS, J, O; SALUM, T, F, C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por Aspergillus niger. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.46. n.4. p.755-761. 2016.

PRATA, E.R.B.A.; Oliveira, L.S. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. **Food Science and Technology**, *40*, 1555, 2007.

SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.

SINGH, R., KUMAR, M., MITTAL, A., MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016.

SPEZIALII, M. G.; SINISTERRA, R. D. Buscas de Informações Tecnológicas com Base em Dados de Patentes: Estudo de Caso dos Líquidos Iônicos no Brasil. **Química Nova**, *38*, 1132, 2015.

STRYER, L. Bioquímica. 7. Ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

CAPÍTULO 2

Aproveitamento de resíduo agroindustrial para produção de enzimas por Penicillium camemberti: Uma revisão de literatura

Resumo

Uma ampla quantidade e variedade de resíduos orgânicos são descartados na natureza pelo setor agroindustrial gerando impactos ambientais, principalmente os oriundos das indústrias de frutas. A busca por alternativas para agregar valor a esses compostos faz-se necessário e atualmente os processos biotecnológicos para a obtenção de enzimas destaca-se pela similaridade com a habitat natural do microrganismo. Esses resíduos devido sua composição lignocelulósica é uma excelente fonte para a produção de biomoléculas pelos fungos, e devido a essas peculiaridades vários estudos tem sido realizados na fermentação em estado sólido (FES) para agregar valor a esses subprodutos na geração de bioprodutos. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão narrativa sobre aplicação de resíduos da agroindústria na FES, a fim de avaliar a eficiência desse processo na produção de enzimas e demostrar que a utilização de resíduos de frutas para obtenção de produtos de alto valor agregado é uma opção considerada e menos poluente.

Palavras chaves: Resíduos de frutas, fermentação em estado sólido, biomoléculas.

2.1 Introdução

O material lignocelulósico é uma fonte renovável, que pode ser encontrado na natureza e através da agroindústria. O Brasil é considerado um grande gerador de resíduos agroindustriais, devido a sua economia estar diretamente ligada a agricultura. Com isso, estudos têm sido desenvolvidos dando uma especial atenção ao reaproveitamento desses subprodutos, visando minimizar os possíveis impactos ambientais que estes podem causar. (CASTRO e PEREIRA Jr., 2010; MENEZES e BARRETO., 2015).

Dentre os resíduos agroindustriais se destacam os provenientes das indústrias de frutas ou polpa de frutas. Parte do subproduto obtido após o processamento das frutas podem ser utilizados como suplementos alimentar em formas de farinha, por exemplo, já outra parte é descartada por não apresentar um valor comercial, como as cascas. Esses materiais geralmente apresentam açúcares, fibras, proteínas e minerais em sua composição, o que os torna fontes alternativas de carboidratos e nitrogênio, podendo substituir às fontes sintéticas desses nutrientes empregadas em bioprocessos (PANESAR et al., 2016).

Devido a composição desses resíduos, o crescimento de microrganismos pode ser viabilizado, pois os mesmos possuem uma capacidade de utilizar esses substratos, como açucares fermentáveis, e os converter em produtos de grande importância industrial, como por exemplo, as enzimas. É importante destacar que esses resíduos além de reduzir os impactos ambientais, podem também contribuir com a redução dos custos de produção de um bioproduto e manter seu rendimento proporcional ao uso de substratos sintéticos (PANDA et al., 2016; TAMANINI e HAULY, 2004).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo no qual pode ser aplicado os resíduos agroindustriais juntamente com os microrganismos, no sentindo de encontrar combinações ideias para obtenção de enzimas. Esse processo é definido como o crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas sólidas, sem o excesso de água, simulando o habitat natural de alguns microrganismos, como os fungos filamentosos (FARINAS et al., 2008).

A técnica é caracterizada por apresentar algumas vantagens, como maior produtividade de extrato enzimático e estabilidade das enzimas às variações de temperatura e pH. Porém, também requer, como qualquer processo biotecnológico, o controle de algumas variáveis como o pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio, tempo de incubação e tipo de fermentação. Portanto, é importante desenvolver um estudo dessas variáveis durante o processo fermentativo, a fim de obter condições ideais para obtenção da enzima (AL-DHABI et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi realizar uma revisão narrativa sobre aplicação de resíduos da agroindústria na FES, a fim de avaliar a eficiência desse processo na produção de enzimas, identificando os países mais produtores desse tipo de resíduo, quais as principais variáveis que interferem na obtenção desse produto, as principais classes de enzimas obtidas a partir desse processo, quais aplicações para essas enzimas, bem como identificar aspectos que ainda devem ser melhores explorados cientificamente.

2.2 Resíduos agroindustriais

A agroindústria está expandindo em escala mundial e junto a isso a biomassa residual e seus subprodutos, como os resíduos agroindustriais de baixo valor das indústrias de frutas, florestais, orgânicos, entre outros (MAITI et al., 2018). Parte desses resíduos são reaproveitados pela indústria alimentícia e química, pois possuem alto valor nutritivo como fontes de proteínas, carboidratos, fibras e compostos bioativos (SARAIVA et al., 2018).

No entanto, a grande produção das agroindustriais gera, diariamente, elevadas quantidades dessa biomassa, dos quais representam impactos ao meio ambiente e perda de matéria-prima potencialmente valiosas para aplicação biotecnológica (TONIAL, 2018). Portanto, durante as últimas décadas, o impacto ambiental das atividades agroindustriais, tornou-se uma preocupação constante dos ambientalistas, legisladores, e sociedade em geral (SILVEIRA et al., 2017).

A produção agrícola de frutas corrobora para a geração de resíduos e futuros danos ao meio ambiente, sendo que o Brasil se encontra no ranking dos maiores produtores mundiais de frutas, ocupando o terceiro lugar após China e Índia. Atrelado a isso, depois da etapa da colheita há um vasto desperdício dessas frutas e geração de resíduos (ACIFAAC, 2017; DA SILVA et al., 2020). Do total de lixo coletado diariamente no Brasil, 183.481,50 toneladas, 51,4 % é matéria orgânica, nesse percentual é incluso os resíduos agroindustriais inclusive de frutas (IPEA, 2012; DA SILVA et al., 2020).

O tratamento e o descarte seguro das quantidades cada vez maiores de subprodutos gerados na agroindústria de frutas, representam desafios econômicos e ambientais contínuos para as empresas. O setor agroindustrial está sujeito a regulamentações ambientais cada vez mais rígidas e à necessidade de introduzir sistemas eficazes de monitoramento e manejo (QDAIS e AL-WIDYAN, 2016).

No entanto, os resíduos oriundos das indústrias de processamento de alimentos e bebidas, cerca de 60 - 70% são descartados no meio ambiente sem qualquer tratamento prévio, sendo apenas aproveitado por meio de digestão anaeróbia (MAITI et al., 2018a).

Dos resíduos agroindustriais de frutas gerados no Brasil podemos destacar os da jaca, fruto da jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), uma planta nativa da Ásia que é encontrada por todo território brasileiro, mais comumente na região litorânea, do sul da Bahia até a Paraíba (DE SOUZA et al., 2020).

A jaqueira produz aproximadamente 100 frutos em um curto período, entre dezembro a abril) (DE SOUZA et al., 2020a). Existem duas variedades desses frutos, a jaca dura com os maiores frutos, tem bagos de consistência rígida e a jaca mole com frutos menores, bagos doces e com consistência mole, contém menos látex (existe em toda planta). A jaca é constituída basicamente de polpa, semente e casca, a polpa representa aproximadamente 30% e a casca compõe mais que 50% do fruto (PRETE et al., 2012). Dessa forma, acontece uma geração de um volume significativo de resíduos desse fruto, cerca de 70% da produção é descartada, ocasionando prejuízos econômicos e ambientais (DE SOUZA et al., 2020).

Segundo Maiti et al. (2018) a utilização de resíduos de frutas para obtenção de bioprodutos de alto valor agregado é a opção menos poluente em termos de emissões de gases de efeito estufa em comparação à incineração, compostagem e disposição em aterro.

Uma série de aplicações para a utilização de tais resíduos agroindustriais têm sido desenvolvidas para superar o problema de seu descarte. Para serem economicamente atrativas, essas aplicações devem ir além do uso tradicional como aditivo para ração animal (RAOL et al., 2015). E devido sua composição, apresentando celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas os caracterizam como ótima fonte para a produção de enzimas a partir de microrganismos (SOUZA, et al. 2010).

As enzimas de origem microbiana destacam-se na biotecnologia por ter um menor tempo de produção, facilidade de manipulações genéticas, aumento de escala e purificação, especificidade e estabilidade. Essas biomoléculas possuem ampla aplicação, por exemplo, para produção de biossurfactantes, medicamentos, reagentes clínicos, cosméticos, produção de biodiesel, tratamento de efluentes e na indústria de laticínios (WANDERLEY, et al. 2011).

2.3 Processo de fermentação para produção de enzimas

A produção de enzimas microbianas é conduzida por bioprocessos em meios sólidos e líquidos. Ambos são denominados fermentação em estado sólido e fermentação líquida ou submersa. O microrganismo empregado no processo de produção da enzima vai determinar a escolha da técnica.

A fermentação submersa é um processo caracterizado pela utilização de um meio fermentativo líquido, com a presença de nutrientes solúveis. O mesmo apresenta algumas vantagens como, o controle da agitação, pH, temperatura e a uniformidade dos nutrientes em contato com o microrganismo utilizado e apresenta como desvantagens o baixo rendimento, alto custo e geração de grandes quantidades de água residual (BASSO, 2017).

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo de cultivo de microrganismos em substratos sólidos insolúveis e com baixa quantidade de água ou ausência de água livre. O substrato atua como suporte para o crescimento dos microorganismos e fonte de nutrientes como carbono, nitrogênio, minerais, entre outros (GEOFFRY et al., 2018). Geralmente nesse bioprocesso são utilizados resíduos da agroindústria como matéria-prima, visto que são substratos abundantes, de baixo custo e fonte de nutrientes (SINGHANIA et al., 2009).

A FES é preferencial para o cultivo de fungos filamentosos, pois se assemelha as suas condições de cultivo natural, tendo maior adaptação ao processo para a produção de enzimas extracelulares. Isso é atribuído ao seu modo de crescimento através de hifas, boa tolerância ao baixo teor de umidade e condição de alta pressão osmótica, tornando-os adequados para a bioconversão de substratos sólidos e produção de enzimas (GEOFFRY et al., 2018).

As vantagens de usar a FES está relacionada ao baixo conteúdo de água necessário para conduzir o processo fermentativo e a possibilidade de utilizar fontes de nutrientes residuais, sendo assim economicamente mais viável, possibilitando a redução do custo de produção de enzimas. Além disso, a aeração é facilitada, existe uma baixa demanda por processos de esterilização, pode haver a utilização de culturas mistas, a concentração das enzimas produzidas é maior e a simplicidade geral do processo (ARORA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

No entanto, a FES também apresenta desvantagens, tais como a dificuldade do aumento de escala do processo fermentativo, alta heterogeneidade do sistema, alta impureza do produto e a dificuldade de controle das variáveis como o pH, temperatura, umidade e condições nutricionais (COUTO e SANROMÁN et al., 2006; SOUZA et al., 2018).

A síntese de enzimas microbiana pode ser influenciada por vários fatores durante o bioprocesso de produção, como o pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio, tempo de incubação e tipo de fermentação. Portanto, é importante o estudo dessas variáveis durante a fermentação, a fim de obter as melhores condições de obtenção da enzima (AL-DHABI et al., 2020).

2.4 Penicillium camemberti

O fungo filamentoso *Penicillium camemberti* é o organismo mais importante usado no processo de maturação de queijos em função das enzimas o micélio de *P. camemberti* é consumido pelas pessoas há séculos sem prejudicar a saúde humana. Dessa forma, é considerado um organismo seguro. Relatos na literatura evidenciam que o *P. camemberti* possui potencial como fonte de enzimas industriais, tais como lipases, celulases e amilases (GRAS) (ESPINOSA et al., 2011).

Boratyński et al. (2018) fizeram uma triagem inicial com 26 fungos filamentosos e o *Penicillium camemberti* AM83 foi selecionado como produtor de lipases e proteases,

em seguida o *P. camemberti* produziu eficientemente tanto lipases quanto proteases em fermentação em estado sólido com resíduo de colza.

Kumura et al. (2019) cultivaram *Penicillium camemberti* PC TT033 e *Penicillium roqueforti* PR G3 em sólidos de soro de leite e meio de queijo simulado, para produção de lipase e protease. A produção de lipase foi maior quando ambas as cepas foram cultivadas em meio de soro de leite do que em meio de queijo simulado, a produção de proteases foi menos influenciada pelo meio de cultura. O *P. camemberti* mostrou maior potencial para a produção de lipase em comparação com *P. roqueforti*.

Yamaguchi e Mase (1991) isolaram uma lipase do filtrado de cultura do fungo *Penicillium camemberti* U-150, a caracterização da enzima revelou sua especificidade de substrato única, pois hidrolisa mono e diacilglicerol, mas não o triacilglicerol.

Shruthi et al. (2020) isolaram 44 fungos de solo, sendo 30 desses isolados produtores de amilases e celulases. O fungo *Penicillium camemberti* foi uma das sete espécies selecionadas como melhores produtores de ambas as enzimas e posteriormente usados para a produção de enzimas extracelulares por fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substrato.

Won et al. (1992) purificaram três componentes individuais da celulase (FP-ase, CMC-ase e celobiase) da cepa recém-isolada de *Penicillium camemberti*. As enzimas isoladas possuíam as propriedades de celobiohidrolase, endo-1,4-β-D-glucanase e celobiase, suas respectivas massas molares foram 99, 87 e 61 kDa.

Segundo Gopinath et al. (2017), *Penicillium camemberti* é umas das eficientes espécies fúngicas produtoras de amilase, pertencente ao gênero *Penicillium*. Nouadri et al. (2010) purificaram e caracterizaram uma α -amilase de *Penicillium camemberti* PL21, inicialmente cultivado em resíduo de laranja para produção da enzima. A α -amilase apresentou atividade máxima a pH 6, valor de Km para o amido solúvel de 0,92 mg / ml e massa molecular de 60,5 Kda.

2.5 Enzimas

2.5.1 Amilase

Enzimas amilolíticas são capazes de hidrolisar as moléculas de amido em produtos como dextrinas e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. Elas podem ser divididas em duas categorias: endoamilases e exoamilases. As endoamilases são o grupo

e enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4, no interior da molécula de amido (amilose) e as exoamilases hidrolisam sucessivamente as ligações 16 glicosídicas a partir da extremidade redutora das mesmas. As α -amilases (endoamilases) (E.C.3.2.1.1, α 1,4-D-glicano-glicanoidrolase), hidrolisam o amido produzindo glicose e maltose. As β -amilases (exoenzimas) (E.C.3.2.1.2, α -1,4-D-glicano-maltoidrolase) hidrolisam a parte não redutora da amilose produzindo sucessivas unidades de maltose. As amilases são aplicadas na panificação com a função de melhorar a coloração, volume e textura do miolo do pão, além de retardar o processo de envelhecimento. Na indústria cervejeira as amilases produzidas por fungos são empregadas para converter o amido em açúcar antes da fermentação alcoólica (ROCHA, 2010; STROPARO et al. 2012; FRANTZ et al., 2018).

As enzimas tem despertado um grande interesse nas indústrias, pois suas propriedades fazem com que apresentem capacidade para substituírem os métodos químicos de hidrólise. As amilases hidrolisam o amido e algumas atividades podem ser realizadas a partir dessa propriedade. Podem ser utilizadas para hidrolisar o amido em dextrinas formando uma suspensão de amido menos viscosa, converter o amido na massa em açúcares fermentáveis menores, entre outros. As amilases são enzimas amplamente seguras e oferecem um caminho alternativo para a lavagem de roupas e louças com condições amenas (SUNDARRAM, et al. 2014). Geralmente são produzidas por bactérias e fungos, entre os fungos mais produtores destas enzimas se destacam os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (DE SOUZA, et al. 2010).

2.5.2 Celulase

As celulases atuam na degradação da celulose que é um polímero de cadeia linear formada por unidades de glicose ligadas entre si por ligações β -1,4, estabilizadas por ligações de hidrogênio. Este grupo de enzimas é dividido em três classes que atuam na hidrólise da celulose: as endoglucanases (1,4- β -D-glicanglicanohidrolase), que iniciam a 17 hidrólise da molécula de celulose, exoglucanases (exo 1,4- β -D-glicancelobiohidrolase), atuam nas extremidades da molécula liberando celobiose e β -Dglicosidases ou celobiases, que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose. As celulases apresentam grande importância no setor econômico, devido a sua grande importância na

indústria, sendo geralmente aplicadas na clarificação de suco de frutas e também na fabricação de detergentes (ROCHA, 2010; AGUIAR e LUCENA, 2011).

As celulases são aplicadas também na indústria de papel e na indústria têxtil. Na indústria têxtil é usada na lavagem do jeans para obter um aspecto envelhecido e também é utilizado em tecidos novos como Lyocell, caracterizado por uma fibra de celulose regenerada com alta resistência e maciez (MONTEIRO et al.,2009).

2.5.3 Lipase

Lipases (triacilglicerol acil hidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilglicerol, na interface óleo-água, liberando ácidos graxos livres, mono ou diacilglicerol. Em meios com baixa atividade de água são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (BUENO et al., 2015).

É possível diferenciar as lipases das estereases em relação a cadeia dos substratos. As lipases são capazes de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa, com mais de dez átomos de carbono, enquanto as esteresaes só hidrolisam triacilgliceróis com menos de dez átomos de carbono, as lipases ainda conseguem hidrolisar os substratos das esterases (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Em termos de classificação, lipases podem ser quimiosseletivas, atuando em um único tipo de grupo funcional no substrato, enantiosseletivas, com capacidade de reconhecer preferencialmente um enantiômero em relação ao outro e regiosseletivas, apresentando uma especificidade posicional entre grupos funcionais quimicamente idênticos localizados em diferentes posições na mesma molécula de substrato (FABER, 2000).

As lipases apresentam como estrutura terciária comum uma dobra padrão do tipo α/β hidrolase. Esse modelo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas, rodeado por porções α -hélice (JAEGER et al., 1999)

O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica dos aminoácidos de serina, histidina, aspartato ou glutamato. Geralmente essas enzimas possuem uma estrutura hidrofóbica denominada "tampa" que protege o sítio ativo. Quando essa estrutura estiver cobrindo o sítio ativo a enzima encontra-se na conformação fechada. Na presença do substrato hidrofóbico ocorre o fenômeno denominado mudança conformacional e a enzima muda para a conformação aberta, expondo o sítio ativo permitindo que a catálise ocorra (PASCOAL et al., 2018).

As características bioquímicas, funcionais e estruturais das lipases possibilita a aplicação dessas enzimas em diversos setores industriais e biotecnológicos. As lipases podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos, apresentado diferentes propriedades catalíticas de acordo sua fonte. Entre elas as lipases microbianas têm se destacado e despertado a atenção na biotecnologia e na indústria devido suas características desejáveis, capacidade funcional em condições extremas, estabilidade em solvente orgânico, seletividade e ampla especificidade pelo substrato (BHARATHI et al., 2019).

2.6 Aplicação biotecnológica e industrial de enzimas

A utilização de enzimas em processos tecnológicos tem se destacado e despertado interesse em diversas áreas da ciência, como alternativa aos catalizadores químicos devido à sua alta seletividade (SILVA et al., 2017). Em meio as diversas biomoléculas, as enzimas se sobressaem como um dos principais componentes em diferentes processos industriais e biotecnológicos (FERREIRA et al., 2020), entre elas podemos destacar as amilases, celulase e lipases.

A amilase representa aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas. É amplamente aplicada nas indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos, detergentes, papel e têxteis. Na indústria de alimentos é utilizada na produção de xaropes de milho, xaropes de maltose, xaropes de glicose e sucos. Ainda desempenham um papel importante na fabricação de cerveja e licor a partir de açúcares (com base no amido) (GOPINATH et al., 2017).

As celulases estão entre as enzimas mais comercializadas, possuem um grande potencial biotecnológico e industrial, além de grande importância econômica, podendo ser aplicadas em uma ampla variedade de atividades industriais, como nas indústrias alimentícias, ração animal, têxtil, detergente, cervejarias, papel, gestão de resíduos e indústria médico-farmacêutica (SILVA et al., 2020). Seu potencial industrial ainda é explorado na produção de açúcares fermentáveis para a produção de biocombustíveis (SILVA et al., 2018).

Lipases são enzimas versáteis e suas características bioquímicas e estruturais permitem uma aplicação em diversos setores, tais como na indústria de alimentos, detergentes, cosméticos, na síntese de fármacos, em processos de tratamento biológico de

efluentes, na facilitação da biodegradação de polímeros e na produção de biodiesel (FERREIRA et al., 2017).

As indústrias de detergentes são as principais consumidoras de enzimas, tanto em termos de volume quanto de valor. O uso de enzimas em formulações de detergentes aumenta a capacidade de remover manchas difíceis e torna-os ambientalmente amigável (DE SOUZA e MAGALHÃES, 2010).

Na indústria de detergentes a enzima amilase é usada para digerir o amido, presente em partículas de alimentos, em oligossacarídeos menores solúveis em água. O amido pode atrair partículas de sujeira para as roupas. Sendo assim, a remoção do amido também é importante para manter a brancura das roupas. A estabilidade da amilase em baixa temperatura e pH alcalino contribui para seu amplo uso em detergentes (SUNDARRAM e MURTHY, 2014).

As celulases são enzimas capazes de modificar a fibra de celulose, por isso são comumente usadas em detergentes para a limpeza de tecidos. Esses detergentes, contendo celulases, melhoram o brilho da cor e o toque do tecido, removendo as partículas de sujeira emaranhadas nas roupas. Os tecidos, principalmente à base de algodão, após lavagens repetidas, tornam-se fofos e opacos devido ao desprendimento parcial das microfibrilas. As celulases atuam removendo as microfibrilas presentes na superfície do tecido aumentando a lisura da superfície, restaurando a cor original e maciez da roupa (SHARMA et al., 2016).

Lipase é uma das classes de enzimas que se destaca na indústria de detergentes. O emprego de lipases nesse setor é responsável pela venda de cerca de 1.000 toneladas de lipases por ano. Essas enzimas são capazes de substituir os agentes químicos, diminuindo os resíduos tóxicos liberados após o processamento. Devido à habilidade em hidrolisar gorduras, as lipases são utilizadas para facilitar o rompimento de ligações presentes nos triacilgliceróis e, consequentemente solubilizar gorduras aderidas ao tecido e louça (FERREIRA et al., 2020).

2.7. Considerações finais

O Brasil se encontra no ranking dos maiores produtores de frutas, ocupando o terceiro lugar, visto que ocorre desperdício de frutas, consequentemente é considerado um grande produtor deste tipo de resíduo. De forma geral, os trabalhos destacados neste trabalho deixam claro que a utilização de resíduos de frutas para obtenção de bioprodutos

de alto valor agregado é uma opção considerada menos poluente. Foi evidenciado que a composição destes resíduos permite que os mesmos sejam utilizados como fonte de produção de enzimas a partir de microrganismos. Um processo que estes podem ser aplicados é o de fermentação em estado sólido, o qual se mostrou eficaz para obtenção de enzimas, permitindo a redução dos custos de sua produção, diante dos trabalhos citados. Apesar da utilização de resíduos agroindustriais na fermentação em estado sólido para produção de enzimas ainda ser um estudo em desenvolvimento e que ainda precisa ser mais aprofundado, o mesmo apresenta grande potencial de aplicação em grande escala, além de contribuir com a redução desse tipo de resíduo no meio ambiente e agregar valor a estes, que antes eram desvalorizados.

2.8. Referências

AGUIAR M. C., LUCENA L.C. Produção de celulases por Aspergillus niger e cinética da desativação celulásica. **Acta Scientiarum. Technology Maringá**, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

ACIFAAC. **Associação de Comunicação e Imprensa da FAAC**. Disponível em:https://acifaacunesp.com/2017/09/17/brasil-e-o-terceiro-maior-produtor-de-frutas-do-mundo/>. Acessado em 14 maio 2018.

AL-DHABI, N. A. et al. Isolation and screening of Streptomyces sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 474-479, 2020.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16-34, 2018.

BASSO, Adriano Martinez. Estudo da composição química da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) desidratada, in natura e liofilizada. Dissertação mestrado — **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101368, 2019.

BORATYŃSKI, F.; SZCZEPAŃSKA, E.; GRUDNIEWSKA, A.; GNIŁKA, R.; OLEJNICZAK, T. Improving of hydrolases biosythesis by solid-state fermentation of *Penicillium camemberti* on rapeseed cake. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1 - 9, 2018.

- BUENO, P. R. M. et al. Application of lipase from *Burkholderia cepacia* in the degradation of agro-industrial effluent. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 7, p. 957-964, 2015.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.
- DA SILVA, L. P. F. R.; COSTA, Z. R. T.; VIEIRA, A. F.; DE MATOS, J. D. A. P.; DO, S.; SILVA, N. Modelagem matemática da cinética de secagem da casca de jaca (*Artocarpus heterophyllus*). **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia**, 2018, Maceió.
- DE SOUSA, A. P. M. et al. Enriquecimento proteico dos resíduos da jaca por fermentação semissólida/Protein enrichment of jackfruit residues by semi-solid fermentation. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 987 997, 2020a.
- DE SOUSA, A. P. M.; CAMPOS, A. R. N.; DE MACEDO, A. D. B.; DANTAS, D. L.; DE OLIVEIRA APOLINÁRIO, M.; DE SANTANA, R. A. C. Avaliação da qualidade de farináceos de casca de jaca. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1786 1796, 2020.
- DE SOUZA, P. M. e MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α-amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850 861, 2010.
- ESPINOSA, Y. et al. Production of a heterologous recombinant protein using fragments of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from *Penicillium camemberti*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 3019 3023, 2011.
- FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000. FERNANDEZ, A.; SAFFE, A.; MAZZA, G.; RODRIGUEZ, R. FERNANDEZ, Anabel et al. Kinetic analysis of regional agro-industrial waste combustion. **Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 71 80, 2017.
- FERREIRA, A. N. et al. Investigação da obtenção, purificação e aplicação de lipases microbianas. In: DE OLIVEIRA, G. A. L. **Pesquisa e sociedade: os desafios e as contribuições da ciência**.1. ed. Campo Grande: Inovar, 2020. p. 83 93. Disponível em: https://editorainovar.com.br/_files/200000667-760867608b/Livro%20-%20PESQUISA%20E%20SOCIEDADE%20OS%20DESAFIOS%20E%20AS%20CONTRIBUI%C3%87%C3%95ES%20DA%20CI%C3%8ANCIA.pdf. Acesso em 27 nov. 2020.
- FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. D. S.; SANTANA, R. A.; SANTOS, A. C. F.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. D. O.; DE FREITAS, J. S.; VALASQUES JUNIOR, G. L.; FRANCO, M.; NASCIMENTO JUNIOR, B. B. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and Nopalea cochenillifera, **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n.10, p. 1167 1173, 2017.
- FRANTZ, Suélen Caroline. Otimização da produção de amilases de Coprinus comatus em cultivo submerso utilizando subprodutos de moagem do trigo: obtenção dos

- parâmetros cinéticos do bioprocesso. Dissertação **Universidade Federal do Paraná**, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.
- GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018.
- GOPINATH, S. C.; ANBU, P.; ARSHAD, M. M.; LAKSHMIPRIYA, T.; VOON, C. H.; HASHIM, U.; CHINNI, S. V. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- IPEA (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada). **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**: diagnósticos dos resíduos urbanos, agrosilvopastoris e a questão dos catadores. Comunicados do Ipea, nº 145 25 de abril de 2012. Disponível em:http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=13917> Acessado em: 28 mar. 2018.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p.315-351, 1999.JAEGER et al., 1999.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M.N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555 569, 2012.
- KUMURA, H.; SATOH, M.; MACHIYA, T.; HOSONO, M.; HAYAKAWA, T.; WAKAMATSU, J. I. Lipase and protease production of dairy *Penicillium* sp. on milk-protein-based solid substrates. **International Journal of Dairy Technology**, v. 72, n. 3, p. 403 408, 2019.
- MAITI, S. et al. Hydrolytic pre-treatment methods for enhanced biobutanol production from agro-industrial wastes. **Bioresource technology**, v. 249, p. 673 683, 2018a.
- MAITI, S., GALLASTEGUI, G., SURESH, G., PACHAPUR, V. L., BRAR, S. K., LE BIHAN, Y. GALVEZ-CLOUTIER, R. Microwave-assisted one-pot conversion of agroindustrial wastes into levulinic acid: An alternate approach. **Bioresource technology**, v. 265, p. 471 479, 2018.
- MAITI, S.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LE BIHAN, Y.; DROGUI, P.; BUELNA, G., VERMA, M. Agro-industrial wastes as feedstock for sustainable bio-production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 98, p. 217-226, 2016.
- MONTEIRO V.N.; SILVA; R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**. Anápolis, v.3; n.5; p. 9-23, 2009.
- NOUADRI, T.; MERAIHI, Z.; SHAHRAZED, D. D.; LEILA, B. Purification and characterization of the-amylase isolated from *Penicillium camemberti* PL21. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 6, p. 155-162, 2010.

- PASCOAL, A.; ESTEVINHO, L. M.; MARTINS, I. M.; CHOUPINA, A. B. Novel sources and functions of microbial lipases and their role in the infection mechanisms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 104, p. 119-126, 2018.
- PRETTE, A. P. Aproveitamento de polpa e resíduos de jaca (*Artocarpus heterophyllus Lam*) através de secagem convectiva. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2012.
- PROCENTESE, A.; RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; REHMANN, L.; MARZOCCHELLA, A. Deep eutectic solvents pretreatment of agro-industrial food waste. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, n. 1, p. 37, 2018.
- QDAIS, H. A.; AL-WIDYAN, M. Evaluating composting and co-composting kinetics of various agro-industrial wastes. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 273 280, 2016.
- RAOL, G. G.; RAOL, B. V.; PRAJAPATI, V. S.; BHAVSAR, N. H. Utilization of agroindustrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 411 421, 2015.
- ROCHA P. C. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. Dissertação (mestrado) **Universidade Federal de Uberlândia** Pós-Graduação em Engenharia Química, 2010.
- SHARMA, A.; TEWARI, R.; RANA, S. S.; SONI, R.; SONI, S. K. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1346-1380, 2016.
- SHRUTHI, B. R.; ACHUR, R. N. H.; NAYAKA BORAMUTHI, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. **Current Microbiology**, p. 1 15, 2020.
- SILVA, T. P. ALBUQUERQUE, F. S. SANTOS, C. W. V. FRANCO, M. CAETANO, L. C. PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 263 269, 2018.
- SILVA, T. P. et al. Obtenção de celulases microbianas: uma breve revisão. In: DA SILVA NETO, B. R. **Pesquisa Científica e Tecnológica em Microbiologia 3**. Ponta Grossa: Atena, 2020. P. 100 -110. Disponível em: https://www.finersistemas.com/atenaeditora/index.php/admin/api/ebookPDF/3281 Acesso em: 27 nov. 2020.
- SILVA, T. P.; SOUZA L. O.; REIS N. S.; ASSIS, S. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, p. 745 756, 2017.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOUZA, C. E. C. 2018. Síntese de ésteres de importância na indústria de alimentos utilizando o preparado enzimático sólido de yarrowia lipolytica em farelo de soja. (Glycine max (L.) Merrill). 169f. (Tese Doutorado) Ciência de Alimentos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2018.

STROPARO C. E., BEITEL M. S., RESENTE V. T., KNOB A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, nov./dez. 2012.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166 - 175, 2014.

WON, J. C.; ZENGH, M. M.; MEK, S. K. Purification of the cellulase complex produced by *Penicillium camemberti* and its partial characterization. **Folia microbiologica**, v. 37, n. 3, p. 199-204, 1992.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of mono-and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 720 - 725, 1991.

CAPÍTULO 3

Produção, caracterização e aplicação do extrato enzimático produzido após a fermentação em estado sólido pelo fungo *Penicillium camemberti* (ATCC 4845) utilizando o resíduo de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Resumo

A utilização de enzimas obtidas por microrganismos tem despertado interesse na indústria de detergentes. Os fungos tem sido utilizados como fonte de obtenção de enzimas com aplicação industrial. A presença de enzimas em formulações de detergentes apresentam grande capacidade de remoção de manchas difíceis. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a aplicação das enzimas amilase, celulase e lipase no processo de remoção de manchas de molho de tomate, gema de ovo e óleo de soja em tecidos de algodão. As enzimas foram produzidas pelo fungo filamentoso Penicillium camemberti ATCC 4845 durante a fermentação em estado sólido utilizando a casca de jaca (Artocarpus heterophyllus Lam.) como substrato. A produção foi otimizada com o auxílio da matriz Box Benhnken com três níveis, as variáveis otimizadas foram: concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação. A caracterização das enzimas foi realizada e as melhores condições obtidas para a determinação da atividade enzimática foram pH 7,0 e temperatura de 50 °C. Os íons que ativaram a atividade das enzimas foram Na⁺, Ca²⁺, Mg^{2+} e Fe³⁺. Os valores obtidos para as constantes cinéticas foram amilase (K_m 3,6 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 0,27 mmol.min⁻¹), celulase (K_m 8,42 mM e $V_{m\acute{a}x}$ 0,12 mmol.min⁻¹) e lipase (K_m 0,14 mM e $V_{máx}$ 6,78 mmol.min⁻¹) e a adição das enzimas nas soluções de detergentes comerciais (D1, D2 e D3) favoreceu a remoção das manchas, destacando assim, o potencial destas enzimas em formulações de detergentes.

Palavras-chave: Amilase, celulase, lipase, remoção de manchas.

3.1. Introdução

As enzimas microbianas podem ser obtidas através do processo de fermentação em estado sólido (FES). A FES é o processo no qual imita o habitat natural de alguns microrganismos, como por exemplo, os fungos filamentosos. Esta apresenta como vantagens a possibilidade de reaproveitamento de resíduo, o baixo consumo de água, baixa demanda de energia para esterilização, menor geração de resíduos e permite uma maior produtividade de enzimas (SOCCOL et al., 2017).

Os fungos são importante fonte para obtenção de enzimas com aplicação industrial. Entre os microrganismos produtores de enzimas, destacam os membros do

gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*. É de fundamental importância conhecer as principais características das enzimas, principalmente no que diz respeito a sua atuação, comportamento. Diante da variedade de aplicações que as enzimas possuem, estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de encontrar novas combinações para obtenção destas que apresentem características vantajosas para aplicação industrial. Esse estudo têm sido desenvolvido por meio de ferramentas estatísticas, que possibilitam a otimização de fatores que afetam a produção e a estabilidade das enzimas. Isso se dá através do emprego de metodologia de superfície de respostas (MSR), que apresenta alta eficiência de modelagem e capacidade de exploração dos sistemas estudados (BEZERRA, 2008).

As indústrias de detergentes são consideradas as principais consumidoras de enzimas, pois o uso delas em formulações de detergentes aumenta a capacidade de remover manchas difíceis (DE SOUZA e MAGALHÃES, 2010). As amilases apresentam a capacidade de digerir o amido, o qual tem capacidade de atrair partículas de sujeira para as roupas. A remoção do amido permite manter a brancura dos tecidos (SUNDARRAM e MURTHY, 2014). As celulase modificam a fibra de celulose, melhoram o brilho da cor do tecido e remove as partículas de sujeira emaranhadas nas roupas (SHARMA et al., 2016). As lipases são capazes de hidrolisar gorduras e em formulações de detergentes elas atuam solubilizando gorduras aderidas ao tecido e a louça (FERREIRA et al., 2020).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi produzir e caracterizar as enzimas amilase, celulase e lipase produzidas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 utilizando a casca de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) como substrato no processo de fermentação em estado sólido e testar a compatibilidade dessas enzimas em marcas de detergentes comerciais.

3.2 Materiais e métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório Farmacotécnica, da Universidade Estadual da Bahia (UESB), localizada na cidade de Jequié – Bahia.

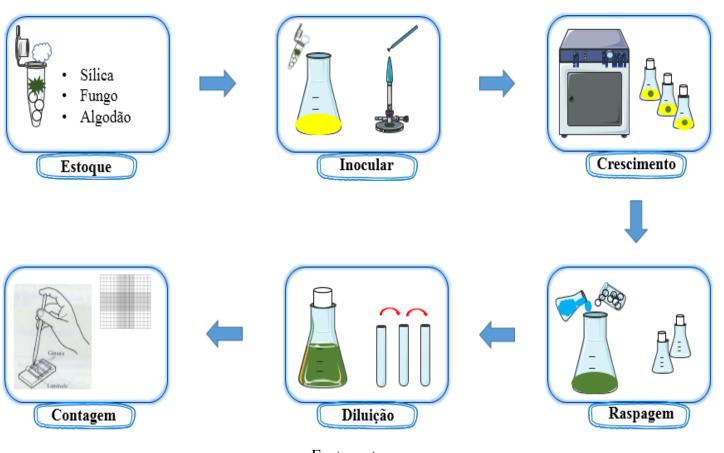
3.2.1 Microrganismo e preparo do inoculo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo filamentoso *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845), cedido pela Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, *Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ*, Rio de Janeiro, Brasil), armazenado em sílica a 5 ± 1°C. O fungo foi cultivado em placas de

Petri, contendo meio de cultivo PDA (Potato dextrose Agar) (Sigma Aldric) a 30 °C, por sete dias.

Em erlenmeyers de 250 mL com 30 mL de meio PDA estéril, foi inoculado o microrganismo e mantido em estufa (TE-317, Tecnal) a 30 °C, por sete dias. Após esse período a coleta dos esporos foi realizada através adição de 20 mL de uma solução aquosa de 0,01% (v/v) de Tween 80 (Vetec) e esferas de vidro estéreis aos frascos foram utilizadas para obtenção de uma solução de esporos concentrada. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e observada em microscópio binocular (Bioval L1000). A concentração de esporos utilizada como inoculo foi de 10⁷ esporos/grama de meio sólido (Figura 1).

Figura 1. Esquema ilustrado do inoculo do *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845), crescimento e procedimentos utilizados para obtenção da solução de esporos.



3.2.2 Obtenção e preparação do resíduo

As jacas (*Artocarpus hererophyllus* Lam.) foram cedidas pelos produtores de um sítio, localizado no cajueiro na cidade de Jequié – Bahia. As bagas da fruta foram retiradas para consumo e o substrato (resíduo/cascas) foi higienizado em água, seco em estufa de secagem (Solab), a 50°C, por 48 horas. A matéria seca (MS) obtida após a secagem do resíduo foi estabelecida a 95,75%. O resíduo foi triturado em moinho de facas tipo Wiley, com granulometria de 2 mm (Figura 2). A análise físico-química do resíduo foi realizada no Laboratório de Forragicultura da UESB, avaliando valores de material mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas (CZ), celulose (CL), hemicelulose (HC), lignina (LG), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), seguindo a metodologia descrita por VAN SOEST et al. (1991) e SILVA (2002).

Figura 2. Fruto coletado, em estufa de secagem com circulação de ar e triturado.



Fonte: autora.

3.2.3 Obtenção do extrato sem fermentar

Foram adicionadas 25 mL de água destilada em erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substrato, o mesmo foi adicionado a um shaker (Solab, SL 222), a 30°C, 150 xg, por 30 minutos. Em seguida a mistura foi prensada manualmente para a obtenção do extrato, que posteriormente foi centrifugado (CT-6000R; Cientec) a 6000 xg, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade enzimática.

3.2.4 Determinação das condições ótimas para produção das enzimas

Com o intuito de otimizar a produção das enzimas amilase, celulase e lipase, através da fermentação em estado sólido utilizando a casca da jaca como substrato e o fungo *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845), foi utilizado o planejamento experimental Box-Behnken, 3 níveis. As variáveis independentes analisadas foram concentração de

esporos (10^x/grama de substrato), temperatura (°C) e tempo de fermentação (dias), sob 13 ensaios. O experimento foi realizado em triplicata no ponto central, totalizando 15 ensaios. Posteriormente foi aplicada desejabilidade global a fim de obter condições ótimas em comum para as enzimas em estudo. Na análise dos resultados, os mesmos foram submetidos a metodologia de superfície de resposta (MSR). O software utilizado para análise dos dados foi o STATISTICA 7 (Tabela 1).

Tabela 1. Matriz do planejamento Box-Behnken para avaliação das condições ótimas na produção das enzimas estudas quanto à concentração de esporos, temperatura e tempo de fermentação.

Ensaio	Concentração do	Tomporoturo	Tompo
Elisaio	Concentração de	Temperatura	Tempo
	esporos	(°C)	(dias)
1	1 E+07	35	5
2	1E+09	35	10
3	1 E+05	35	10
4	1 E+07	35	15
5	1E+09	30	5
6	1 E+05	30	5
7	1 E+07	30	10
7	1 E+07	30	10
7	1 E+07	30	10
8	1E+09	30	15
9	1 E+05	30	15
10	1 E+07	25	5
11	1E+09	25	10
12	1 E+05	25	10
13	1 E+07	25	15

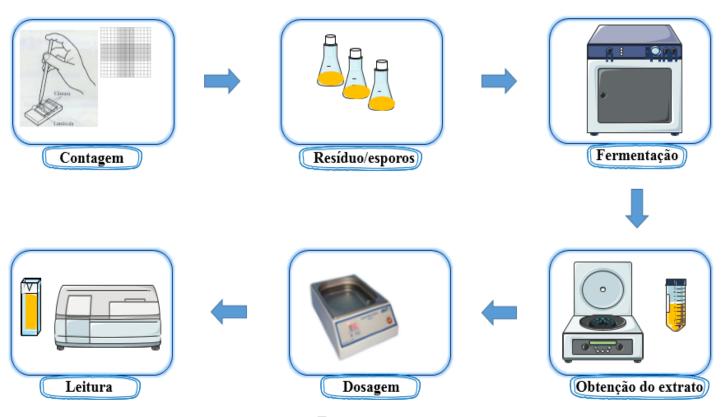
3.2.5 Processo de fermentação e obtenção do extrato enzimático bruto

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL como biorreatores, com 5 g do substrato. Os mesmos foram autoclavados a 1,0 atm por 15 minutos. Após o resfriamento, inoculouse a suspensão de esporos na concentração específica para cada ensaio de acordo com planejamento experimental (Tabela 1), variando a concentração de esporos (10⁵ a 10⁹). As fermentações foram conduzidas em estufa (TE-317, Tecnal), variando temperatura (25 a 35 °C) e tempo (5 a 15 dias).

Ao final da fermentação foram adicionadas 5mL de água destilada por grama de resíduo fermentado. Agitando em incubadora tipo shaker (Solab, SL 222), a 30°C, 150

xg, por 30 minutos. Posteriormente, a biomassa fermentada foi prensado manualmente para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado (CT-6000R; Cientec) a 6000 xg, por 10 minutos, para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática (Figura 3).

Figura 3. Esquema ilustrando a fermentação em estado sólido, obtenção do extrato enzimático bruto e a dosagem enzimática.



Fonte: autora.

3.2.6. Determinação da atividade enzimática

A atividade das enzimas amilase e celulase foram determinadas através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise de cada substrato, diluído previamente em solução tampão acetato de sódio (100 mM) (Sigma-Aldrich), pH 5,0 utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich), conforme descrito por MILLER, 1959.

O substrato utilizado para determinação da atividade da enzima amilase foi o amido solúvel a 1% (p/v) (Sigma-Aldrich). A avaliação foi conduzida em tubos de ensaio

com 100 μL de extrato enzimático e 100 μL de solução de amido solúvel 1% (p/v). O ensaio branco continha 100 μL de água e 100 μL de solução de amido solúvel. Foi necessário fazer ensaio de controle devido a coloração do extrato enzimático, contendo 100 μL de extrato enzimático e 100 μL de água destilada. Todas as amostras foram incubadas em banho-maria (Cientec CT-266), a 50°C, durante 10 minutos. Para interromper a reação foi adicionado 200 μL da solução de DNS (ácido-3,5 dinitrosalicílico), seguida pela submersão dos tubos em banho-maria (Solab) a 100°C, por 5 minutos e posterior adição de 2,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (BEL Photonics SP 2000 UV), conforme metodologia adaptada de (CORREA et al, 2009). A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol/min/mL de produto.

Os mesmos procedimentos citados acima foram utilizados para a enzima celulase mudando apenas o substrato. A atividade da enzima celulase foi determinada através da dosagem dos açúcares redutores produzidos na hidrólise do carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich) a 1% (p/v), metodologia adaptada de GHOSE, 1987.

Para determinação da atividade da enzima lipase preparou-se duas soluções chamadas A e B. A solução A continha em sua composição 60 mg de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) (Sigma-Aldrich), e 20 mL de álcool isopropílico (Synth). Já a solução B apresenta em sua composição 4 g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 0,4 g de goma arábica (Synth) e 200 mL de tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 7 (Sigma-Aldrich). Em tubos de ensaio foram adicionados 100 μL da solução A, 1,8 mL da solução B e 100 μL do extrato enzimático. O branco continha 100 μL da solução A, 1,8 mL da solução B e 100 μL de água destilada. Os tubos foram incubados a 50 °C por 10 minutos, em seguida foram adicionados 100 μL de solução de carbonato de sódio 1 M (Sigma-Aldrich), posteriormente foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 410 nm, de acordo com (FERREIRA et al, 2017) com adaptações. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar1 μmol/min/mL de produto.

3.2.7 Fracionamento das enzimas em sulfato de amônio

O extrato enzimático bruto foi submetido a uma saturação de 70% por adição de sulfato de amónio sólido (Sigma-Aldrich), adicionado lentamente com agitação branda, a mistura foi submetida por 24 horas, a 4°C, posteriormente centrifugada a 5000 xg durante 10 min. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato citrato (pH 7,0) (Vetec) na proporção de 1: 3 (p/v) e armazenado a baixa temperatura.

3.2.8. Caracterização enzimática

3.2.8.1 Determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845)

Foi aplicado um deleneamento Doehlert de dois fatores, apresentando 9 experimentos (Tabela 2), sendo o ponto central realizado em triplicata, para determinar o pH e a temperatura ideal. Os resultados foram submetidos a metodologia de superfície de resposta (MSR). O software utilizado para análise dos dados foi o STATISTICA 7.

Tabela 2. Planejamento Doehlert para determinação do pH e temperatura ótimos das enzimas, amilase, celulase e lipase.

Ensaio	pН	Temperatura (°C)
1	4	70
2	6	70
3	3	50
4	5	50
4	5	50
4	5	50
5	7	50
6	4	30
7	6	30

As temperaturas foram controladas usando banho maria (Solab). Em seguida, a atividade das enzimas foi determinada conforme o item 3.2.6.

3.2.8.2 Efeito de íons sobre a atividade das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845)

Foram utilizadas as seguintes sais: NaCl, CaCl₂, KCl, MgCl₂, FeCl₃ e ZnCl₂. As concentrações testadas para cada substância foram 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 a 0,25 mol L⁻¹. A atividade das enzimas foi determinada conforme o item 3.2.6.

3.2.8.3 Determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845)

A constante de Michaeli-Menten (K_m) e o V_{max} , que é o valor máximo da velocidade inicial quando todos os sítios ativos estão ocupados, foram estudados através da análise de regressão da curva de Lineweaver–Burk. As concentrações utilizadas foram de 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75 e 2,0 % (m v⁻¹) de amido solúvel, carboximetilcelulose e p-nitrofenilpalmitato (Sigma-Aldrich) para a determinação da atividade enzimática conforme o iten 3.2.6 (LINEWEAVER-BURK, 1934).

3.2.9 Aplicação das enzimas em formulação de detergentes

3.2.9.1 Compatibilidade e estabilidade das enzimas amilase, celulase e lipase com detergentes de roupas comerciais

Para realização deste experimento foram utilizados detergentes comerciais líquidos para roupas (D1, D2 e D3). Estes foram diluídos em água destilada na concentração de 7 mg/mL, simulando as condições de lavagem (BANERJEE et al., 1999). As amostras foram aquecidas a 100°C durante 15 minutos, afim de desnaturar quaisquer enzimas porventura presentes na formulação dos detergentes, o extrato enzimático bruto foi adicionado a estas soluções na proporção de 1:1. As atividades das enzimas foram obtidas segundo metodologias descritas no item 3.2.6. Um controle contendo apenas extrato enzimático e água destilada foi utilizado.

Após determinar a marca de detergente que proporcionou melhores atividades, as enzimas foram incubadas em uma solução do mesmo a 50°C durante 120 minutos. As atividades das enzimas foram obtidas segundo metodologias descritas no item 3.2.6. Foi utilizado como controle, o extrato enzimático e água destilada.

3.2.9.2 Teste de lavagem

Com o objetivo de provar a eficácia da solução detergente-enzimas na remoção de sujeiras, pedaços (5x5cm) de tecido de 100 % algodão foram manchados com gema de ovo, molho de tomate e óleo de soja, e foram submetidos a diferentes tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Tratamentos para avaliar a eficiência da solução detergente-enzimas.

	Água destilada (mL)	Detergente (mL)	Extrato enzimático (mL)
1	100	0	0
2	100	1	0
3	100	1	2
4	100	1	5

Os erlenmeyers com os tratamentos descritos na tabela 3 foram incubados a 50°C durante 15 minutos. Posteriormente, os tecidos foram lavadas com água destilada e secas. O efeito das enzimas na remoção das manchas foram reveladas através de um exame visual. Foram utilizados como controle, tecidos manchados com gema de ovo, molho de tomate e óleo de soja, sem tratamento (CORRÊA, 2009).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Caracterização físico-química do resíduo da casca da jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

Os resultados alcançados na caracterização físico-química da casca da jaca (Tabela 4) indicam que o *Penicillium Camemberti* (ATCC 4845) não encontrou muita resistência para alcançar o substrato e iniciar o processo de fermentação, visto que a porcentagem de lignina e celulose não foi elevada. A presença de nutrientes no resíduo em estudo permitiu a produção de enzimas sem adição de aditivos ao processo fermentativo.

Tabela 4. Caracterização físico-química da casca da jaca (*Artocarpus heterophllus* Lam.).

Componente	Valor (%)
Proteína bruta	6,81
Extrato etéreo	1,00
Material mineral	4,27
FDN	39,76
FDA	38,96
Cinzas	0,14
Lignina	15,23
Celulose	23,73
Hemicelulose	0,80

Diante dos resultados apresentados, podemos considerar que a casca de jaca é um substrato rico em nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo, destacando assim, o potencial do resíduo, para ser utilizado na fermentação em estado sólido como como substrato (matriz sólida), para produção das enzimas amilase, celulase e lipase. Vale ressaltar que na literatura não foi encontrado trabalhos que realizaram a caracterização físico-química da casca da jaca, os trabalhos encontrados falando sobre essa a fruta em questão, avaliam apenas a composição das sementes e bagas deste fruto, visto que, as bagas normalmente são consumidas e as sementes podem ser utilizadas na alimentação por serem consideradas nutritivas.

3.3.2 Prospecção enzimática no extrato sem fermentar

Os dados obtidos no extrato sem fermentar, descritos na tabela 5, demonstram que o mesmo apresenta uma baixa atividade enzimática das enzimas amilase, celulase e lipase. Por este motivo pode-se concluir que o aumento da atividade dessas enzimas após a fermentação em estado sólido será devido ao microrganismo utilizado, pois o mesmo terá acesso aos nutrientes presentes na casca da jaca, iniciando o processo de fermentação, secretando as enzimas que estão sendo estudadas.

Tabela 5. Atividade das enzimas em estudo no extrato da casca da jaca mole (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) sem fermentar.

Enzima	U/mL
Amilase	$0,009 \pm 0,023$
Celulase	$0,095 \pm 0,006$
Lipase	$0,667 \pm 0,012$

3.3.3 Condições ótimas de fermentação para produção das enzimas amilase, celulase e lipase

Uma análise preliminar da Tabela 6, permitiu verificar que o fungo *Penicillium* camemberti ATCC 4845 foi capaz de produzir as enzimas em estudo utilizando a casca de jaca como substrato de acordo com todas as combinações das variáveis avaliadas em concordância com o planejamento.

O maior valor obtido para a atividade enzimática da amilase $(17,32\pm0,029~\text{U/mL})$ é visualizada no ensaio 10, com uma concentração de esporos 10^7 , temperatura de 25°C e tempo de 5 dias. Para a celulase $(19,09\pm0,010~\text{U/mL})$ no ensaio 1, com uma concentração de esporos 10^7 , temperatura de 35°C e tempo de 5 dias e lipase no ensaio 12, como era o ponto central foi calculada a média da atividade enzimática $(16,42\pm0,009~\text{U/mL})$, com uma concentração de esporos 10^5 , temperatura de 25°C e tempo de 10 dias como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade enzimática após fermentação de acordo com planejamento experimental para as enzimas amilase, celulase e lipase.

Ensaio	Concentração	Temperatura	Tempo	Amilase	Celulase	Lipase
	de esporos	(°C)	(dias)	(U/mL)	(U/mL)	(U/mL)
1	1E+7	35	5	16,64 ±	19,09 ±	$7,36 \pm$
				0,005	0,010	0,013
2	1 E+9	35	10	12,50 ±	14,47 ±	12,10 ±
				0,004	0,002	0,010
3	1 E+5	35	10	13,88 ±	13,81 ±	12,27 ±
				0,006	0,008	0,012
4	1 E+7	35	15	13,38 ±	12,99 ±	6,98 ±
				0,007	0,004	0,013
5	1 E+9	30	5	12,85 ±	9,84 ±	7,36 ±
				0,016	0,006	0,012
6	1 E+5	30	5	$9,68 \pm$	$11,\!08 \pm$	$10,72 \pm$
				0,022	0,002	0,020
7	1 E+7	30	10	$11,54 \pm$	$10,52 \pm$	$7,93 \pm$
				0,019	0,006	0,001
7	1 E+7	30	10	$13,34 \pm$	$10,59 \pm$	$7,21 \pm$
				0,021	0,007	0,001
7	1 E+7	30	10	$13,29 \pm$	$10,62 \pm$	$5,45 \pm$
				0,003	0,004	0,004
8	1 E+9	30	15	$13,65 \pm$	$11,\!08 \pm$	$13,04 \pm$
				0,008	0,002	0,013
9	1 E+5	30	15	$13,07 \pm$	$11,30 \pm$	$15,40 \pm$
				0,001	0,004	0,004
10	1 E+7	25	5	$17,32 \pm$	$11,72 \pm$	$9,29 \pm$
				0,029	0,007	0,013
11	1 E+9	25	10	11,44 \pm	$15,18 \pm$	$13,85 \pm$
				0,008	0,004	0,016
12	1 E+5	25	10	$11,68 \pm$	$14,58 \pm$	$16,42 \pm$
				0,001	0,007	0,009
13	1 E+7	25	15	$14,64 \pm$	$14,60 \pm$	$12,81 \pm$
				0,023	0,012	0,009

Para a produção das enzimas amilase, celulase e lipase, utilizando apenas a casca da jaca mole como substrato, a literatura ainda se encontra carente, visto que dos trabalhos encontrados com a jaca apenas um utiliza as sementes como substrato na fermentação para produção de enzimas (MARQUES et al, 2018). Os resultados encontrados demonstram que o substrato utilizado no presente trabalho pode ser utilizado na fermentação em estado sólido para a obtenção de um extrato multienzimático, visto que o mesmo apresentou atividade de três enzimas.

A Figura 4 ilustra a superfície de resposta da desejabilidade global para se encontrar um condição ótima em comum para as enzimas amilase, celulase e lipase. De acordo com a figura apresentada não foi possível identificar a condição ótima, porém, é possível visualizar as condições mínimas temperatura (27 – 33°C). O modelo experimental pode ser descrito pela equação 1.

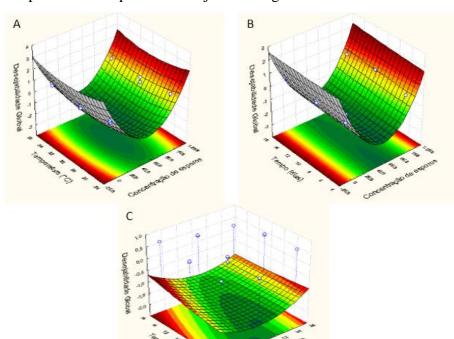


Figura 4. Superfície de resposta da desejabilidade global.

A: concentração de esporos x temperatura (°C); B: concentração de esporos x tempo (dias); C: temperatura (°C) x tempo (dias).

 $U = 12,6376 - 0,8739T + 0,0153T^2 + 0,1507t + 0,0011t^2 - 0,0054Tt$

Onde: $T = \text{temperatura } (^{\circ}C); t = \text{tempo } (\text{dias})$

(Equação 1)

CORREA et al. (2009) produziram amilase e celulase com tempo de fermentação de quatro dias, utilizando a mistura da casca do maracujá com o farelo de arroz, para a enzima amilase a atividade máxima encontrada foi 5,5 U/100 g e para a celulase uma atividade de aproximadamente 4,7 U/100g. Muito inferior à que foi encontrada no presente trabalho, visto que a U/g para transformar em U/mL é só dividir por 10, o resultado demonstra que pode-se obter bons resultados utilizando apenas a casca da jaca como substrato.

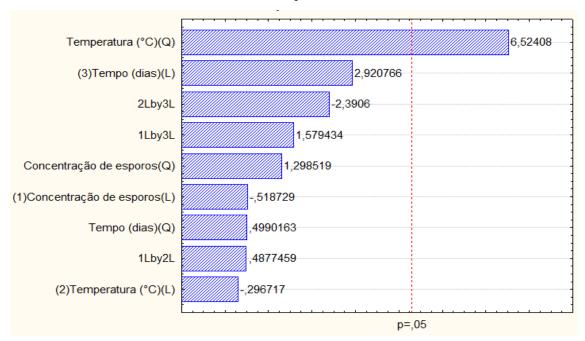
SANTOS et al. (2016) encontraram como tempo ótimo aproximadamente três dias, para a produção de celulase, utilizando a palma como substrato. O tempo ótimo de fermentação encontrado na literatura não coincide com o resultado destacado no presente trabalho. No entanto, ressalta-se que as condições utilizadas nos ensaios fermentativos deste trabalho não fizeram uso de aditivos ou suplementos para potencializar a secreção da atividade enzimática encontrada e obteve-se um bom resultado no ensaio 1, descrito na tabela 6, apresentando um tempo de 5 dias.

PENHA et al. (2016) encontraram uma atividade máxima de 72,57 U/g (7,257 U/mL) de lipase, utilizando resíduos de dendê como substrato na fermentação em estado sólido no tempo de dois dias, o presente trabalho encontrou uma resultado melhor em dez dias, descrito na tabela 6.

Devido aos valores de fibra em detergente ácido (38,96%), lignina (15,23%) e celulose (23,73%), aliado aos mecanismos intracelulares que o microrganismo dispõe, possibilitou ao mesmo aproveitar os nutrientes presentes no substrato da casca da jaca mole, permitindo com que houvesse a produção das enzimas citadas.

A análise de Pareto com 95% de confiança revelou que o termo estatisticamente considerado significativo para as enzimas foi a temperatura no modelo quadrático (Figura 5).

Figura 5. Diagrama de Pareto para concentração de esporos 10^x, temperatura (°C) e tempo (dias) para otimização da obtenção das enzimas amilase, celulase e lipase por *PenicilliumCamemberti* através da fermentação em estado sólido.



A Tabela 7 descreve os dados obtidos da ANOVA para a desejabilidade, onde revela que o F calculado foi maior que o tabelado na regressão e a falta de ajuste não foi significativa, apresentando um R² de 0,87, indicando que 87% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) pela desejabilidade em 95 % de intervalo de confiança.

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	0,7434	9	0,0826	3,7236	3,4817
Resíduos	0,1109	5	0,0222		
Falta de ajuste	0,0854	3	0,0285	2,2296	9,5520
Erro puro	0,0255	2	0,0128		
Erro total	0,8544	14			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

3.3.4 Caracterização enzimática

3.3.4.1 Determinação do pH e temperatura ótimos

Após a saturação em sulfato de amônio, o precipitado apresentou uma atividade para a enzima amilase igual a 0,120 U/mL, celulase de 0,060 U/mL e lipase de 1,00 U/mL.

A Tabela 8 mostra o planejamento experimental Doehlert utilizado para avaliar a atividade das enzimas amilase, celulase e lipase produzida por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 através do processo de fermentação em estado sólido, variando pH e temperatura.

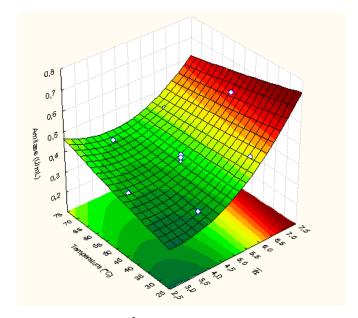
Tabela 8. Matriz Doehlert empregada na otimização das condições (pH e temperatura) de reação com amilase, celulase e lipase de *Penicillium camemberti* ATCC 4845.

Ensaio	pН	Temperatura	Amilase	Celulase	Lipase
1	4	70	$0,41 \pm 0,035$	$3,05 \pm 0,002$	$7,58 \pm 0,016$
2	6	70	$0,45 \pm 0,034$	$2,90 \pm 0,009$	$13,22 \pm 0,006$
3	3	50	0.35 ± 0.048	$3,14 \pm 0,012$	$0,090 \pm 0,001$
4	5	50	$0,42 \pm 0,003$	$3,28 \pm 0,001$	$7,77 \pm 0,007$
4	5	50	0.38 ± 0.040	$3,08 \pm 0,001$	$8,39 \pm 0,002$
4	5	50	$0,40\pm0,020$	$3,18 \pm 0,005$	$8,64 \pm 0,012$
5	7	50	$0,60 \pm 0,030$	$3,42 \pm 0,016$	11,55± 0,006
6	4	30	0.34 ± 0.007	$3,11 \pm 0,005$	$4,26 \pm 0,005$
7	6	30	$0,49 \pm 0,075$	$3,00 \pm 0,002$	$8,15 \pm 0,007$

O maior valor encontrado para a atividade enzimática da amilase $(0,60 \pm 0,030 \text{ U/mL})$ é visualizada no ensaio 5, com pH igual 7 e temperatura de 50°C. O mesmo acontece com a enzima celulase, apresentando uma atividade igual a $3,42 \pm 0,016 \text{ U/mL}$ e lipase nos ensaios 2 (pH 6 e temperatura 70° C) e 5 (pH 7 e temperatura 50° C), com atividade igual a $13,22 \pm 0,006 \text{ U/mL}$ e $11,55 \pm 0,006 \text{ U/mL}$ respectivamente, como pode ser observado na Tabela 8.

De acordo com o planejamento experimental adotado, as condições ótimas para a máxima atividade da enzima amilase foi encontrada num pH 7,0, tendendo ao pH básico e na temperatura de 50 °C, o mesmo foi encontrado para a enzima celulase, como demonstram as figuras 6 e 7.

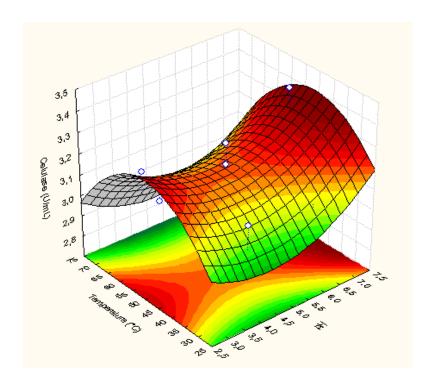
Figura 6. Superfície de resposta para a enzima amilase.



 $U \! = 0,\! 2976 - 0,\, 0761 pH + 0,\! 0196 pH^2 + 0,\! 0053 T - 0,\! 0012 pHT$

(Equação 2)

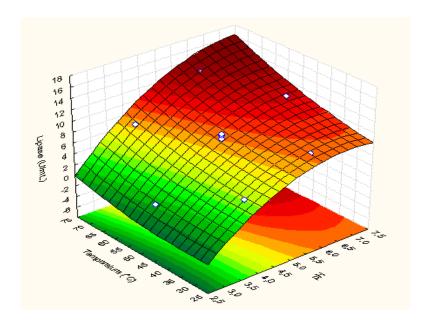
Figura 7. Superfície de resposta para a enzima celulase.



 $U = 2,5010 - 0, 1969pH + 0,0245pH^2 + 0,0465T - 0,0004T^2 - 0,0004pHT$

(Equação 3)

Figura 8. Superfície de resposta para a enzima lipase.



$$U = 8,2691 + 5,\, 4093 pH - 1,2248 pH^2 + 4,1934 T + 1,2893 T^2 + 0,8726 pHT \end{tabular}$$
 (Equação 4)

Observa-se que a enzima lipase apresenta pH 7 e temperatura 50°C, como condições ótimas, de acordo com a Figura 8. De acordo com o gráfico de pareto para a enzima amilase (Figura 9), pode-se observar que apenas a variável pH foi significativa tanto no modelo linear, quanto no modelo quadrático. Para a enzima celulase (Figura 10) demonstra que nenhuma das variáveis foram significativas. Já para a enzima lipase (Figura 11) apresentou como variáveis sigificativas o pH no modelo linear e quadrático e a temperatura no modelo linear.

Figura 9. Gráfico de pareto para a enzima amilase.

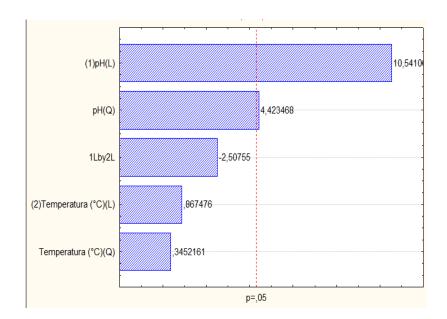


Figura 10. Gráfico de pareto para a enzima celulase.

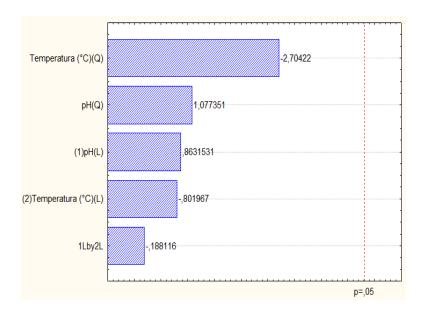
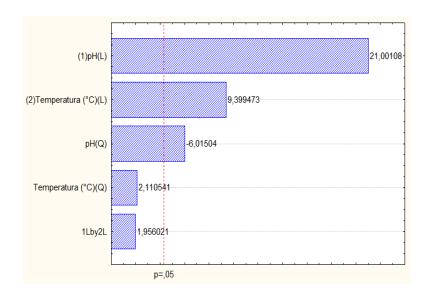


Figura 11. Gráfico de pareto para a enzima lipase.



Analisando a ANOVA para a enzima amilase (Tabela 9) revela que o F calculado foi maior que o tabelado na regressão e a falta de ajuste não foi significativa, apresentando um R² de 0,96 indicando que 96% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado.

A enzima celulase (Tabela 10) apresentou um R² de 0,62, o F calculado foi menor que o tabelado na regressão e a falta de ajuste não foi significativa. Os R² indica que apenas 62% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado. A lipase (Tabela 11) o F calculado foi menor que o tabelado na regressão e a falta de ajuste não foi significativa. Apresentando um R² de 0,99, indicando que 99% dos valores experimentais podem ser explicados pelo modelo matemático utilizado.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) com 95 % de intervalo de confiança para a enzima amilase.

	SQ	GL	MQ	F	F
				calculado	tabelado
Regressão	0,052	5	0,010	18,78	5,51
Resíduos	0,002	3	0,001		
Falta de	0,001	1	0,001	2,41	199,5
ajuste					
Erro puro	0,001	2	0,000		
Erro total	0,054	8			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) com 95 % de intervalo de confiança para a enzima celulase.

	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	0,114	5	0,023	0,99	5,41
Resíduos	0,069	3	0,023		
Falta de ajuste	0,049	1	0,049	4,94	199,50
Erro puro	0,020	2	0,010		
Erro total	0,183	8			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) com 95 % de intervalo de confiança para a enzima lipase.

	SQ	GL	MQ	F	F
				calculado	tabelado
Regressão	115,6	5	23,12	68,45	5,41
Resíduos	1,01	3	0,34		
Falta de	0,62	1	0,615	3,0914	199,5
ajuste					
Erro puro	0,40	2	0,199		
Erro total	116,6	8			

GL = Grau de Liberdade; SQ = Soma dos Quadrados; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher

CORRÊA (2009) produziu um tipo de amilase por *Bacillus* sp que apresentou pH ótimo igual a 9 e temperatura 90 °C, a autora relata que a enzima permaneceu estável, quando incubada a temperaturas de 40 a 70 °C. Algumas enzimas são termoestáveis e essa característica depende de qual microrganismo ela foi produzida.

TAMILANBAN et al. (2017) encontraram para a enzima celulase produzida pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* pH 8 e temperatura de 50°C. O valor de pH é próximo ao encontrado no presente trabalho e estas condições geralmente variam por se trabalhar com microrganismos.

SETHI et al. (2016) encontraram temperaturas semelhantes em lipases produzidas por *Aspergillus terreus* NCFT 4269, apresentando atividade máxima na temperatura de 50°C e pH ótimo em 6,0. COLLA et al. (2015) relatam que lipases de *Aspergillus* encontra-se uma faixa de pH entre 6,3 a 7,7 enquanto que a faixa de

temperatura é mais ampla, variando de 28°C a 42°C. Resultados estes bem próximos aos encontrados no presente trabalho utilizando o *Penicillium camemberti* ATCC 4845.

3.3.4.2 Influência de sais

O comportamento das enzimas produzidas por *Penicillium camemberti* na presença de alguns sais (ou íons) foi avaliado utilizando sais de cloreto (NaCl, CaCl₂, KCl, MgCl₂, FeCl₃ e ZnCl₂), dos íon Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ e Zn²⁺ em diferentes concentrações (0,05, 0,10, 0,15, 0,20 a 0,25 mol L⁻1) em tampão citrato-fosfato (0,05 mM, pH 7,0).

A partir da análise da Figura 12, percebe-se que houve um aumento de 100 % da atividade da enzima amilase com os íons K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Fe^{3+} , em baixa concentração, permanecendo uma atividade estável ao aumentar a concentração destes íons. Os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} influenciaram de forma negativa na atividade desta enzima mesmo em baixas concentrações.

A Figura 13 demonstra que para a enzima celulase houve um aumento de 100 % da atividade da enzima com os íons Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺ e Fe³⁺, aumentando a concentração do íon K⁺ ocorre uma elevação na atividade da enzima e aumentando a concentração do íon Fe³⁺ a atividade diminui significativamente. O íon Zn²⁺ faz com que a enzima perca sua atividade.

A enzima lipase apresentou um aumento em sua atividade de mais de 200% com a presença dos íons Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{3+} até a concentração 0,10 mol L^{-1} , aumentando a concentração, na presença do íon Fe^{3+} a enzima começa perder a atividade. Os íons K^+ e Na^+ diminuíram a atividade da enzima (Figura 14).

Os íons metálicos são considerados cofatores enzimáticos, atuando de forma favorável com a enzima, trazendo estabilidade a suas estruturas, podendo evitar sua desnaturação, entre outras; em outros casos esses íons podem estimular ou até mesmo inibir a atividade de enzimas (LEHNINGER, 2011; SILVA; MELO, 2016; REHMAN et al., 2015; COUTINHO, 2017). As lipases não dependem de íons como cofatores, porém alguns íons podem aumentar ou diminuir sua atividade (SHARMA et al., 2016).

CORRÊA (2009) destacou a influência positiva do íon Ca²⁺ na atividade da enzima amilase. Segundo TAMILANBAN et al. (2017) a enzima celulase produzida por *Stenotrophomonas maltophilia* apresentou um aumento em sua atividade na presença do íon Na⁺. Em estudos semelhantes foram encontrados em lipase de *Aspergillus niger*

AN0512, um aumento da atividade na presença do Ca^{2+} e diminuição na presença do Fe^{2+} (LIU et al, 2015).

Figura 12. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de amilase.

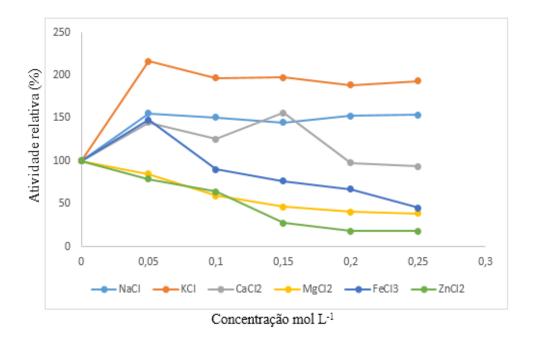


Figura 13. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de celulase.

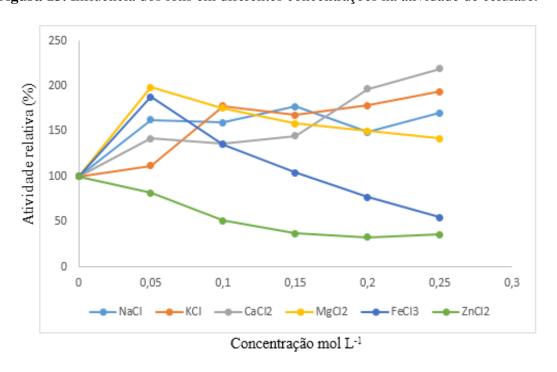
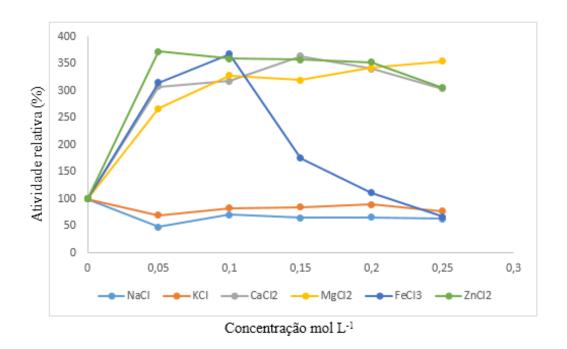


Figura 14. Influência dos íons em diferentes concentrações na atividade de lipase.



3.3.4.3 Parâmetros cinéticos

A afinidade das enzimas pelo substrato utilizado foi avaliada a partir dos resultados de K_m e V_{max} . A Figura 15 apresenta um gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima amilase.

Os dados cinéticos para a hidrólise do amido, carboximetilcelulose e P-NPP foram ajustados a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros, isto é, a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a taxa máxima de reação(V_{max}), das enzimas precipitadas em sulfato de amônio foram calculadas através do método de linarização de Lineweaver – Burk, expresso nas Figuras 15, 16 e 17. Valores elevados da constante de Michaelis-Menten (K_m) indicam uma baixa afinidade para com substrato, isto é, uma maior concentração de substrato é necessário para atingir metade da atividade máxima (GUPTA et al., 2008).

Os valores encontrados para a enzima amilase de *Penicillium camemberti* ATCC 4845 foram de 3,6 mM para o K_m e 0,27 mmol.min⁻¹ para o V_{max} . Para celulase (Figura 16) foram 8,42 mM para o K_m e 0,12 mmol.min⁻¹ para o V_{max} e para a enzima lipase (Figura 17) o K_m foi de 0,14 mM e o V_{max} de 6,78 mmol.min⁻¹. TAMILANBAN et al. (2017) obtiveram Km de 5,41mg/mL e Vmax de 161,29 μ mol/min/mg. MEHTA et al.

 $(2018)\ demonstraram\ para\ a\ enzima\ lipase\ do\ \textit{Aspergillus\ furmigatus}\ com\ um\ K_m\ de\ 9,89$ $mM\ e\ um\ V_{max}\ de\ 10\ mmol.min^{-1}.$

Figura 15. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da amilase de *Penicillium camemberti* ATCC 4845.

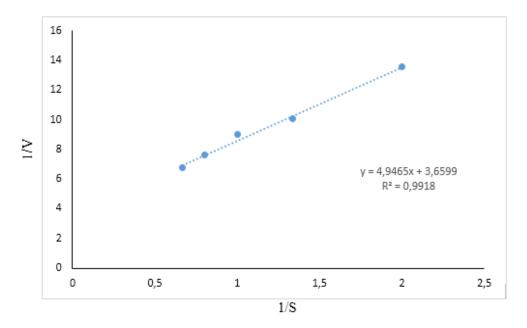


Figura 16. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da celulase de *Penicillium camemberti* ATCC 4845.

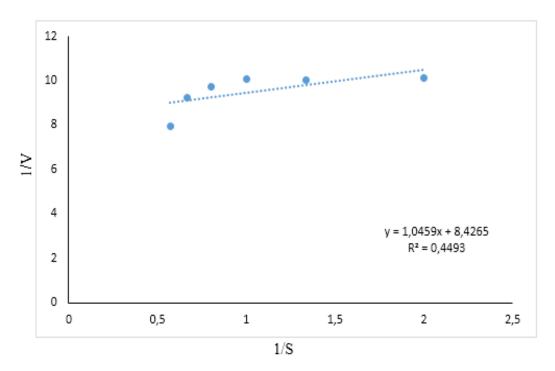
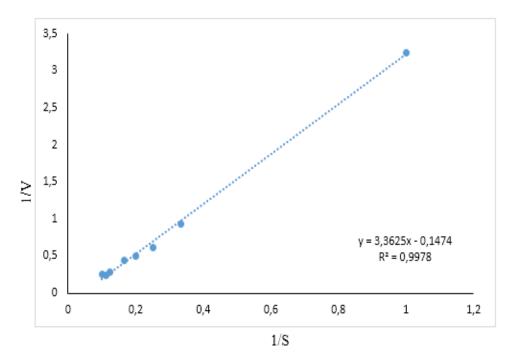


Figura 17. Gráfico de duplo-recíproco obtido para estimação de K_m e $V_{M\acute{a}x}$ da lipase de *Penicillium camemberti* ATCC 4845.

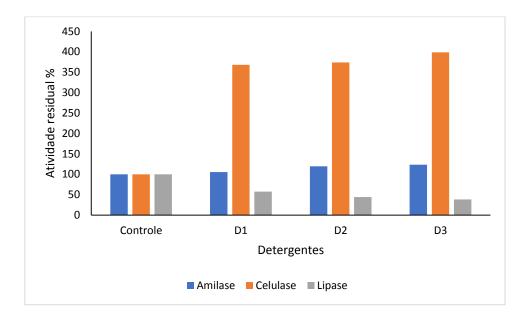


3.3.5 Aplicação das enzimas em formulações de detergentes

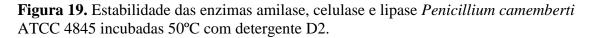
3.3.5.1 Compatibilidade e estabilidade das enzimas em detergentes comerciais

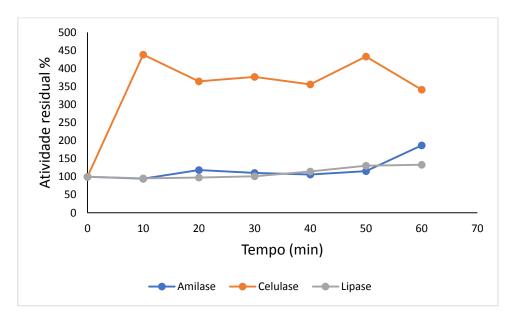
Para avaliar a compatibilidade e a estabilidade das enzimas amilase, celulase e lipase, foram utilizados os detergentes comerciais D1, D2 e D3. Todas enzimas estudadas foram compatíveis aos detergentes testados. A atividade da amilase foi estimulada quando incubada na presença dos detergente D1 e D3, onde aumentou cerca de 20% e 23%, respectivamente. A atividade da enzima celulase aumentou mais de 200% nos três detergentes comerciais testados e a enzima lipase reduziu em torno de 61% quando comparadas ao controle adotado como 100% (Figura 18). Vários estudos sobre a aplicação de enzimas em fórmulas de detergente estão disponíveis na literatura. O que torna possível a aplicação de enzimas hidrolíticas em formulações de detergente é a sua compatibilidade e estabilidade com os constituintes dos mesmos (MITTIDIERI et al., 2006).

Figura 18. Compatibilidade das enzimas amilase, celulase e lipase secretadas por *Penicillium camemberti* ATCC 4845 com fórmulas comerciais de detergente.



As enzimas apresentaram boa compatibilidade com o detergente D2, por esse motivo a estabilidade da amilase, celulase e lipase foram estudadas na presença deste detergente. A amilase, incubada a 50°C durante 120 minutos com o detergente D2, mostrou um aumento na sua atividade, cerca de 87%, até o tempo de 60 minutos (Figura 19). Sendo assim, a presença do detergente na solução do ensaio enzimático contribuiu para o aumento da estabilidade da enzima. A celulase aumentou mais de 200% de sua eficiência catalítica nos primeiros 10 minutos de incubação. Já a enzima lipase só aumentou sua atividade a partir dos 40 minutos de incubação, com cerca de 14%. Geralmente as enzimas quando incubadas a uma determinada temperatura por tempos elevados elas perdem sua atividade. Portanto, a estabilidade das enzimas na presença do detergente D2, ou foi aumentada ou não alterada (CARVALHO et al., 2008).





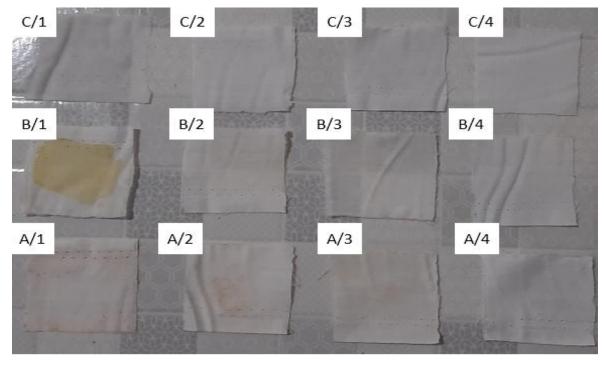
3.3.5.2 Teste de lavagem

A eficiência da amilase foi avaliada pela remoção da mancha de molho de tomate, observado principalmente quando uma maior quantidade da enzima (5 mL) foi adicionada à solução de detergente. As celulases e lipases também mostraram resultados satisfatórios, removendo as sujidades contendo gema de ovo e óleo de soja. Com concentrações maiores da enzima houve melhor remoção das sujeiras. Os tecidos que foram sujos com óleo, a sujeita não é totalmente visível, mas o material ficou muito oleoso e após os tratamentos o tecido ficou macio, sem oleosidade, principalmente no tratamento com 5 mL de extrato enzimático. Sendo assim, todas as enzimas mostraram potencial para serem aplicadas como aditivos em fórmulas de detergente. A figura 20 se encontra o controle, ou seja, os tecidos sem tratamento.

Figura 20. Tecidos sem tratamento, manchados com: com molho de tomate (a), gema de ovo (b) e óleo de soja (c).



Figura 21. Remoção de manchas em tecido com molho de tomate (a), gema de ovo (b) e óleo de soja (c) através da solução detergente-enzimas: (1) peças incubadas com água destilada; (2) peças incubadas com água destilada e 1mL de detergente; (3) peças incubadas com água destilada, 1mL de detergente e 2mL do extrato enzimático; (4) peças incubadas com água destilada, 1mL de detergente e 5mL do extrato enzimático.



ARIJIT et al. (2016) e CORRÊA (2009) conseguiram remover manchas de óleo de amendoim, molho de tomate e gema de ovo, aplicando as enzimas lipase, amilase e protease.

3.6 Considerações finais

As melhores atividades das enzimas amilase, celulase e lipase por *Penicillium* camemberti através da fermentação em estado sólido utilizando a casca de jaca como substrato foram $17,32 \pm 0,029$ U/mL para a enzima amilase, $19,09 \pm 0,010$ U/mL para a celulase e $16,42 \pm 0,009$ U/mL para a lipase. As enzimas se mostraram eficientes no pH 7,0 e temperatura de 50 °C. Os sais que mais aumentaram a atividade das enzimas foram Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} , no geral, os que diminuíram foram Zn^{2+} e o aumento da concentração de Fe^{3+} . Os valores obtidos para as constantes cinéticas foram de K_m 3,6 mM e $V_{máx}$ 0,27 mmol min⁻¹, para a amilase, K_m 8,42 mM e $V_{máx}$ 0,12 mmol min⁻¹, para celulase e K_m 0,14 mM e $V_{máx}$ 6,78 mmol min⁻¹.

A aplicação do extrato enzimático, contendo as enzimas em estudo, na remoção de manchas em tecidos 100% algodão se mostrou eficiente. As enzimas apresentaram compatibilidade com os detergentes comerciais utilizados, com melhores resultados com a marca D2. Destacando um potencial destas enzimas na aplicação em formulações de detergentes.

3.7 Referências

ARIJIT, D.; SRIVIDYA, S.; SOURAV, B.; SUJINA, S.; SWATHI, S. Purification and Characterization of a Surfactant-compatible Lipase from *Aspergillustamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. **Biotech**, v. 2, n. 6, p. 2-8, 2016.

BANERJEE, U.C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, 35:213–219, 1999.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

CARVALHO, R.V.DE, CORRÊA, T.L.R., SILVA, J.C.M., VIANA, A.P., MARTINS, M.L.L.. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo

- termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28:1-7, 2008.
- COLLA, L. M., FICANHA, A. M. M., RIZZARDI, J., BERTOLIN, T. E., REINEHR, C. O., & COSTA, J. A. V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of Aspergillusthrough Solid-State and Submerged Fermentation. **BioMedResearchInternational**, 1–9, 2015.
- COLLA, M. L.; PRIMAZ, L.A.; BENEDETTI, S.; LOSS, A.R.; LIMA, M.; REINEHR, S.; BERTOLIN, E.T.; COSTA, V.A.J. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2(47), 461-467, 2016.
- CORREA S.L.; ROCHA P.C.; FILHO C. U.; CARDOZO L. V. Avaliação do tempo de fermentação para produção de enzimas empregando resíduos agroindustriais. **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.
- CORRÊA, Thamy Lívia Ribeiro; M. S., Produção simultânea de α-amilase e proteases pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Dissertação mestrados **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, 2009.
- COUTINHO, A. G. G. Incremento na atividade da H⁺-ATPase do tipo vacuolar induzido pelo estímulo do receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR) em um modelo de célula intercalar renal (MDCK C11). Tese (Doutorado em Fisiologia) **Universidade Federal do Paraná**, 2017.
- DE SOUZA, P. M. e MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850 861, 2010.
- FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. dos S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. de O.; DE FREITAS, J. S.; VALASQUES JUNIOR, G. L.; FRANCO, M. NASCIMENTO JUNIOR, B. B. Production of lipase from Penicilliums p. using waste oils and Nopaleacochenillifera. **Chemical Engineering Communications**, VOL. 204, NO. 10, 1167–1173, 2017.
- FERREIRA, A. N. et al. Investigação da obtenção, purificação e aplicação de lipases microbianas. In: DE OLIVEIRA, G. A. L. **Pesquisa e sociedade: os desafios e as contribuições da ciência**.1. ed. Campo Grande: Inovar, 2020. p. 83 93. Disponível em: https://editorainovar.com.br/_files/200000667-760867608b/Livro%20-%20PESQUISA%20E%20SOCIEDADE%20OS%20DESAFIOS%20E%20AS%20CONTRIBUI%C3%87%C3%95ES%20DA%20CI%C3%8ANCIA.pdf. Acesso em 27 nov. 2020.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2/3, p.85-101, 2003.
- GHOSE T. K. Measurement of cellulase activities. Pure Andamp; **Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

- GUPTA, S., YOGESH, JAVIYA, S., BHAMBI, M., PUNDIR, C. S., Singh, K., and Bhattacharya, A. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 42(2), 145–151, 2008.
- GUSMÃO, O. R., FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B; ASSIS, F. G. V; Leal P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus* spp. sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, Vol. 10, Num. 11, 2014.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2011.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934.
- LIU, G., HU, S., LI, L., and HOU, Y. Purification and Characterization of a Lipase with High Thermostability and Polar Organic Solvent-Tolerance from Aspergillus nigerAN0512. **Lipids**, 50(11), 1155–1163, 2015.
- MILLER, G, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **AnalyticalChemistry**. V. 31, P. 426-428. 1959.
- MITTIDIERI, S., MARTINELLI, A.H.S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, 97:1217-1224, 2006.
- PEDROLLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of a unique pectin lyase from *Aspergillus giganteus* able to release unsaturated monogalacturonate during pectin degradation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- PENHA, E, M; VIANA, L, A, N; GOTTSCHALK, L, M, F; TERZI, S, C; SOUZA, E, F; DE FREITAS, S, C; SANTOS, J, O; SALUM, T, F, C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger*. **Ciência Rural.** Santa Maria. v.46. n.4. p.755-761. 2016.
- SANTOS C. T.; FILHO A. G.; BRITO R. A.; PIRES V. J. A.; BONOMO F. C. R.; FRANCO M. Production and Characterization of Cellulolytic Enzymes by *Aspergillus Niger* and *Rhizopus SP*. by Solid State Fermentation of Prickly Pear. **Rev. Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 1, p. 222 233, jan. mar, 2016.
- SETHI, B. K., NANDA, P. K., & SAHOO, S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by Aspergillus terreusNCFT 4269.10. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47(1), 143–149, 2016
- SHARMA S. e KANWAR SS. Organic solvent tolerant lipases and applications. **Sci World** J, 2014.

SHARMA, A., K., SHARMA, V., SAXENA, J. Characterization of Lipase from Wild (LPF-5) and Mutant (HN1) Strain of Aspergillus niger. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. Volume 5, Number 11, pp. 681-690, 2016.

SILVA, J. D. et al. Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa, MG: **Editora UFV**, 235 p., 2002.

SOCCOL, C. R., COSTA, E. S. F. da, LETTII, L. A. J., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., VANDENBERGHE, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 1(1), 2017.

STROPARO, C. E., BEITEL, M. S., RESENTE, V. T., Knob A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, nov./dez. 2012.

SUNDARRAM, A.; MURTHY, T. P. K. α -amylase production and applications: a review. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 166 - 175, 2014.

TAMILANBAN R.; VELAYUDHAN S. S.; RAJADAS S. E.; HARSHAVARDHAN S. Purification and characterization of an extracellular cellulase produced using alkali pretreated rice straw by *stenotrophomonas maltophilia*. **International Journal of Biology Research**, V 2, Pg 45-54, 2017.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991. WANDERLEY, D. M.; NEVES, E.; ANDRADE, J. C. Aspectos da Produção Industrial

de Enzimas. Revista Citino, Vol. 1, N° 1, 2011. ZÚÑIGA, R. F. U., FARINAS, S. C., NETO, B. V., COURI, S., CRESTANA, S.

Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec**. bras., Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.

1.3 Considerações finais gerais

De acordo com o trabalho apresentado podemos destacar que no capítulo 1 a prospecção tecnológica permitiu identificar as enzimas mais aplicadas em detergentes, que são as amilases, celulases e lipases. Além disso, ressaltou a importância de se fazer uma busca em bases de patentes, pois os dados coletados auxiliou na tomada de decisões, como por exemplo, avaliar quais enzimas deveriam serem estudadas neste trabalho. No capítulo 2, os dados apresentados através da revisão narrativa destaca o Brasil como um dos maiores produtores de frutas e consequentemente de resíduos de frutas. Evidenciando a importância de utilização desses resíduos para obtenção de bioprodutos, reduzindo assim, possíveis impactos ambientais. O capítulo 3 mostrou que o resíduo utilizado neste trabalho apresenta potencial para ser utilizado em processos fermentativos para a produção de enzimas, como o de fermentação em estado sólido, por exemplo. Foi possível encontrar as condições ótimas de produção das enzimas amilase, celulase e lipase produzidas pelo Penicillium camemberti utilizando a casca de jaca como substrato. Através dos dados apresentados da caracterização físico-química das enzimas, foi possível identificar que os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos na literatura. Além disso, as enzimas produzidas se mostraram eficientes na remoção de manchas em tecido 100% algodão, destacando um potencial destas enzimas na aplicação em formulações de detergentes.