



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**SOELI FRANCISCA MAZZINI MONTE BLANCO**

**PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS ATRAVÉS DA  
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

Florianópolis  
Out/2013



**SOELI FRANCISCA MAZZINI MONTE BLANCO**

**PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS ATRAVÉS DA  
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

Tese de Doutorado em Engenharia Química do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr. e  
Coorientador: Prof. Dr. Jorge Ninow.

Florianópolis  
Out/2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Monte Blanco, Soeli Francisca Mazzini

Produção de Diacilgliceróis Através da Glicerólise Enzimática de Óleo de Peixe / Soeli Francisca Mazzini Monte Blanco ; orientador, Agenor Furigo Junior ; coorientador, Jorge Luiz Ninow. Florianópolis, SC, 2013.

132 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Biotecnologia. 3. Glicerólise enzimática. 4. Diacilgliceróis. 5. Surfactantes. I. Junior, Agenor Furigo. II. Ninow, Jorge Luiz. III. Universidade Federal de Sana Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

SOELI FRANCISCA MAZZINI MONTE BLANCO

**PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS ATRAVÉS DA  
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 25 de outubro de 2013.

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
Coordenador do Curso

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior  
Orientador

---

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow  
Co-orientador

**Banca Examinadora:**

---

Profª. Dra. Débora de Oliveira

---

Profª. Dra. Jane Block

---

Profª. Dra. Maria Manuela  
Camino Feltes

---

Profª. Dra. Silvana Licodiedoff

---

Profª. Dra. Anieli Pinto Kempka



Dedico este trabalho aos amores da  
minha vida: meus filhos **Luíza**,  
**Carlos**, **Giulia** e **Ana**, e meu  
marido **Alfredo**. Vocês são tudo de  
bom na minha vida!





## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e pessoal, por estar comigo em todos os momentos iluminando-me e fortalecendo-me.

Agradeço aos meus pais: Margot e Carlos, exemplos de dedicação e amor, que sempre me incentivaram à continuação dos estudos.

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo apoio para que eu concretizasse esse trabalho: meus filhos Luiza, Carlos, Giulia e Ana e meu marido Alfredo, que estiveram sempre ao meu lado, entendendo-me nos momentos de ausência, dando-me apoio e carinho.

Ao professor Agenor Furigo Jr., meu orientador, que acreditou em mim, e possibilitou-me uma grande aprendizagem, por meio de incentivo e orientação que me foram concedidos durante essa jornada.

Ao professor Jorge Ninow, meu co-orientador, pelos conselhos, orientação e apoio.

À Manu, pela dedicação, pelo imenso conhecimento repassado, pelo carinho e apoio em todas as horas.

À profa. Débora, que muito me ajudou a chegar ao final deste trabalho, auxiliando-me com sua sabedoria e objetividade.

Às minhas irmãzinhas de coração Siannah e Joanna, pessoas incríveis, brilhantes e de grande coração, com as quais tive a honra de conviver e com elas muito aprender.

À Silvana, pelas longas horas de trabalho juntas, pelo modo tranquilo e dedicado de trabalhar.

À Denise, coordenadora do laboratório, que como uma mãe nos cuida, ensina tudo que sabe sem cerimônia, nos chama a atenção quando é preciso, obrigada Dê pelo sorriso a cada manhã, pelas palavras amigas e pelo carinho.

Ao Edevilson, secretário da pós-graduação, que sempre nos recebe com seu sorriso largo e tudo resolve, exemplo de calma e bondade.

À Gisa, querida amiga e colega, pelas longas discussões sobre as metodologias, pela incrível forma de organizar os materiais e trabalhos no laboratório.

À Rosana, sempre alegre e otimista, fez as dificuldades parecerem insignificantes, obrigada pelo companheirismo.

À Dani, pela amizade e apoio em todas as horas, mas principalmente pelo companheirismo no inverno frio de 2011 em Erechim.

Aos alunos bolsistas, Felipe, Henrique e Gabriela, pela amizade e dedicação na realização deste trabalho.

A todos do grupo ENGEBIO, Américo, Jonathan, Glenise, Lindomar, Andréia, Kellen, Kelin, Melodi, valeram os momentos de conversas, discussões e distrações.

Aos colegas e professores, por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo.

Às minhas amigas de todas as horas: Inês, Julieta e Rose, pela amizade e respeito, pela cuia de chimarrão sempre pronta e principalmente pelas várias vezes que me auxiliaram com as crianças para que eu pudesse estudar.

Aos amigos do grupo Escoteiro Desterro, por tantos momentos felizes de aprendizagem, lazer e descontração.

Aos amigos do Centro Espírita Luz e Caridade, pelo imenso apoio recebido e pela confiança depositada.

À UDESC, que me proporcionou este aperfeiçoamento. Sinto-me honrada, realizada e feliz em fazer parte do seu quadro de servidores.

Por fim, a todos que fizeram a arte desta história.

Muito obrigada!

“Procure deixar o mundo um pouco melhor do que o encontrou. O melhor meio para alcançar a felicidade é contribuir para a felicidade dos outros”.

Robert Baden Powell



## RESUMO

Os diacilgliceróis são emulsificantes com alto valor agregado utilizados como aditivos funcionais em alimentos, na medicina e na indústria de cosméticos. Este trabalho apresenta informações experimentais para a obtenção de diacilgliceróis ricos em ácidos graxos essenciais ômega-3 eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), através da glicerólise enzimática de óleo de peixe, em sistemas com diferentes surfactantes de grau alimentício, utilizando a Lipozyme TL<sup>®</sup> IM como biocatalisador. Através do estudo cinético em condições reacionais pré-estabelecidas, onde foram testados os surfactantes Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de soja, obteve-se maior formação de diacilgliceróis (21,40%), com o Tween 65, após 48h de reação, e este surfactante foi escolhido para a continuidade do estudo através de planejamento experimental. Também foi realizado um planejamento para a reação de glicerólise sem surfactante, a fim de estudar os efeitos da interação entre enzima e o glicerol na formação de diacilgliceróis. Os experimentos foram realizados de acordo com planejamentos de experimentos pré-estabelecidos, variando a temperatura, concentração da enzima, razão molar óleo:glicerol. Para o experimento com o Tween 65, A produção máxima foi de 20,76% de diacilgliceróis em 6 horas de reação de glicerólise enzimática, à temperatura de 40 °C, concentração de enzima 25% (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5, concentração de surfactante (Tween 65) de 5%. O experimento sem surfactante resultou na produção aproximada de 13,76% de diacilgliceróis, à temperatura de 70 °C, concentração de enzima de 5% (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5 após 6 horas de reação.

**Palavras-chave:** Diacilgliceróis. Lipozyme TL IM. Óleo de peixe. Glicerólise.



## ABSTRACT

The diglycerides are emulsifiers with high added value used as functional additives in food, medicine and cosmetics industry. This paper presents experimental data to obtain diglycerides rich in essential fatty acids omega-3 eicosapentaenoic acid ( EPA ) and docosahexaenoic fatty acid ( DHA ) by enzymatic glycerolysis fish oil, on systems with different food-grade surfactants, using the Lipozyme<sup>®</sup> TL IM as biocatalyst. Through kinetic study in pre-established reaction conditions where Tween 65, Tween 80, Tween 85 surfactant and soybean lecithin were tested yielded increased formation of diglycerides (21,40wt%), and Tween 65, 48h reaction, and this surfactant was chosen for continued study through experimental design. Was also carried out planning for the reaction glycerolysis without surfactant in order to study the effects of the interaction between enzyme and glycerol in the formation of diglycerides. The experiments were performed according to predetermined schedules of experiments varying the temperature, enzyme concentration, molar ratio of oil:glycerol. For the experiment with the Tween 65, the maximum yield was 20,76wt% of diglycerides in 6 hours of enzymatic glycerolysis reaction at a temperature of 40 °C, enzyme concentration 25wt% (based on total substrates) molar ratio between fish oil and glycerol 1:0,5, surfactant ( Tween 65) at 5wt%. The experiment without surfactant resulted in production of about 13.76wt% of diglycerides at a temperature of 70 °C, enzyme concentration of 5wt% (based on total substrates) molar ratio of fish oil and glycerol 1:0,5 after 6 hours of reaction.

**Keywords:** Diglycerides. Lipozyme TL IM. Fish oil. Glycerolysis.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1-</b> Reação Global da Glicerólise: a) Produção de MAG e b) Produção de DAG. ....	32
<b>Figura 2.2</b> - Estrutura química do 1,2,3-propanotriol (Glicerol). ....	36
<b>Figura 2.3</b> - Metabolismo do glicerol. ....	37
<b>Figura 2.4</b> - Reação global de transesterificação para a produção de glicerol. ....	38
<b>Figura 2.5</b> - Representação do metabolismo dos ácidos graxos essenciais. ....	43
<b>Figura 2.6</b> - Estrutura química dos ácidos graxos EPA e DHA. ....	45
<b>Figura 2.7</b> - Esquema das reações de hidrólise (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa). ....	50
<b>Figura 2.8</b> - Estrutura das formas fechada e aberta da Lipozyme TL. .	53
<b>Figura 2.9</b> - Representação de uma micela normal (óleo em água) e de uma micela inversa (água em óleo). ....	55
<b>Figura 2.10</b> - Estrutura química da lecitina. ....	58
<b>Figura 2.11-</b> Estrutura química dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis. ....	59
<b>Figura 3.1</b> - Aparato experimental utilizado para as reações enzimáticas. ....	64
<b>Figura 4.1</b> – Cinética do consumo de ácido oleico a 30 °C. ....	81
<b>Figura 4.2</b> – Cinética do consumo de ácido oleico a 40 °C. ....	81
<b>Figura 4.3</b> – Cinética do consumo de ácido oleico a 50 °C. ....	82
<b>Figura 4.4</b> – Cinética do consumo de ácido oleico a 60 °C. ....	82
<b>Figura 4.5</b> – Perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em fase gasosa, de amostras do meio reacional (a) antes e (b) após 48 h de reação. ....	88
<b>Figura 4.6</b> – Cromatograma referente à glicerólise enzimática de óleo de Soja. ....	89
<b>Figura 4.7</b> – Placa de TLC das amostras das reações de glicerólise, sem surfactante e com os Tweens 65, 80 e 85, após 48 h de reação. ....	91
<b>Figura 4.8</b> - Placa de TLC da amostra da reação de glicerólise, meio contendo lecitina de soja, após 48 h de reação. ....	91
<b>Figura 4.9</b> – Formação de DAG (%) ao longo de 48 horas de reação de glicerólise em meio contendo surfactantes e reação sem surfactante (controle). ....	92

**Figura 4.10** – Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis avaliadas sobre a produção de diacilgliceróis em glicerólise enzimática de óleo de peixe. .... 96

**Figura 4.11** – Curvas de contorno com os efeitos das variáveis (razão molar, concentração de enzima e temperatura) na produção de DAG. 102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Condições otimizadas e resultados de estudos sobre glicerólise enzimática.....	33
Tabela 2.2 - Composição aproximada (%) dos principais ácidos graxos em alguns peixes de água doce e salgada.....	48
Tabela 2.3 - Valores de BHL para os surfactantes utilizados.....	57
Tabela 3.1 - Nível de variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ para reação de glicerólise enzimática em meio com surfactante Tween 65. ....	74
Tabela 3.2 - Nível de variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionado $2^3$ para reação de glicerólise enzimática em meio sem surfactante. ....	75
Tabela 4.1 – Índice de peróxido e índice de acidez encontrados para o óleo de peixe OmegaPure <sup>®</sup> comparados com os valores máximos permitidos pelos órgãos reguladores. ....	77
Tabela 4.2 – Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM antes e após o condicionamento térmico. ....	78
Tabela 4.3 – Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM em reação com o ácido oleico e propanol em diferentes temperaturas.....	80
Tabela 4.4 - Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM em reação com o ácido oleico e propanol em diferentes temperaturas.....	83
Tabela 4.5 – Fatores de retenção (Rf) da placa de TLC referentes à avaliação da ação da Lipozyme TL IM sobre a lecitina de soja.....	84
Tabela 4.6 – Fatores de retenção (Rf) da placa de TLC referentes à avaliação da ação da Lipozyme TL IM sobre os surfactantes Tween 65, Tween 80 e Tween 85. ....	85
Tabela 4.7 - Atividade de esterificação realizada com o biocatalisador antes e após as reações de glicerólise, na ausência e na presença de surfactantes.....	93
Tabela 4.8 – Matriz do planejamento experimental $2^{4-1}$ (valores codificados e reais) com resposta em termos de concentração mássica de diacilgliceróis (%) para a glicerólise de óleo de peixe em presença do surfactante Tween 65.....	95
Tabela 4.9 - Matriz do planejamento de experimentos fatorial $2^2$ com triplicata do ponto central, (valores reais e codificados) com as respostas de formação de diacilgliceróis após 6 h de reação. ....	97
Tabela 4.10 - Matriz do planejamento experimental para otimização das variáveis avaliadas para a produção de diacilgliceróis de óleo de peixe sem a presença de surfactante. ....	100

Tabela 4.11 - Efeitos das variáveis avaliadas no rendimento de diacilglicerol.....	101
Tabela 4.12 - Resultados do monitoramento do índice acidez nas reações de glicerólise com Tween 65 e sem surfactante.....	105

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGL	Ácidos graxos livres
A/O	Emulsão água em óleo
aw	Atividade de água
CG	Cromatografia em fase gasosa
DAG	Diacilgliceróis
DHA	Ácido docosahexaenóico
[E]	Concentração de enzima (% m/m, em relação ao total de substratos)
EPA	Ácido eicosapentaenóico
G:O	Proporção molar de glicerol e óleo
BHL	Balanço hidrofílico-lipofílico
I.A.	Índice de acidez
I.P.	Índice de peróxido
MAG	Monoacilgliceróis
O/A	Emulsão óleo em água
Rf	Fator de retenção Rf
TAG	Triacilgliceróis



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS .....	30
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
2.1 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA .....	31
2.2 GLICEROL .....	36
<b>2.2.1 Metabolismo do Glicerol</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2.2 Obtenção do Glicerol Comercial</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2.3 Aplicações do Glicerol</b> .....	<b>38</b>
2.3 ÓLEOS E GORDURAS.....	39
<b>2.3.1 Ácidos Graxos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.3.2 Ácidos Graxos Essenciais</b> .....	<b>42</b>
2.4 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR BIOTRANSFORMAÇÃO .....	45
2.5 ÓLEO DE PEIXE.....	46
2.6 LIPASES COMO CATALISADORES .....	49
2.7 LIPOZYME <sup>®</sup> TL IM.....	52
2.8 EMULSÕES.....	55
2.9 SURFACTANTES .....	56
2.10 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS .....	59
<b>2.10.1 Diacilgliceróis (DAGs)</b> .....	<b>60</b>
<b>2.10.2 Obtenção de DAGs</b> .....	<b>61</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
3.1 MATERIAL .....	63
<b>3.1.1 Descrição dos Substratos e Reagentes</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1.2 Aparato Experimental</b> .....	<b>63</b>
3.2 MÉTODOS .....	64
<b>3.2.1 Índice de Peróxido</b> .....	<b>64</b>
<b>3.2.2 Índice de Acidez</b> .....	<b>65</b>

<b>3.2.3 Determinação da Atividade de Água (<math>a_w</math>) do Biocatalisador.</b>	<b>66</b>
<b>3.2.4 Condicionamento Térmico da Lipozyme<sup>®</sup> TL IM .....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.5 Determinação da Atividade Enzimática.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPOZYME TL<sup>®</sup> IM EM DIFERENTES TEMPERATURAS .....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 CINÉTICA DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS .....</b>	<b>68</b>
<b>3.5 AÇÃO DA LIPOZYME<sup>®</sup> TL IM SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5.1 Análise Qualitativa dos Produtos .....</b>	<b>69</b>
<b>3.6 REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA EM DIVERSOS MEIOS REACIONAIS .....</b>	<b>70</b>
<b>3.6.1 Descrição Geral da Reação de Glicerólise Enzimática .....</b>	<b>70</b>
<b>3.6.2 Cinética da Glicerólise Enzimática para Seleção do Surfactante de Grau Alimentício.....</b>	<b>71</b>
<b>3.6.3 Determinação Quantitativa dos Produtos das Reações de Glicerólise .....</b>	<b>71</b>
<b>3.7 MONITORAMENTO PÓS-REAÇÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>3.7.1 Monitoramento da Atividade de Esterificação Residual .....</b>	<b>72</b>
<b>3.7.2 Monitoramento do Índice de Acidez (IA) .....</b>	<b>73</b>
<b>3.8 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VARIÁVEIS NA OBTENÇÃO DE DAGS .....</b>	<b>73</b>
<b>3.8.1 Reação de Glicerólise com Tween 65.....</b>	<b>73</b>
<b>3.8.2 Reação de Glicerólise sem Surfactante .....</b>	<b>74</b>
<b>3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>75</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 ÍNDICE DE PERÓXIDO E ACIDEZ DO ÓLEO DE PEIXE.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 ATIVIDADE DE ÁGUA (<math>a_w</math>) DO BIOCATALISADOR (LIPOZYME<sup>®</sup> TL IM).....</b>	<b>78</b>
<b>4.3 CONDICIONAMENTO TÉRMICO DA LIPOZYME<sup>®</sup> TL IM....</b>	<b>78</b>
<b>4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ESTERIFICAÇÃO) PARA A ENZIMA LIPOZYME TL IM .....</b>	<b>79</b>



4.5 CINÉTICA DO CONSUMO DE ÁCIDO ÓLEICO A DIFERENTES TEMPERATURAS .....	80
4.6 ANÁLISE DA AÇÃO DO BIOCATALISADOR SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO .....	83
4.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DOS CROMATOGRAMAS.....	87
4.5 CINÉTICA DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA PARA SELEÇÃO DO SURFACTANTE DE GRAU ALIMENTÍCIO.....	90
4.6 MONITORAMENTO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO RESIDUAL DA ENZIMA.....	93
4.7 REAÇÕES DE GLICERÓLISE CONTENDO TWEEN 65 E SEM SURFACTANTE .....	94
<b>4.7.1 Reações de Glicerólise Contendo Tween 65.....</b>	<b>95</b>
<b>4.7.2 Reações de Glicerólise sem Surfactante .....</b>	<b>99</b>
<b>4.7.3 Monitoramento do Índice de Acidez.....</b>	<b>105</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	109
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>111</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>129</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Hoje à noite, sentado à mesa e começando a servir-se, você estará compondo um auto-retrato. Seus pais, sua renda, sua classe social e sua religião estão refletidos no alimento que você come, evita, detesta ou não pode comprar. E por que não? O quanto você se preocupa com a sua saúde. (ANJO, 2004)

Nas duas últimas décadas foi dada muita atenção aos efeitos negativos causados à saúde associados ao consumo excessivo de certos óleos e gorduras. Recentemente, contudo, tem sido verificado que o consumo de determinados óleos e gorduras são fundamentais à saúde, pois eles contêm compostos de vital importância na dieta humana, mediante o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados (como o linoleico e linolênico). Além de fornecerem energia, os óleos e gorduras atuam como carreadores de vitaminas e hormônios lipossolúveis para o interior das células. Além disso, os lipídios afetam a estrutura, a estabilidade, o sabor, o aroma, a qualidade de estocagem, as características sensoriais e visuais dos alimentos (CASTRO et al., 2004; SILVA RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; SILVA; GIOIELLI, 2009).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs), especialmente os da série ômega-3, são essenciais na nutrição humana, uma vez que eles desempenham um papel importante no organismo além de auxiliarem na prevenção e tratamento de doenças como hipertensão, câncer, artrite e outras desordens inflamatórias e autoimunes (ANJO, 2004; PADILHA; AUGUSTO-RUIZ, 2007).

A carne e o óleo de fígado de peixes, principalmente peixes de água fria como o salmão, arenque, cavala, anchova e sardinha, tem sido a fonte tradicional para a obtenção de ácidos graxos ômega-3 principalmente o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5) e o ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) (RUBIO-RODRIGUEZ et al., 2010).

Alguns processos de modificações dos lipídios têm sido estudados, com o propósito de melhorar ou modificar suas características físicas e químicas, bem como, para modificar propriedades nutricionais; ou características favoráveis quanto à resposta imune, síntese de eicosanoides e ação anti-inflamatória (SILVA; GIOIELLI, 2009). Desta forma, a construção de diacilgliceróis (DAGs) contendo EPA e DHA

poderá ser utilizada para suprir os ácidos graxos essenciais, com seus respectivos efeitos fisiológicos (FELTES et al., 2012).

Os DAGs juntamente com os MAGs representam 70% dos emulsificantes utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como estabilizantes de emulsões) e farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) (KRISTENSEN; XU; MU, 2005; KRÜGER et al., 2010).

Também são considerados surfactantes não iônicos, podendo ser utilizados como aditivos em alimentos para consumo humano, sendo reconhecidos como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration-USA*), sendo amplamente utilizados por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritação na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (WEBER; MUKHERJEE, 2004; FREITAS et al., 2008;).

Atualmente, os DAGs comerciais, são sintetizados via glicerólise de triacilgliceróis (TAGs). Nesta reação são empregando catalisadores inorgânicos ( $\text{Ca(OH)}_2$ , NaOH) a altas temperaturas 220-250°C, de preferência sob atmosfera inerte (FREITAS et al., 2008; FELTES et al., 2010).

Com o crescente interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, a substituição da rota química pela rota enzimática na produção de DAGs apresenta-se como uma alternativa atrativa. Neste processo são utilizadas condições amenas de temperatura (40-70 °C), diminuindo assim o consumo energético e minimizando a ocorrência de reações indesejáveis, não havendo reações paralelas de polimerização e alterações *trans* nas moléculas produzidas (FERREIRA-DIAS et al., 2001; FREGOLENTE et al, 2009; SANTOS et al, 2011).

Com a biotransformação é possível ter um maior rendimento do processo, a obtenção de produtos biodegradáveis, a redução da quantidade de resíduos, a introdução de rotas mais acessíveis de produção e a possibilidade de utilização das características das lipases como a seletividade e a especificidade, proporcionando a obtenção de produtos com maior qualidade (CASTRO et al. 2004; CORREIA; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2011).

A utilização de enzimas imobilizadas confere maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso da extensão das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas (SKORONSKI, 2009; SANTOS et al., 2011; PRADO; JOÃO). Além disto, a rota

enzimática é considerada mais limpa ambientalmente do que a rota química, sem agredir o meio ambiente, permite o desenvolvimento de produtos com características nutricionais superiores e/ou de aplicação terapêutica específica, os quais representam um desafio tecnológico e uma nova fronteira de pesquisa (CAMPOS, 2010).

No entanto, vários aspectos da reação de glicerólise enzimática precisam ser aprimorados, como a diminuição do tempo de reação para obtenção de uma quantidade satisfatória de DAGs, a manutenção da atividade do biocatalisador para sua máxima reutilização, a utilização de auxiliares como surfactantes e reações assistidas por ultrassom, com a função de auxiliar na homogeneização do sistema glicerol/óleo (CASTRO et al. 2004; FREGOLENTE et al, 2009; REMONATO, 2013).

Segundo Khor et al. (2010), a maior dificuldade na reação de glicerólise é a miscibilidade baixa do glicerol em óleos e gorduras. Nesse sentido, uma opção para ser estudada com mais profundidade, é inclusão de surfactantes no sistema, de preferência surfactantes de grau alimentício a fim de possibilitar o desenvolvimento de um processo biotecnológico simples e barato que possa ser implementado pela indústria, especialmente pela indústria alimentícia (YANG et al., 2005; SANTOS et al, 2011).

## 1.1 OBJETIVOS

Produzir diacilgliceróis através da glicerólise enzimática de óleo de peixe comercial refinado, com a utilização de surfactante de grau alimentício e a enzima Lipozyme TL IM como biocatalisador.

Para atingir o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Verificar a ação da lipase Lipozyme TL IM em meio reacional com os diferentes surfactantes de grau alimentício (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de soja);
- Realizar um estudo cinético das reações de glicerólise enzimática, na presença de diferentes surfactantes de grau alimentício e sem surfactante;
- Avaliar a estabilidade do biocatalisador, através do monitoramento da atividade enzimática após as reações de glicerólise;
- Selecionar um surfactante de grau alimentício para produzir diacilgliceróis, considerando a sua qualidade e a estabilidade da enzima;
- Estudar o efeito das variáveis do processo (temperatura, concentração de enzima, proporção molar dos substratos e adição de surfactante de grau alimentício), bem como a sua influência na formação de diacilgliceróis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

O interesse na produção de MAGs e DAGs através de glicerólise enzimática tem aumentado, pois os processos enzimáticos geralmente empregam condições mais brandas do que a glicerólise química, portanto, produtos de maior pureza e qualidade podem ser formados, especialmente os que contêm ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) (KRISTENSEN; XU; MU, 2005; YANG et al., 2005).

A glicerólise química de óleos e gorduras é responsável pela produção da maioria dos monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs) comercializados, estes produtos são amplamente empregados como emulsificantes pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (YAMANE, 1999).

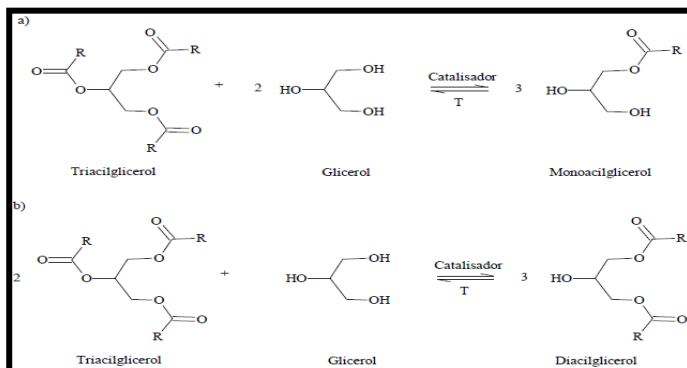
No processo de glicerólise química de óleos e gorduras, ocorre a utilização de altas temperaturas (220-250 °C) na presença de catalisadores inorgânicos, tais como sódio, potássio ou hidróxido de cálcio. As limitações deste processo são o baixo rendimento (máximo de 40-50 % de MAG), a formação de subprodutos indesejáveis, o consumo de energia causado pela reação em alta temperatura e o elevado investimento financeiro (VALÉRIO et al., 2009a).

A glicerólise enzimática oferece a vantagem de um elevado rendimento, já que três moles de MAGs podem ser formados a partir de um mol de triacilglicerol (TAG). Assim, vários sistemas de glicerólise têm sido investigados: com ou sem solvente, com enzimas imobilizadas ou livres e em sistemas de emulsão ou microemulsão (BORNSCHEUER, 1995).

A glicerólise pertence ao grupo de reações conhecidas como alcoólise, na qual o produto das reações não está constituído de quantidades equimolares de MAG e DAG e formam-se, principalmente, os isômeros 1-MAG e 1,3-DAG.

O mecanismo geral da glicerólise por via enzimática consiste inicialmente na hidrólise de uma ligação éster no glicerídeo com liberação de ácido graxo livre, seguida da esterificação desse ácido graxo ao glicerol (CORREIA; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2011), como demonstrado na Figura 2.1.

**Figura 2.1-** Reação Global da Glicerólise: a) Produção de MAG e b) Produção de DAG.



Fonte: Feltes (2011).

Na glicerólise enzimática, os óleos e gorduras naturais podem ser utilizados diretamente sem qualquer tratamento particular, contribuindo para uma maior economia de custos no processo em relação à glicerólise química (YANG et al., 2005).

A glicerólise é uma reação reversível que ocorre em meio homogêneo. De acordo com as reações de formação de MAG e DAG, o rendimento em mono e diésteres será proporcional à quantidade de glicerol dissolvido, a qual depende da temperatura da reação. Quando misturado a gorduras à temperatura ambiente, o glicerol dissolvido em reação está na ordem de 4 %. Sua solubilidade aumenta em torno de 20-22 % a 175-200 °C, chegando a alcançar em torno de 40-45% a 250°C em algumas gorduras (DOS SANTOS; REZENDE, 2012).

Na reação catalisada por enzimas a temperatura utilizada é uma das causas da baixa miscibilidade do glicerol, já que esta ocorre em condições brandas de pressão e temperatura, de maneira a minimizar os problemas como sabor, aroma e coloração escura associados à glicerólise química (FREITAS et al., 2008)

Por outro lado, à medida que ocorre a reação de glicerólise, aumenta a quantidade de MAG e DAG formados no meio reacional, os quais também modificam a solubilidade do glicerol na fase oleosa (GROMPONE, 2011).

Na Tabela 2.1 apresenta-se um resumo de alguns dos principais trabalhos publicados, a fim de obter-se uma visão geral dos estudos já realizados para a produção de emulsificantes a partir da glicerólise enzimática.



**Tabela 2.1-** Condições otimizadas e resultados de estudos sobre glicerólise enzimática.

<b>Lipase testada</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condições otimizadas</b>	<b>Produtos formados</b>	<b>Referência</b>
Chirazyme L2 <sup>(1)</sup>	Óleo de peixe	7%(m/m) de enzima, 60°C, TAG:GLI = 0,89 (mol/mol), 300rpm, sem solvente	20% MAG e 42% DAG após 24h	Torres et al. (2002)
Lipozyme® TL IM <sup>(2)</sup>	Óleo de Girassol	20% (m/m) de enzima, 40°C e 300rpm durante 17h, com redução para 5°C e 200rpm até completar 24h, TAG:GLI =1:1(mol/mol), sem solvente	5% MAG, 50% DAG, 35% TAG, 8% AGL após 24h	Yang et al. (2003)
Lipozyme® TL IM e Novozym® 435 <sup>(3)</sup>	Óleo de colza	9% (m/m) de enzima, 60°C, TAG:GLI = 1:1(mol/mol), à vácuo (20 hPa)	40% DAG (Lipozyme TL IM) e 50% DAG (Novozyme 435, após 6h de reação)	Weber e Mukherjee (2004)
Novozym® 435	Óleo de girassol	10-15% (m/m) de enzima, 40°C, TAG:GLI = 1:4,5 (mol/mol), 700rpm, <i>tert-butanol</i> (1,5:1,álcool:óleo, mol/mol)	70% MAG e 27% DAG, após 2h	Yang et al. (2005)
Novozym® 435, Lipozyme® TL IM e Lipozyme® RM IM	Oleína de palma	10% de enzima (em relação ao peso do óleo), TAG:GLI = 1:1,5 (mol/mol), 55°C, 200rpm, sem solvente	43-50% de DAG com a Novozym 435 (com ou sem a presença de peneiras moleculares ou adsorção em sílica gel), 52 e 45% com a Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM respectivamente	Yeoh et al. (2009)

Lipozyme <sup>®</sup> -TL IM	Óleo de soja	15% (m/m) de enzima, 45°C, TAG:GLI = 1:3,5(mol/mol), 520rpm, com <i>tert</i> -butanol:isopropanol = 80:20, 10% de água	(após o glicerol ter sido adsorvido em sílica gel), após 24h	Zhong et al. (2009)
Novozym <sup>®</sup> 435	Óleo de Oliva	9% (m/m) de enzima, 70°C, 2h, TAG:GLI= 1:6 (mol/mol); 600 rpm, 16% (m/m) de surfactante (Tween 65, Triton X-100)	Tween 65: 43,17% de MAG e DAG, 36,79% de TAG Triton X-100: 37,02% de MAG e DAG, 37,98% de TAG	Valério et al. (2009)
Novozym <sup>®</sup> 435	Óleo de peixe	10% (m/m) de enzima, 55°C por 2h, TAG:GLI= 1:2, 600rpm, e surfactantes (Tween 65, 80 e 85)	Tween 65: 19,41% DAG e 42,72% TAG Tween 80: 15,51% DAG e 42,72% de TAG Tween 85: 17,04% DAG e 46,31% TAG	Feltes et al. (2010)
Novozym <sup>®</sup> 435	Azeite de oliva	10% (m/m) de enzima, 55°C, TAG:gli = 1,5:0,5 (mol/mol), 600rpm, <i>tert</i> -butanol (1:1, v/v em relação aos substratos)	10% MAG e 50% DAG após 8h	Krüger et al. (2010)
Novozym <sup>®</sup> 435	Azeite de oliva	7,5% (m/m) de enzima, 70°C, TAG:gli = 1:2 (mol/mol), 600rpm, 16% AOT (m/m) em relação aos substratos.	61,1% MAG após 2h	Fiametti et al. (2009)

Novozym® 435	Óleo de peixe	5% (m/m) de enzima, TAG:gli = (1:1) (mol/mol), meio livre de solvente , 250rpm e 70°C	25,9% MAG e 38,2% DAG após 24h de reação	Feltes et al. (2012)
Lipozyme® RM IM	Óleo de peixe	10% (m/m) de enzima, TAG:gli = (2:1) (mol/mol), meio livre de solvente, surfactantes Tween 65 e Tween 85 (10%, m/m, em relação ao total de substratos) 600rpm e 55°C	Conversão de TAGs: ~ 80% Para ambos os surfactantes após 48 horas de reação.	Santos et al. (2013)
Novozym® 435	Óleo de Canola	10% (m/m) de enzima, TAG:gli = (1:0,8) (mol/mol), 70°C, 900 rpm e 40% de potência de ultrassom	MAG+DAG: ~75% (m/m) após 120 minutos de reação	Remonato (2013)
Novozym® 435	Óleo de Soja	10% (m/m) de enzima, TAG:gli = (1:0,8) (mol/mol), 70°C, 900 rpm e 40% de potência de ultrassom	MAG+DAG: ~ 65% (m/m) após 90 minutos de reação	Remonato (2013)

Abreviações: gli: glicerol. MAG: monoacilgliceróis. DAG: diacilgliceróis. TAG: triacilgliceróis. AGL: ácidos graxos livres

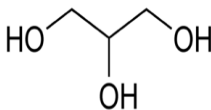
(1) *C. antarctica* fração B, não específica (Boehringer-Mannheim). (2) Lipase de *Thermomyces lanuginosa*, imobilizada comercialmente em sílica (Novozymes). (3) Lipase não específica de *C. antarctica* obtida por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, e adsorvida em uma resina macroporosa (Novozymes). (4) Lipase de *Rhizomucor miehei*, imobilizada comercialmente em resina macroporosa de Duolite (Novozymes).

Os rendimentos de MAG e DAG na reação de glicerólise enzimática dependem do tipo de óleo ou gordura empregados, da lipase utilizada e dos parâmetros reacionais (YANG et al., 2005).

## 2.2 GLICEROL

Quimicamente o glicerol é um composto orgânico pertencente à função álcool (tri-álcool). É líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado, tendo como nome sistemático 1,2,3-propanotriol (IUPAC, 1993). O nome glicerol deriva da palavra grega *glykys*, que significa doce. Também é um importante intermediário no metabolismo dos organismos vivos, sendo encontrado naturalmente na forma combinada como glicerídeos em animais, gorduras vegetais e óleos (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007). A Figura 2.2 mostra a estrutura química do glicerol.

**Figura 2.2** - Estrutura química do 1,2,3-propanotriol (Glicerol).



Fonte: Araújo (2011).

### 2.2.1 Metabolismo do Glicerol

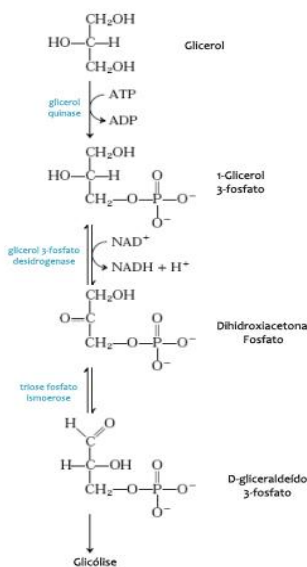
Uma vez absorvido no organismo animal, o glicerol é metabolizado a glicerol-3-fosfato e aos intermediários da glicólise, dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, pois ele é um componente do metabolismo normal dos animais, sendo encontrado na circulação e nas células (MENTEN; PEREIRA; RACANICCI, 2008).

No organismo humano o glicerol é proveniente de (1) lipólise no tecido adiposo, (2) hidrólise dos TAGs das lipoproteínas do sangue e (3) gordura dietética (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Participa como intermediário de vários processos metabólicos em numerosos organismos. Sua síntese e seu metabolismo exercem uma importante função fisiológica, como fonte de carbono e energia, como agente

crioprotetor e osmoregulador para os microrganismos (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O glicerol participa na termo-regulação do corpo, proporcionando resistência a altas temperaturas, resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia (YANG; FRUEKILDE; XU, 2003). A Figura 2.3 representa esquematicamente o metabolismo do glicerol.

**Figura 2.3** - Metabolismo do glicerol.



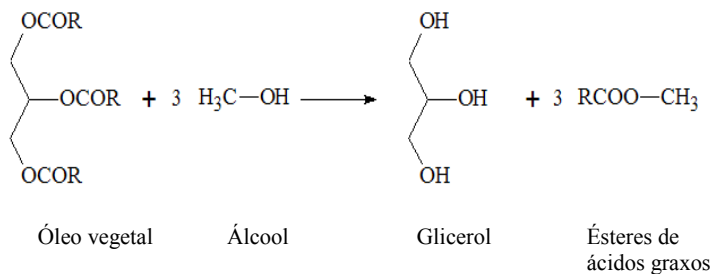
Fonte: Lehninger; Nelson; Cox, (1995)

## 2.2.2 Obtenção do Glicerol Comercial

Coproduto natural do processamento de óleos e gorduras, o glicerol pode ser obtido mediante reação de saponificação de ácidos graxos (óleos, gorduras, azeites ou sebo) com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, como produto da síntese de propeno com a formação de cloreto de alila, como coproduto da fabricação de biodiesel e em menor proporção, mediante síntese microbiana (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A produção sintética de glicerol a partir de cloreto de alila via epiclorigrina encontra-se em declínio devido ao excesso no mercado de glicerol do processo de biodiesel (BEATRIZ; ARAÚJO; de LIMA, 2011). Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior coproduto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisador (KOH ou NaOH) (DIECKELMANN; HEINZ, 1988). A Figura 2.4 mostra a reação de transesterificação para a produção de glicerol.

**Figura 2.4** - Reação global de transesterificação para a produção de glicerol.



Fonte: Adaptado de Alvarenga e Soares, (2010).

### 2.2.3 Aplicações do Glicerol

Devido à combinação de propriedades físico-químicas como não toxicidade, ausência de cor e odor, o glicerol é uma substância com ampla variedade de aplicações, nesse sentido observa-se um grande número de processos industriais no qual o glicerol vem sendo utilizado como na indústria alimentícia, farmacêutica, química e têxtil (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O glicerol, desde 1959, é reconhecido como substância atóxica, permitido como aditivo em alimentos, e também considerado como substância *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução de nº 386, de 5 de Agosto de 1999 (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O glicerol é uma das mais versáteis e valiosas substâncias químicas conhecidas. Frequentemente, recebe o nome de glicerina que se refere ao produto na sua forma comercial, com pureza acima de 95% (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A glicerina purificada *United States Pharmacopeia* (grau USP) apresenta no mínimo 99 % de glicerol e tem grande aplicação nos setores de cosméticos, higiene pessoal, alimentos, medicamentos e fumo. Em termos de transformação química ela ainda apresenta aplicações limitadas, sendo as principais na produção de explosivos, como a nitroglicerina, e na formação de resinas alquídicas (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; OPPE; SALVAGNINI; TAQUEDA, 2007).

Na indústria de alimentos a glicerina é utilizada como aditivo alimentar em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes (BEATRIZ; ARAÚJO; de LIMA, 2011).

Como produto farmacêutico sua aplicação se deve à sua alta viscosidade, o que permite sua utilização em xaropes. Também, é considerada como um agente crioprotetor em microrganismos, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2007).

O glicerol é uma matéria-prima barata e muito versátil, constituindo-se em uma alternativa real e viável para gerar substâncias que possam atuar como precursores de produtos industriais de alto valor agregado (BEATRIZ; ARAÚJO; DE LIMA, 2011).

No que diz respeito à conversão do glicerol através de processos catalíticos, cabe mencionar a possibilidade de sua utilização como substrato para a produção de mono e diacilgliceróis, biomoléculas de alto valor agregado, amplamente utilizadas como emulsificantes em diversas indústrias, especialmente alimentícia (YANG et al., 2005; CORREIA; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2011).

## 2.3 ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras podem ser encontrados em células de origem animal, vegetal ou microbiana. São os maiores componentes do tecido adiposo, e juntamente com as proteínas e carboidratos, constituem os principais componentes estruturais de todas as células vivas. Também

são classificados como ésteres de ácidos carboxílicos com o glicerol, denominados triglicerídios (TAGs) ou triacilgliceróis, substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos. A natureza física destes compostos é definida pelo comprimento da cadeia, pelo grau de insaturação e pela distribuição dos radicais (KRÜGER et al., 2010; RAMALHO; SUAREZ, 2013).

As gorduras exercem funções nutricionais importantes, suprimindo calorias (9 kcal/g) e ácidos graxos essenciais (como o linoleico, linolênico e araquidônico), além do transporte de vitaminas lipossolúveis (como A, D, E e K) e hormônios lipossolúveis para o interior das células. São responsáveis pelo isolamento térmico e permeabilidade das paredes celulares; contribuem para o sabor e a palatabilidade dos alimentos e também para a sensação de saciedade após a alimentação (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007; CASTRO et al., 2004; SILVA; GIOIELLI, 2009).

O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 25 °C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo desta temperatura (BRASIL, 2005).

Os TAGs são a forma de lipídios mais abundantes na natureza e os principais combustíveis da maioria dos organismos, consistem em uma forma altamente eficiente de armazenamento de energia metabólica, pois são menos oxidados que os carboidratos e as proteínas e também não absorvem muita água, por sua condição apolar (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Nos alimentos, os TAGs são passíveis de diversas alterações químicas durante o processamento, o armazenamento e o consumo do alimento, gerando substâncias desejáveis ou não ao *flavor* (ARAÚJO, 2011).

Os TAGs são ésteres do glicerol que contêm três ácidos graxos, cada ácido graxo pode conter diferentes números de átomos de carbono e diferentes graus de insaturação. A existência de vários tipos de ácidos graxos e a possibilidade de serem alocados em diferentes posições na estrutura do glicerol significa que pode haver um grande número de moléculas possíveis de triacilglicerol no alimento (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; RAMALHO; SUAREZ, 2013).



### 2.3.1 Ácidos Graxos

São as unidades fundamentais da maioria dos lipídios. Os ácidos graxos são ácidos orgânicos de cadeia longa, possuindo de 4 a 24 átomos de carbono; eles possuem um grupo terminal, característico de ácidos orgânicos, denominado de grupo carboxila e uma longa “cauda” hidrocarbonada não-polar, o que confere à maioria dos lipídios a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água. Os ácidos graxos livres ocorrem em quantidades pequenas nos óleos e gorduras. A maioria encontra-se nas formas covalentemente ligadas a diferentes classes de lipídios, a partir dos quais eles podem ser liberados por hidrólise química ou enzimática (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Os ácidos graxos presentes nos lipídios são normalmente compostos alifáticos, os quais podem ser saturados ou insaturados e, em alguns casos de cadeia ramificada, participam da construção das moléculas de glicerídios e de certos não glicerídios, representando até 96 % da massa total das moléculas, o que contribui de maneira muito importante para as propriedades físico-químicas dos diferentes óleos e gorduras (RIBEIRO et al., 2007).

Quanto maior o grau de insaturação do óleo maior a propensão à formação de peróxidos. Esta oxidação é responsável pelo aparecimento de alguns sabores e odores desagradáveis (rancificação) nos alimentos, tornando suas características sensoriais rejeitáveis pelos consumidores, além de danificar a qualidade nutricional pode produzir substâncias tóxicas, podendo ser considerada como um fator antinutricional das gorduras (ADAMS, 1999; MALACRIDA, 2003; ARAÚJO, 2010).

Dado o nível de insaturação dos seus ácidos graxos, os óleos de peixes são muito susceptíveis a processos oxidativos, que comprometem a integridade das duplas ligações, a concentração e a funcionalidade dos ácidos graxos EPA e DHA, além de colocarem em risco a saúde humana (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998; PACHECO; REGITANO-D'ARCE, 2009).

As gorduras em geral são compostas de três ácidos graxos (AG) ligados a uma molécula de glicerol por pontes de ésteres (triglicerídeos). Os AGL são produzidos quando esses triglicerídeos são hidrolisados. Portanto, a presença de AGL indica que a gordura foi exposta a água, ácidos e (ou) enzimas. As gorduras devem ser produzidas com a presença do mínimo de H<sub>2</sub>O de modo que na estocagem, não ocorra hidrólise (BELLAVAR; ZANOTTO, 2003).

A rancidez quase sempre é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres, o Instituto Adolfo Lutz (1985, p. 595) elenca que, a determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício.

Os ácidos graxos podem apresentar uma ou mais insaturações, sendo separados em monoinsaturados e poli-insaturados, e, ainda, duas configurações possíveis, *cis* ou *trans*, dependendo da posição dos grupos alquila. Embora a maioria das fontes naturais de gorduras insaturadas ocorra na configuração *cis*, ácidos graxos *trans* também são observados em alimentos (ARAÚJO, 2011).

Considerar apenas a estrutura dos ácidos graxos não explica satisfatoriamente o impacto dos lipídios da dieta na composição lipídica do sangue, uma vez que a posição dos ácidos graxos nos TAGs também tem influência nos níveis de lipídios plasmáticos. A estereoespecificidade e o comprimento de cadeia dos ácidos graxos nas posições *sn-1*, *sn-2* e *sn-3* dos TAGs determinam o desempenho metabólico da gordura durante a digestão e absorção, sendo que há substancial conservação nos quilomicrons após a digestão dos ácidos graxos presentes na posição *sn-2* dos TAGs ingeridos, bem como da estrutura estereoespecífica dos TAGs (SILVA; GIOIELLI, 2009).

### 2.3.2 Ácidos Graxos Essenciais

A importância dos ácidos graxos essenciais na dieta humana foi assunto de grande interesse nas décadas passadas (MIRANDA et al., 2013). São chamados de “essenciais”, pois são ácidos graxos que desempenham importantes funções e não podem ser sintetizados pelo organismo por meio de precursores e sua carência pode acarretar sérias deficiências orgânicas, como problemas dermatológicos, neurológicos e visuais (HASLER, 1998).

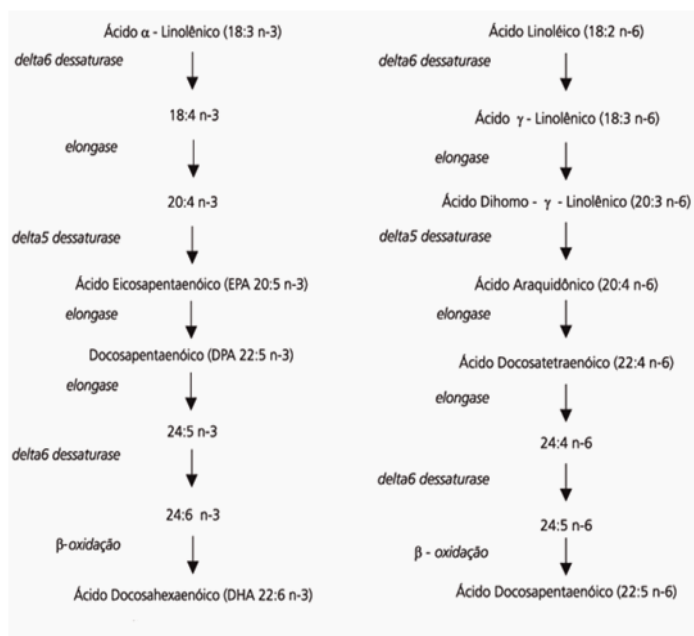
Estes ácidos que contém duas ou mais insaturações são chamados poli-insaturados e são representados por símbolos numéricos, como C18:2 (9,12) que representa o ácido linoleico e o C18:3 (9,12,15), o ácido  $\alpha$ -linolênico. Estes ácidos graxos essenciais devem ser fornecidos através da dieta, pois são sintetizados apenas por vegetais (CARVALHO et al., 2003; LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Os ácidos graxos essenciais estão divididos em dois grupos: os da família ômega-3 (ácido linolênico) e ômega-6 (ácido linoléico). Eles possuem funções indispensáveis ao metabolismo (LEHNINGER;

NELSON; COX, 1995). A partir destes ácidos graxos são sintetizados outros ácidos poli-insaturados de importância fundamental para o organismo, onde podemos destacar os ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3)(MIRANDA et al., 2013), presente em grande quantidade no óleo de Savelha, utilizado no presente estudo (FELTES, 2011).

Os processos de elongação e dessaturação do ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico originam diversos metabólitos, como representado na Figura 2.5.

**Figura 2.5** - Representação do metabolismo dos ácidos graxos essenciais.



Fonte: Carvalho et al. (2003).

Os produtos do metabolismo (elongação e dessaturação) dos ácidos graxos essenciais serão sempre da mesma família desses substratos. Portanto, os ácidos EPA e DHA, são produtos do metabolismo do ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3, n-3), assim como o ácido araquidônico (C20:4, n-6) é o produto do metabolismo do ácido

linoleico (18:2 n-6) (FREITAS et al., 2007; TORRES; LIN; HILL, 2002).

Os ácidos graxos essenciais são utilizados na formação dos ácidos graxos eicosanoicos, que dão origem aos eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas.

As prostaglandinas intercedem na inflamação, na dor e induzem o sono, regulando também a coagulação do sangue e a reprodução. São responsáveis por importantes funções fisiológicas, como, por exemplo, contração do útero, controle de pressão sanguínea e secreção das paredes do estômago.

Os leucotrienos têm propriedades ligadas à contração muscular e à quimiotaxia, sendo importantes nas reações alérgicas e na inflamação (MURRAY et al., 2007).

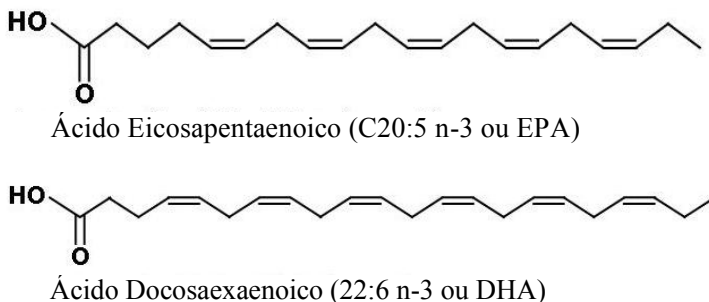
A ingestão mínima diária recomendada dos ácidos graxos essenciais é de 2 % do total de quilocalorias na forma de ácido linoleico e 0,5 % na forma de ácido linolênico (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Dentre os produtos do metabolismo dos ácidos graxos podemos destacar os ácidos graxos EPA e DHA pelos vários efeitos benéficos que incluem a redução de riscos de doenças cardiovasculares, através da redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol sanguíneo, aumentando a fluidez sanguínea e reduzindo a pressão arterial (MACHADO; SANTIAGO, 2001; TORRES; LIN; HILL, 2002). Também atuam na prevenção de doenças, por apresentar efeitos anti-inflamatórios (artrite) e a redução de certos tipos de câncer (ARAÚJO, 2011; SHIMADA et al., 2001).

O uso do DHA também tem sido relatado por ter funções importantes no cérebro e retina, e para acelerar o crescimento de prematuros, atuando no sistema nervoso central de lactentes. Por estes motivos o óleo do atum, que contém DHA, tem sido utilizado como um alimento saudável. Além disso, o benefício das atividades fisiológicas de DHA tem levado a um crescente interesse em função de suas aplicações medicinais (SHIMADA et al., 2001; MEDINA et al., 1999).

Após vários estudos, está bem estabelecido que os AGPIs, especialmente os ácidos eicosapentaenoico (EPA), o docosahexaenoico (DHA) e o araquidônico (AA), são benéficos para a saúde (MEDINA et al., 1999). Na Figura 2.6 pode-se observar a estrutura química dos ácidos graxos EPA e DHA.

**Figura 2.6** - Estrutura química dos ácidos graxos EPA e DHA.



Fonte: Araújo (2011).

Segundo Schmidt (2000), o baixo consumo de ácidos graxos ômega 3, em especial do DHA, pode levar ao desequilíbrio de ácidos graxos, sendo assim, o cerne de muitos distúrbios cerebrais, as gorduras e os óleos afetam a estrutura, função e desempenho cerebrais, que estão relacionados diretamente com humor e comportamento, aprendizagem e memória, movimentos e sensações.

## 2.4 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR BIOTRANSFORMAÇÃO

Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos relacionados ao comprimento da cadeia, insaturação e distribuição estereoespecífica no metabolismo, há um crescente interesse em usar óleos e gorduras para a redução do risco de doenças, bem como para a melhoria da saúde (SILVA; GIOIELLI, 2009). Vários estudos têm sido realizados no intuito de buscar novas tecnologias (preferencialmente tecnologias limpas) para a modificação de óleos e gorduras, com o objetivo de obter alimentos com propriedades funcionais e que possam ser produzidos em escala industrial (TORRES; LIN; HILL, 2002).

A estrutura básica de óleos e gorduras pode ser redesenhada, por meio da modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triacilglicerol (interesterificação) (CASTRO et al., 2004). Produtos podem ser obtidos com o propósito de melhorar ou modificar as características físicas (ponto de fusão, viscosidade e

consistência) e químicas (estabilidade oxidativa) dos lipídios, bem como, para modificar propriedades nutricionais; ou características favoráveis quanto à resposta imune, síntese de eicosanoides e ação anti-inflamatória (SILVA; GIOIELLI, 2009).

A interesterificação consiste em alternativa tecnológica ao processo de hidrogenação parcial, uma vez que viabiliza a produção de óleos e gorduras com funcionalidades específicas (COSTA; AMORIM, 1999). Na reação de interesterificação os ácidos graxos permanecem inalterados, mas ocorre a redistribuição dos mesmos nas moléculas dos TAGs, resultando na modificação da composição triacilglicéridica, cuja característica final é totalmente determinada pela composição total em ácidos graxos das matérias-primas iniciais. O processo consiste, portanto, em quebra simultânea de ligações éster existentes e formação de novas ligações nas moléculas glicéridicas (RIBEIRO et al., 2007).

Na fabricação de margarinas e shortenings a interesterificação tem sido utilizada, em virtude da preocupação com as gorduras parcialmente hidrogenadas que contêm ácidos graxos *trans*, que estão associados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (SILVA; GIOIELLI, 2009).

Os processos biotecnológicos oferecem diversas vantagens e se mostram como uma alternativa competitiva aos métodos químicos devido à alta eficiência catalítica, condições operacionais brandas e à seletividade dos catalisadores naturais (ARAGÃO et al., 2009; PIRES-CABRAL; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009).

As reações de glicerólise mediadas por lipases têm sido objeto de muitos estudos, devido às diversas vantagens da catálise enzimática frente à catálise química. Os produtos obtidos por biocatálise têm aplicação potencial nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica (FERNANDEZ- LAFUENTE, 2010; VALÉRIO et al., 2009a; KRÜGER et al., 2010; FELTES et al., 2012).

## 2.5 ÓLEO DE PEIXE

Os AGPIs, especialmente os da série ômega-3, são essenciais na nutrição humana, uma vez que eles desempenham um papel importante no organismo e ajudam a prevenir diversas doenças. A carne e o óleo de fígado de peixes, principalmente peixes de água fria como o salmão, arenque, cavala, anchova e sardinha, têm sido a fonte tradicional para a obtenção de ácidos graxos ômega-3 principalmente o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) (RUBIO-RODRIGUEZ et al., 2010).

O teor de óleo e gordura em peixe é muito variável, sendo também influenciado pelo tipo, pela idade, pela estação do ano e pela disponibilidade de alimentação. Tipicamente, contém grande quantidade de AGPIs de cadeia longa o que os torna muito mais sensíveis à oxidação. A composição de ácidos graxos de alguns peixes de água doce e salgada é mostrada na Tabela 2.2.

Estudos epidemiológicos correlacionam a baixa incidência de doenças cardiovasculares com o consumo de AGPIs provenientes de pescados marinhos. Os efeitos têm sido mais evidentes em populações cujas dietas têm baixo teor de gordura, apresentando baixa incidência de problemas cardíacos. Cabe destacar que os casos de esclerose múltipla são raros em áreas litorâneas, onde há consumo de pescado. Os esquimós, com sua alimentação baseada em peixes e produtos do mar ricos em ômega 3 e 6, têm baixo índice de problemas cardíacos. Além disso, a literatura traz inúmeros trabalhos que relatam a importância do EPA e do DHA na prevenção e tratamento de doenças como hipertensão, câncer, artrite e outras desordens inflamatórias e autoimunes (PADILHA; AUGUSTO-RUIZ, 2007; ANJO, 2004).

O efeito benéfico dos AGPIs tem sido atribuído à diminuição da concentração dos TAGs séricos, à diminuição do colesterol, à redução da trombose, ao aumento da fluidez da membrana celular e de facilitar sua excreção e conversão em eicosanoides (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1997).

Dietas ricas em peixes podem suprir as necessidades de ácidos graxos essenciais. A tendência da indústria alimentícia está em tentar, além da redução da gordura e colesterol total, acrescentar os componentes EPA e DHA aos alimentos (ANJO, 2004).

A concentração de ácidos graxos ômega-3 influencia a de ômega-6 e, portanto, é necessário equilibrar a proporção desses ácidos graxos na dieta. É desejável uma relação ômega-6/ômega-3 de ácidos graxos de 5:1 ou menor, como sugeridas por especialistas em nutrição.

(OMS/FAO, 1994). No entanto, os hábitos alimentares da sociedade ocidental são caracterizados por um elevado consumo de carne, óleos de sementes, *fast food* (pizzas, hambúrgueres) e lanches (bolos, biscoitos), que contém uma grande quantidade de gorduras saturadas e uma baixa proporção de AGPIs (FERNÁNDEZ-SAN JUAN, 2000).

**Tabela 2.2** - Composição aproximada (%) dos principais ácidos graxos em alguns peixes de água doce e salgada.

Espécie	C14:0	C16:0	C16:1	C18:1	C20:1	C22:1	C20:5 (EPA)	C22:6 (DHA)
Arenque	6,4	12,7	9	12,7	14	21	8,4	5
Bacalhau	1,5	20	3,5	4	3	1	17	30
Linguado	4,3	16,5	14,5	12	4	-	12	7
Sardinha	6	10	13	24	3,2	14	17	13
Salmão	6,3	19,2	6,2	17,3	3,3	6,6	8,2	2,5
Camarão	2	16	6	19	2,4	1,6	22	6
Lagosta	1	11,6	5,5	18	3	2	26	12
Carpa	3	17	17	28,3	4	-	3,2	-
Truta	2,7	21	4	18,4	-	-	5,8	7
Bagre	1	15,2	3	30	1	-	-	0,6
<b>Savelha</b>	<b>9</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>1</b>	<b>0,2</b>	<b>14</b>	<b>8</b>

Abreviaturas dos ácidos graxos: C14:0 - Mirístico, C16:0 - Palmítico, C16:1 - Estéarico, C18:0 - Estéarico, C18:1 - Oléico, C18:2 - Linoléico, C18:3 - Linolênico, C20:5 - Eicosapentaenóico (EPA), C22:5 - Docosapentaenóico (DPA), C22:6 - Docosahexaenóico (DHA). Fonte: Adaptado de Firestone (1999) e Araújo (2011).



Pesquisas concluíram que uma relação de ômega-6/ômega-3 no sangue, em pessoas que consomem comidas típicas japonesas ou comida mediterrânea, está perto de 2:1, enquanto que em pessoas que consomem *fast food*, essa relação pode atingir valores que estão entre 10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1, muito superior ao desejado (SIMOPOULOS, 2004). Por esse motivo, os nutricionistas aconselham a necessidade de consumir peixe e verduras para prevenir muitas doenças, principalmente doenças cardiovasculares. No entanto, a mudança dos hábitos alimentares de toda uma sociedade é muito difícil. Nesse sentido, muitos produtos enriquecidos com ômega-3, como suplementos nutricionais ou alimentos funcionais, têm sido desenvolvidos para complementar a dieta e alcançar uma boa relação ômega 6/ômega 3 no sangue sem alterar a dieta habitual (RUBIO-RODRIGUEZ et al., 2010).

A produção de alimentos funcionais enriquecidos com ácidos graxos ômega-3, tem apresentado um grande incremento, principalmente na Europa e nos E.U.A. Existe no mercado uma grande variedade de alimentos industrializados enriquecidos com ômega-3, como pão e produtos de panificação, leite e derivados, ovos, sucos e refrigerantes, carnes e produtos avícolas (MARTIN et al., 2006).

Na maioria dos casos, o óleo de peixe é a fonte natural de ácidos graxos ômega-3 a ser incorporada em produtos alimentares convencionais, seguindo diferentes estratégias para evitar alterações importantes na qualidade sensorial dos produtos e evitar a oxidação a que os AGPIs são propensos (STEVANATO et al., 2007). Desta forma, a construção de MAGs e DAGs contendo EPA e DHA poderá ser utilizada para suprir os ácidos graxos essenciais, com seus respectivos efeitos fisiológicos (FELTES et al., 2012).

## 2.6 LIPASES COMO CATALISADORES

As lipases são classificadas como glicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), que catalisam a hidrólise reversível dos TAGs. As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Além de quebrar as ligações éster de TAGs com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas como, por exemplo, a formação de ligação éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (ARAGÃO et al., 2009).

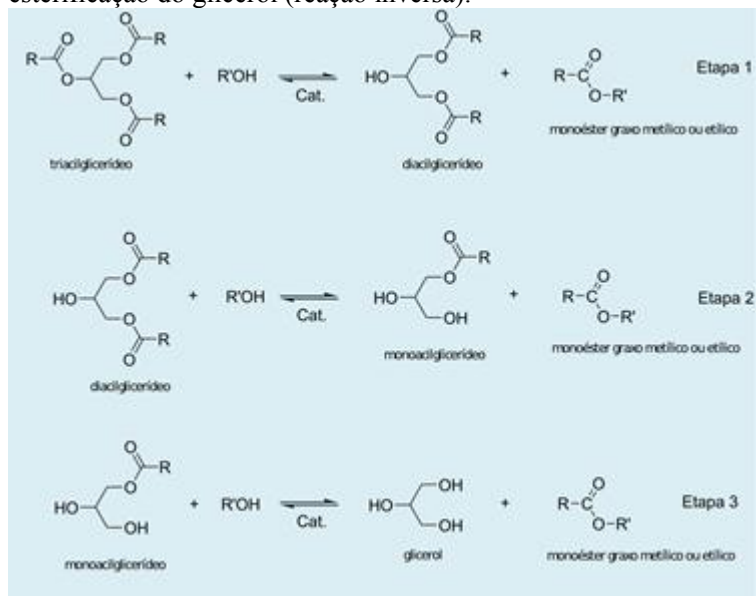
Os processos enzimáticos para modificação de lipídeos permitem três tipos principais de reações reversíveis: hidrólise, síntese de ésteres e interesterificação enzimática. A reação de interesterificação enzimática

(genericamente refere-se à troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou ainda de um éster e outro éster, na forma de glicerídeos (transesterificação), com ou sem a presença de solventes orgânicos, em sistemas bifásicos e em suspensões micelares (VILLENEUVE et al., 2000).

O equilíbrio entre a reação direta (hidrólise) e a inversa é controlado pela atividade de água da mistura reacional. Quando o excesso de água está presente, a hidrólise é predominante, resultando em acúmulo de glicerol, ácidos graxos livres, MAG e DAG (PANDEY et al., 1999). As razões do grande potencial biotecnológico desse grupo de enzimas incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofatores, possuem uma larga especificidade pelo substrato e exibem uma alta enantiosseletividade (ARAGÃO et al., 2009; CASTRO et al., 2004).

Na Figura 2.7 estão representados as reações de hidrólise e esterificação catalisadas pelas lipases.

**Figura 2.7** - Esquema das reações de hidrólise (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa).



Fonte: Meneghetti; Meneghetti; Brito, (2013).

A enantiosseletividade, apresentada pelas lipases se deve à capacidade desta enzima em reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero do produto em relação ao outro (FABER, 2000).

Estudos realizados demonstraram a existência de duas conformações principais na maioria das enzimas, denominada forma fechada (inativa) e forma aberta (ativa). Na conformação fechada, o sítio ativo está totalmente oculto sob um curto segmento helicóide (corrente de polipeptídeos), formado por um ou mais *loops*, denominado tampa (*lid*) ou aba (*flap*), que recobre o sítio ativo isolando este do meio (COSTA; AMORIM, 1999).

Na presença de um composto hidrofóbico, como o óleo, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato (forma aberta). Neste movimento, o lado hidrofóbico da tampa fica totalmente exposto, expandindo consideravelmente a superfície não polar do sítio ativo. Este mecanismo de ação é geralmente chamado de ativação interfacial das lipases, e estas drásticas mudanças conformacionais nos biocatalisadores devem ser consideradas em sua utilização (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Estas enzimas apresentam massa molecular entre 20-70 KDa com cerca de 199-641 resíduos de aminoácidos, atividade em pH na faixa entre 4 e 9 em temperaturas variando desde a ambiente até 70 °C.

Lipases são glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente, sendo a principal forma de obtenção destas enzimas, pois este processo consiste num procedimento mais simples de isolamento a partir do caldo fermentado, com maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido. Geralmente, são mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes, além de disso, são em sua maioria, extracelulares, favorecendo sua extração, isolamento e purificação (BABICZ et al, 2010).

Com um mercado crescente e promissor, as lipases podem ser aplicadas em inúmeras áreas, dentre elas pode-se citar a indústria oleoquímica em processos de hidrólise, glicerólise e alcoólise, na produção de AGPIs (aditivos em alimentos), na indústria têxtil (melhoria da qualidade e propriedade dos tecidos), na indústria de detergentes (remoção de manchas de batom, frituras, manteiga, azeites e molhos), na modificação de sabores (fermentação de salame e queijo), na indústria de aromas, na biorremediação, na produção de biodiesel, no tratamento de resíduos industriais, entre outras (ARAGÃO et al, 2009).

Recentes avanços registrados na tecnologia do DNA têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com atividade bem elevada, a um custo bem mais acessível. Atualmente, lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras (CASTRO et al., 2004; MIRANDA et al., 2013).

Embora a maioria das sínteses enzimáticas seja realizada na presença de solventes orgânicos não-polares, a eliminação destes compostos é tecnicamente viável e oferece significativa economia. Além disso, as reações realizadas em sistemas sem solventes têm várias vantagens, tais como produtividade volumétrica mais elevada quando comparada as reações na presença de solventes orgânicos e a possibilidade de que os substratos restantes possam ser facilmente separados dos produtos e prontamente reciclados. Além disso, a ausência de solventes geralmente torna os processos ambientalmente mais sustentáveis, uma vez que os solventes são tóxicos e agentes poluentes (FREITAS et al., 2007).

Visando a obtenção de reações com maior uniformidade tecnológica e viabilidade econômica, a utilização de enzimas na forma imobilizada permite considerável aumento na estabilidade e maior diversidade de aplicação, de fundamental importância para o desenvolvimento de processos associados à bioconversão. A utilização de enzimas imobilizadas confere maior produtividade, facilidade na automação de processos e operações contínuas, controle preciso da extensão das reações, facilidade de separação dos produtos obtidos, estabilização da atividade enzimática, facilidade de recuperação e reutilização das enzimas (VILLENEUVE et al., 2000; PRADO et al., 2009). Além disto, a rota enzimática é considerada mais limpa ambientalmente do que a rota química, sem agredir o meio ambiente, permite o desenvolvimento de produtos com características nutricionais superiores e/ou de aplicação terapêutica específica, os quais representam um desafio tecnológico e uma nova fronteira de pesquisa (CAMPOS, 2010).

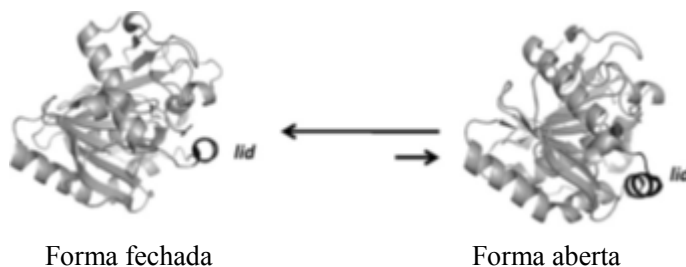
## 2.7 LIPOZYME<sup>®</sup> TL IM

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *lanuginosa Humicola*) é uma enzima termoestável, disponível comercialmente tanto na forma solúvel como na forma imobilizada. Embora suas aplicações inicialmente tenham sido orientadas para a indústria de alimentos, esta

enzima tem encontrado aplicação em diferentes áreas industriais, desde a produção de biodiesel à química fina, principalmente em enantio e regioselectividade ou processos específicos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, comercializada pela Novozymes, é produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* em fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado. É uma proteína de cadeia simples constituída por 269 resíduos de aminoácidos. A sua massa molecular é de 31.700 g/mol e seu ponto isoelétrico é 4,4. A estrutura da Lipozyme TL foi definida em 1,8 Å. Possui forma esférica com dimensões aproximadamente de 35 Å × 45 Å × 50 Å, e contém oito cadeias centrais, predominantemente de estruturas folhas β-pregueadas interligadas com cinco α-hélices. Composta por uma alça móvel na superfície na estrutura α-helicoidal e consiste de 86-93 resíduos de aminoácidos que cobrem o sítio ativo hidrofóbico (DEREWENDA et al, 1994). O sítio ativo é formado pela típica tríade catalítica de aminoácidos, Ser-His-Asp. Esta enzima apresenta uma estrutura tridimensional estabilizada por três ligações dissulfeto e contém quatro triptofanos, um dos quais (Trp89), está localizado na alça e tem se mostrado importante na eficiência da hidrólise (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A Figura 2.8 mostra a estrutura da Lipozyme TL IM.

**Figura 2.8** - Estrutura das formas fechada e aberta da Lipozyme TL.



A estrutura em 3D foi obtida a partir da Protein Data Bank (PDB), utilizando Pymol vs 0,99.  
Fonte: Fernandez-Lafuente, 2010.

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica,

também chamada comercialmente de Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, é uma lipase sn-1,3-específica. Esta lipase vem ganhando destaque na indústria de alimentos, principalmente em pesquisas com lipídeos, devido a sua preferência por hidrolisar triacilgliceróis de cadeias médias (C10-C12), sua alta estabilidade térmica, mantendo atividade entre 55 e 60 °C e máxima atividade em pH em torno de 9 (FERNANDES et al., 2004).

A utilização de detergentes também pode estabilizar a forma aberta da lipase, isso explica o aumento da atividade da Lipozyme<sup>®</sup> TL IM na presença de concentrações moderadas de detergentes (JUTILA et al., 2000), devido a estas características, esta enzima tem encontrado importantes aplicações na indústria como detergente em pó para lavar roupas, facilitando a remoção de manchas de gordura (DARIO, 2006).

A Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, tem sido amplamente utilizada na preparação de lipídios estruturados, como relatado por de Yang et al. (2003), que utilizaram esta enzima para interesterificar o tripalmitoilglicerol com ácido caprílico e óleo de girassol, visando produzir lipídio estruturado semelhante ao lipídio do leite humano. As melhores incorporações de ácido palmítico (42%) foram obtidas com a adição de 20 % de enzima em 20 h de reação a 40 °C.

Sahin, Akoh e Karaali (2005), interesterificaram tripalmitoilglicerol com uma mistura de ácidos graxos de óleo de avelãs e óleo de borage rico em GLA (gama-linolênico), na expectativa de obter lipídio a ser utilizado como sucedâneo da gordura do leite humano. Foram utilizados como biocatalisadores as lipases comerciais Lipozyme<sup>®</sup> RM IM (10%) e Lipozyme<sup>®</sup> TL IM (6%), e para o modelo estudado as melhores condições foram: 14,8 mol/mol (ácidos graxos/tripalmitoilglicerol) e a reação durante 24 h a 55 °C. O efeito da incorporação do GLA e do ácido oleico foi semelhante para ambas as enzimas. Os lipídios estruturados produzidos com a Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM continham 74,9 e 73,0% de ácido palmítico, respectivamente, sendo que foi esterificado principalmente na posição sn-2.

Um estudo termodinâmico da Lipozyme TL IM foi realizado por Khor et al. (2010), através da produção de biodiesel por transesterificação enzimática de óleo de palma bruto, em presença de solvente (metanol e *tert*-butanol), utilizando 6,65 % de enzima, onde obteve uma temperatura ótima de reação em 40 °C, com rendimento de

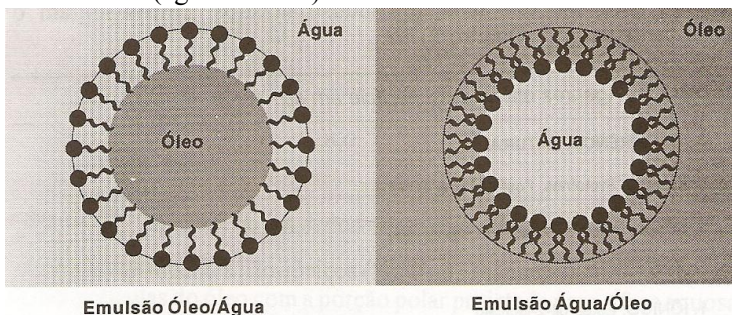
83,2 % de ácidos graxos poli-insaturados.

## 2.8 EMULSÕES

Uma emulsão é composta de óleo, água, emulsificante e energia (geralmente energia mecânica). A energia é necessária para deformar e romper os glóbulos, pela agitação intensa. Industrialmente utiliza-se homogeneizador de alta pressão para se produzirem gotículas de 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e o emulsificante é então transportado para a nova interface por convecção. Fisico-quimicamente, a formação de uma microemulsão é um pouco diferente das emulsões, pois, além desses sistemas serem transparentes e termodinamicamente estáveis, apresentam um tamanho de gotículas nanométrico (DAMASCENO et al., 2011).

Para se obter estabilidade física, as emulsões e microemulsões requerem a adição de emulsificantes, que são moléculas ativas de superfície com propriedades anfífilas (interage com a interface do óleo e da água, reduzindo a tensão superficial). Entretanto os emulsificantes são capazes de interagir com outros componentes dos alimentos; portanto, a escolha é muito significativa para a estabilidade física e oxidativa da emulsão (ARAÚJO, 2011). A emulsão pode ser de óleo em água (micela normal), se as gotículas de óleo estão dispersas na fase aquosa, é denominada emulsão do tipo óleo/água (O/A). Quando, ao contrário, as gotículas de água estão dispersas na fase oleosa (micela inversa), tem-se a emulsão do tipo água/óleo (A/O), como é demonstrado na Figura 2.9.

**Figura 2.9** - Representação de uma micela normal (óleo em água) e de uma micela inversa (água em óleo).



Fonte: Araújo (2011).

## 2.9 SURFACTANTES

Os agentes emulsificantes ou surfactantes são moléculas ativas que aderem à superfície das gotículas formadas durante a homogeneização e constituem, assim, uma membrana protetora que impede que as gotículas se aproximem o suficiente, evitando a agregação (CORREIA et al., 2011).

Os surfactantes ou tensoativos são compostos que adicionados em pequenas quantidades têm a capacidade de diminuir apreciavelmente a tensão superficial da água. Essa propriedade se deve ao fato de que suas moléculas são formadas por um grupo polar hidrofílico e um grupo apolar. As moléculas não polares tendem a se localizar na fase oleosa; as polares, na fase aquosa; e as anfífilas, na interface. As moléculas podem se mover de uma região para outra quando ocorre alguma alteração nas condições em que se encontra (alteração na temperatura ou diluição). Sua classificação é determinada em função das características de seu grupo polar em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

De acordo com a legislação vigente (Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997 da ANVISA), emulsionante/emulsificante é a substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento. Estabilizante é a substância que torna possível a manutenção de uma dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento. Portanto, todo emulsificante é um estabilizante, mas nem todo estabilizante é um emulsificante (BRASIL, 1997; BARROS et al., 2007).

As micelas são agregados moleculares, de tamanho coloidal, em equilíbrio com as moléculas de monômeros das quais são formadas. Em soluções aquosas os monômeros de tensoativos orientam-se preferencialmente na interface, de modo que as cabeças polares estejam direcionadas para a solução e as caudas apolares orientadas para o ar, reduzindo a tensão superficial (SANTOS, 2007). À medida que se eleva a concentração de tensoativo no diluente, ocorre a saturação da interface permitindo que os monômeros iniciem a formação espontânea das micelas, as quais se encontram em permanente equilíbrio dinâmico com os monômeros. A concentração em que ocorre a micelização, numa dada temperatura, é denominada concentração micelar crítica, ou simplesmente CMC, que é uma característica de cada tensoativo (FERNANDES, 2005).



O Balanço Hidrofílico-Lipofílico (BHL) é uma propriedade característica de cada tensoativo. Ele foi introduzido por Griffin (1949) para selecionar o tensoativo adequado para determinadas aplicações, tais como: flotação, emulsão, etc. Devido ao sistema desenvolvido por Griffin, a seleção de um tensoativo (ou mistura de tensoativos) mais adequado para cada tipo de emulsão, ou seja, água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) tornou-se mais simples e racional (FERNANDES, 2005). Originalmente, os valores de BHL seguiam uma escala de 0 a 20, onde os valores baixos indicavam que se tratava de um emulsificante muito mais solúvel em óleo do que em água, já os valores altos indicavam o contrário. Posteriormente essa escala foi ampliada para valores maiores que 20. Para cada tipo de emulsão é necessário um emulsificante com efeito específico, com determinados valores de BHL (SANTOS, 2007).

Um valor baixo de BHL indica que este produto é utilizado para estabilizar emulsões de água em óleo, já um valor relativamente alto de BHL indica que o produto estabiliza emulsões de óleo em água (SHINODA et al., 1991; DAMASCENO et al., 2011).

Neste trabalho foram utilizados os surfactantes Tweens 65, 80, 85 (sintéticos) e a lecitina (natural), estando os valores de BHL para estes surfactantes descritos na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** - Valores de BHL para os surfactantes utilizados.

Nome comercial	Designação Química	BHL
Tween 65	Triesteato de polioxietileno sorbitana	10,5
Tween 80	Mono-oleato de polioxietileno sorbitana	11,0
Tween 85	Trioleato de polioxietileno sorbitana	15,0
Lecitina	Lecitina	~ 8

Fonte: Araújo, 2011.

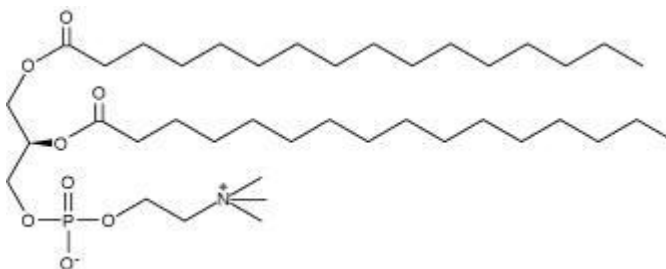
Para melhorar a emulsificação e outras qualidades desejáveis ao produto durante o processamento, o armazenamento e a distribuição de uma grande variedade de emulsificantes sintéticos é utilizada comercialmente. Os Tween utilizados são surfactantes não iônicos, são orientados na superfície das gotículas do óleo com a porção polar projetada para a fase aquosa. A coalescência (formação de gota de

diâmetro maior) das gotículas de uma emulsão água/óleo é prevenida pela formação de uma camada hidratada em volta dos grupos polares (BOBBIO; BOBBIO, 2003; LIMA; JUNIOR, 2010).

São ésteres de sorbitana, obtidos pela esterificação de ácidos graxos com o sorbitol desidratado. Os derivados do éster de sorbitana são preparados com a adição de óxido de etileno, em presença de catalisadores alcalinos. A introdução do polioxietileno faz com que as propriedades hidrofílicas dos ésteres sejam aumentadas. São utilizados para estabilizar emulsões do tipo O/A (ARAÚJO, 2001; BOBBIO; BOBBIO, 2003; FENNEMA, 2010).

A lecitina é um importante emulsificante natural. Tecnicamente, pode ser obtida a partir da gema de ovo e de diversas fontes de óleos vegetais. A fonte mais comum é a soja (2 a 3 %), em função da contínua disponibilidade. Durante o uso de lecitinas como surfactante, deve-se levar em consideração suas características: (1) alta propriedade lipofílica, devido as suas duas longas cadeias hidrocarbônicas; (2) alta propriedade hidrofílica, devido à cabeça polar “zwitteriônica”, a qual possui um momento dipolo e é bastante hidratada; (3) o balanceamento entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas, apesar da leve tendência lipofílica e (4) a potente tendência de formar cristais líquidos, notavelmente de estrutura lamelar (DAMASCENO et al, 2011; SHINODA et al., 1991). Na Figura 2.10 está representada a estrutura química da lecitina.

**Figura 2.10** - Estrutura química da lecitina.



Fonte: Araújo (2011).

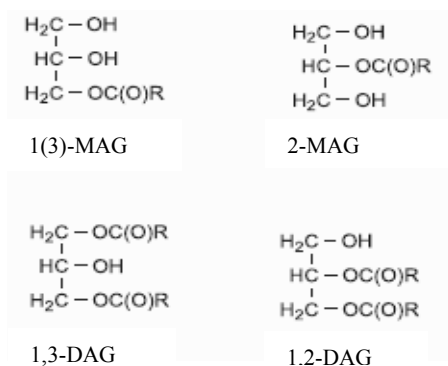
A eficiência de um emulsificante é determinada por várias características, como a quantidade mínima requerida para produzir

emulsão estável, sua habilidade para prevenir gotículas de se agregarem com o tempo, a velocidade na qual é adsorvida a superfície das gotículas durante a homogeneização, tensão superficial e espessura e elasticidade da membrana interfacial. Essas características dependem do alimento no qual o emulsificante está presente e das condições do meio (pH, força iônica, tipo de íon, tipo de óleo, interação de ingredientes, temperatura e agitação mecânica) (ARAÚJO, 2011; FENNEMA, 2010).

## 2.10 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS

Os monoacilgliceróis (MAGs) e os diacilgliceróis (DAGs) são mono e diésteres formados por ácidos graxos e glicerol. Os monoacilgliceróis podem existir em duas formas isoméricas diferentes, 1-MAG (isômero  $\alpha$ ) e 2-MAG (isômero  $\beta$ ). Os  $\alpha$ -isômeros puros rapidamente se convertem em uma mistura com  $\beta$ -isômeros de composição aproximada 90:10. Os DAGs podem conter ácidos graxos iguais ou diferentes, apresentam as formas isoméricas de 1,2-DAG (isômero  $\alpha, \beta$ ) e 1,3-DAG (isômero  $\alpha, \alpha'$ ), rapidamente formam uma mistura em equilíbrio sendo que o 1,3-DAG é a forma mais estável (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). As estruturas dos MAGs e DAGs estão representadas na Figura 2.11.

**Figura 2.11-** Estrutura química dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis.



Fonte: Freitas et al. (2008).

MAGs e DAGs representam 70 % dos emulsificantes utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como estabilizantes de emulsões) e

farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) (KRÜGER et al., 2010; KRISTENSEN; XU; MU, 2005).

Também são considerados surfactantes não iônicos, podendo ser utilizados como aditivos em alimentos para consumo humano, sendo reconhecidos como GRAS, são amplamente utilizados por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritação na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (FREITAS et al., 2008; WEBER; MUKHERJEE, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e as diretivas europeias, as misturas comerciais de MAG e DAG para uso alimentício (cujo código é E 471), devem conter 70 % de MAG e DAG, um mínimo de 30 % de MAG e um máximo de 7 % de glicerol (DAMSTRUP et al., 2005).

MAGs e DAGs, em especial 1,3-DAG, contendo EPA e DHA, podem ter efeitos positivos na saúde, por exemplo, na prevenção de doenças cardiovasculares e como mensageiros intracelulares, o que torna sua obtenção de especial interesse para aplicações farmacêuticas (FELTES et al., 2012). Além disso, eles atuam de maneira semelhante às gorduras frente aos ácidos, bases e enzimas lipolíticas. Do ponto de vista nutricional, podem ser considerados iguais às gorduras, já que fazem parte do ciclo metabólico natural. Sendo sua digestão completa, não se estabelecem restrições à sua ingestão (CAMPOS, 2010).

### 2.10.1 Diacilgliceróis (DAGs)

DAGs estão naturalmente presentes como componentes secundários em vários óleos e gorduras comestíveis, geralmente em torno de 5 %. São conhecidos como aditivos funcionais em alimentos, utilizados na medicina e na indústria de cosméticos, muitas vezes associados aos MAGs (WEBER; MUKHERJEE, 2004).

Produtos lipídicos contendo mais de 80 % de DAGs adicionados aos alimentos foram relacionados com diversos benefícios à saúde. No Japão, DAGs foram aprovados para a venda como um *Food for Specified Health Use* (FOSHU) (Alimento específico para uso em saúde). Os óleos comestíveis com DAG têm boa aceitação no mercado japonês, eles possuem propriedades como a redução do nível de lipídios pós-prandial, aumentando a  $\beta$ -oxidação das gorduras, prevenindo a obesidade (TAKASE, 2007; KRISTENSEN; XU; MU, 2005).

Segundo Tomonobu et al. (2006), as propriedades saudáveis dos óleos DAG estão baseadas em como eles são metabolizados. Como os

DAGs apresentam somente dois ácidos graxos ligados ao glicerol, os DAGs, (particularmente o *sn*-1,3-DAG) são metabolizados de forma diferente dos TAGs. A lipase pancreática, a qual é específica para a configuração 1,3, hidrolisa os DAGs em ácidos graxos livres (AGL) e 1(3)-MAG. Como este último dificilmente se re-esterifica em TAG, a formação de partículas ricas em gorduras (quilomicrons), que tem a tendência de obstruir os vasos capilares e depositar-se nos tecidos adiposos, é menor. Já os TAGs são hidrolisados em AGL e 2-MAG, o qual normalmente se re-esterifica em TAG e é liberado como partículas ricas em gorduras.

Ainda que o azeite DAG seja metabolizado de forma diferente dos TAGs, apresenta os mesmos valores de energia e coeficientes de absorção que o azeite convencional TAG, a diferença metabólica é que os TAGs são depositados como gordura e os DAGs são convertidos em energia (WEBER; MUKHERJEE, 2004).

Estudos em animais e humanos têm mostrado os benefícios do diacilglicerol para a saúde, embora o diacilglicerol tenha digestibilidade e valor energético similar ao triacilglicerol, ele tem a capacidade de diminuir o nível de lipídios pós-prandial. O consumo de DAGs também apresenta redução de peso corporal e da acumulação de gordura visceral abdominal (CHEONG et al., 2007).

### 2.10.2 Obtenção de DAGs

Normalmente, os MAGs e DAGs comerciais, são sintetizados via glicerólise de TAGs. Nesta reação cada mol de TAG usado como substrato pode gerar três moles de MAGs, na presença de excesso de glicerol, empregando catalisadores inorgânicos ( $\text{Ca(OH)}_2$ , NaOH) a altas temperaturas 220-250 °C, de preferência sob atmosfera inerte. A glicerólise comercial proporciona normalmente uma produção de MAG, DAG e TAG de 45-55, 38-45 e 8-12 %, respectivamente (FREITAS et al., 2008; FELTES et al., 2011). Este processo de produção apresenta algumas desvantagens como baixa produtividade, dificuldade de obtenção de produtos puros e o uso de altas temperaturas, que além de acarretar num alto consumo energético, pode ocasionar sabor e coloração indesejáveis pela degradação parcial dos produtos (SILVA; GIOIELLI, 2009; FIAMETTI et al., 2009; KRÜGER et al., 2010).

Além do mais, para a utilização na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, é necessária a purificação dos produtos da glicerólise química que muitas vezes apresentam resíduos tóxicos

devido às reações secundárias que ocorrem no processo. Este processo não é adequado para a produção de MAG e DAG contendo AGPIs, já que altas temperaturas aplicadas na reação prejudicam estes ácidos graxos, os quais são sensíveis ao calor (KRISTENSEN; XU; MU, 2005; YANG et al., 2005).

Com o crescente interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, ou seja, produtos livres de reações de polimerização e de gorduras na configuração *trans*, a substituição da rota química pela rota enzimática na produção de DAG apresenta-se como uma alternativa atrativa (FERREIRA-DIAS et al., 2001; FREGOLENTE et al., 2009).

Tem-se notado um aumento do número de trabalhos publicados com grande interesse pelo desenvolvimento de processos enzimáticos na produção de DAG, em substituição aos químicos tradicionais. A sua obtenção a partir da glicerólise de TAGs, e também da esterificação de ácidos graxos com glicerol, vem sendo alvo de estudos constantes (SANTOS; REZENDE, 2012). As principais vantagens dos biocatalisadores são as condições amenas de temperatura e de pH utilizados, diminuindo assim o consumo energético e minimizando a ocorrência de reações indesejáveis (SANTOS et al., 2011), como também um maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, redução da quantidade de resíduos, introdução de rotas mais acessíveis de produção e a possibilidade de utilização das características das lipases como a seletividade e a especificidade, proporcionando a obtenção de produtos com maior qualidade (CASTRO et al. 2004; CORREIA et al., 2011).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Descrição dos Substratos e Reagentes

Como biocatalisador foi utilizada a lipase comercial Lipozyme® TL IM (Novozymes, Brasil), produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* em fermentação submersa do microrganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado e imobilizada em sílica.

Como substratos foram utilizados o glicerol P. A. (Nuclear), com pureza de 99,5 % (m/m), e o óleo de peixe comercial ultra-refinado OmegaPure® (Omega Protein, EUA), obtido de savelha e estabilizado com uma mistura de 500ppm de tocoferóis e 200ppm de *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ), conforme determinado por Feltes et al. (2010), este substrato contém 29,15 % dos ácidos graxos ômega-3 EPA, docosapentaenóico (DPA) e DHA.

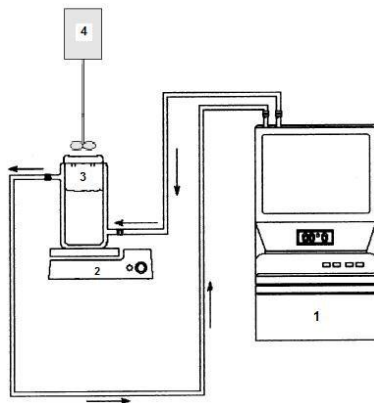
Os surfactantes de grau alimentício utilizados foram: poli-(óxido de etileno) triestearato de sorbitana (Tween 65, marca Sigma), poli-(óxido de etileno) monooleato de sorbitana (Tween 80, Vetec), poli-(óxido de etileno) trioleato de sorbitana (Tween 85, Sigma) e lecitina de soja (Alfa Aesar).

Os solventes utilizados foram todos de grau analítico.

##### 3.1.2 Aparato Experimental

Para todas as reações enzimáticas avaliadas, utilizou-se o aparato experimental indicado na Figura 3.1 Este sistema é constituído de um reator de vidro encamisado com volume útil de 50 mL, fechado, provido de agitação magnética para as reações de verificação da atividade enzimática e/ou mecânica digital para reações de glicerólise, conectado a um banho termostatizado.

**Figura 3.1** - Aparato experimental utilizado para as reações enzimáticas.



Banho termostático (1); Agitador magnético digital (2);  
Reator de vidro encamisado (3); Agitador mecânico digital (4).

## 3.2 MÉTODOS

O óleo de peixe foi avaliado quanto aos índices de acidez e peróxido. A enzima foi avaliada quanto à atividade de água e à atividade de esterificação. Estas análises e demais procedimentos realizados estão descritos a seguir.

### 3.2.1 Índice de Peróxido

O índice de peróxido (IP) foi determinado segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1990), através da análise por titulação com solução de tiosulfato de sódio. Primeiramente, foi pesado 1g de óleo de peixe em erlenmeyer de 125 mL, ao óleo foram adicionados 20 mL de solução ácido acético/clorofórmio 3:2 (v/v) e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (KI). Após 1 minuto em repouso, adicionaram-se 10 mL de água destilada.

Titulou-se com solução padronizada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 M, sob constante e vigorosa agitação, até que a coloração amarela do iodo



tivesse desaparecido. Após a adição de 2 mL de solução indicadora de amido a 1%, continuou-se a titulação, até que a coloração azul da solução tivesse desaparecido. Realizou-se paralelamente a titulação de um branco. A análise foi realizada em triplicata e a concentração de peróxidos (meq de O<sub>2</sub>/Kg de óleo) foi calculada através da Equação 1.

$$IP = \frac{(V_a - V_b) \cdot C_{ts}}{m_a} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

IP= índice de peróxido (meqO<sub>2</sub>/kg de óleo);

V<sub>a</sub>= volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (mL);

V<sub>b</sub>= volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco (mL);

C<sub>ts</sub>= Concentração da solução padronizada de tiosulfato de sódio (mmol/mL);

m<sub>a</sub>= massa da amostra analisada (Kg).

### 3.2.2 Índice de Acidez

A determinação do índice de acidez (IA) do óleo de peixe foi realizada segundo metodologia AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1980), considerando uma concentração de ácido oleico de 1 a 30 mmol/mL. A amostra foi pesada em um erlenmeyer de 250 mL e dissolvida em 75 mL de álcool etílico previamente aquecido a 65 °C, em seguida adicionaram-se 2 mL de solução indicadora de fenolftaleína. Este preparado foi titulado com a solução de hidróxido de sódio 0,25 M. As análises foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos como índice de acidez em ácido oleico, por meio da Equação 2.

$$IA = \frac{V_{NaOH} \cdot C_{NaOH} \cdot MM_{ao}}{m_a} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

IA= índice de acidez em ácido oleico;

$V_{\text{NaOH}}$  = volume gasto de hidróxido de sódio na titulação da amostra (mL);

$C_{\text{NaOH}}$  = concentração da solução padrão de NaOH (mmol/mL);

$MM_{\text{AO}}$  = Massa molar do ácido oleico (mg/mol);

$m_a$  = massa de amostra analisada (mg).

O valor de ácidos graxos livres total da amostra (%) foi obtido dividindo-se o índice de acidez por 1,99 conforme indicação da AOCS.

### 3.2.3 Determinação da Atividade de Água ( $a_w$ ) do Biocatalisador

A atividade de água da enzima foi determinada em higrômetro eletrônico AquaLab Série 3TE (Decagon Devices Inc., EUA), com precisão de 0,003. O ajuste da curva padrão foi realizado com uso de soluções saturadas de cloreto de lítio ( $a_w = 0,113$ ) e de cloreto de sódio ( $a_w = 0,753$ ). Após a calibração, 5 g de amostra foram colocadas no aparelho e a leitura feita automaticamente, à temperatura de 25 °C.

### 3.2.4 Condicionamento Térmico da Lipozyme<sup>®</sup> TL IM

Realizou-se o condicionamento prévio da lipase, em estufa (Fanem, modelo 502) a 40 °C durante 1 hora a fim de reduzir a atividade de água da enzima conforme metodologia desenvolvida por Oliveira et al. (2006) para a lipase Novozym 435.

A influência deste tratamento sobre a enzima foi avaliada através da determinação da atividade de esterificação antes e depois do condicionamento térmico.

### 3.2.5 Determinação da Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade enzimática (AE) foi utilizada a metodologia de atividade de esterificação descrita na literatura (OLIVEIRA et al., 2006), com a substituição do ácido láurico por ácido oleico, conforme proposto por Feltes (2011), pois este tem um

comprimento de cadeia mais próximo do EPA e DHA presentes no óleo de peixe, além disso o ponto de fusão do ácido láurico (44-46 °C) dificultou sua miscibilidade nas reações em 30 e 40 °C. A reação de esterificação foi realizada em reator encamisado de 50 mL conectado a um banho termostatizado, com agitação magnética de 350 rpm. Após 40 minutos de reação, alíquotas de 0,15 mL foram retiradas do meio em triplicata e misturadas a 20 mL de solução de acetona:etanol (1:1 v/v) para que a reação cessasse.

A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido oleico e propanol (razão molar 1:1), com 5 % (m/m) de enzima em relação ao total de substrato.

A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio 0,01 M até pH 11. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de ácido oleico, em mmol, consumido por minuto, nas condições experimentais descritas.

O volume medido na titulação foi utilizado para o cálculo da atividade enzimática segundo a Equação 3.

$$AE = \frac{(V_o - V_t) \cdot C_{NaOH}}{V_{a.t.m}} \cdot V_f \quad \text{Equação (3)}$$

Onde:

AE= atividade de esterificação -μmol de ácido/(min.mg de enzima) ou U/ mg de enzima;

V<sub>o</sub> = volume de NaOH gasto na titulação no tempo 0h (mL);

V<sub>t</sub>= volume de NaOH gasto na titulação no tempo „t“ de reação (mL);

V<sub>a</sub>= volume da alíquota retirada da reação no tempo „t“ de reação (mL);

V<sub>t</sub>= volume do meio reacional após a retirada da alíquota no tempo „t“ (mL);

C<sub>NaOH</sub>= concentração da solução padronizada de NaOH (mmol/mL);

t= tempo de reação (min);

m= massa do biocatalisador utilizado na reação (mg).

### 3.3 ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPOZYME TL® IM EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para investigar a atividade de esterificação da lipozyme TL® IM, utilizou-se a metodologia descrita no item 3.2.5, onde foram avaliadas as atividades de esterificação da Lipozyme TL® IM nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C após 40 minutos de reação.

### 3.4 CINÉTICA DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Para a escolha da temperatura de trabalho nas reações de glicerólise, foram realizadas cinéticas de reação de esterificação nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, onde as alíquotas de 0,15 mL foram retiradas do meio em triplicata nos seguintes tempos reacionais: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180 minutos. A atividade de esterificação em (mmol/min) foi calculada através do coeficiente angular da reta ajustada para a cinética de consumo de ácido oleico, e a atividade de esterificação (U/mg) foi obtida dividindo-se a atividade pela massa do preparado enzimático.

### 3.5 AÇÃO DA LIPOZYME® TL IM SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO

Para esta avaliação, simulou-se a reação de glicerólise enzimática, sem a presença do triacilglicerol (óleo de peixe). No reator, adicionou-se apenas o glicerol (previamente tratado com sulfato de sódio anidro para a redução do teor de água), o surfactante de grau alimentício e a lipase, sendo os dois últimos na proporção de 10% (m/m) em relação ao glicerol cada um. Os surfactantes testados foram Tween 65, Tween 80, Tween 85 e lecitina de soja. Em seguida, o reator foi fechado e mantido a 40 °C por 24 horas sob agitação magnética constante a 600 rpm.

Após a reação, foi feita a lavagem e a filtração a vácuo da enzima, utilizando-se uma solução de hexano e álcool etílico 1:1 (v/v). Posteriormente, o filtrado foi evaporado em um evaporador rotativo (RV 10 e HB 10 basic, IKA), sob vácuo a 70 °C, para a concentração da amostra referente ao tempo final da reação. Realizou-se também,

durante 24 horas, a reação do glicerol com o surfactante de grau alimentício sem a lipase, para obter-se a amostra denominada de branco. As alíquotas obtidas do meio reacional foram colocadas em tubos de vidro de 5 mL, imediatamente inertizadas com gás nitrogênio (teor de umidade inferior a 10 ppm), e congeladas à temperatura de -18 °C para análise qualitativa posterior.

### 3.5.1 Análise Qualitativa dos Produtos

As reações foram acompanhadas qualitativamente através de análises por cromatografia em camada delgada (TLC - *thin layer chromatography*), baseado no trabalho de Feltes, 2011, onde foram utilizadas placas de alumínio (3 x 10 cm) impregnadas com sílica-gel 60 G, com indicador de fluorescência (Macherey Nagel). Todas as amostras foram diluídas em hexano, exceto as amostras referentes ao estudo sobre o Tween 80, as quais foram preparadas com clorofórmio.

Os sistemas de fase móvel utilizados foram: hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v) para os surfactantes Tween 65, Tween 80 e Tween 85 e metanol/clorofórmio/água destilada 90:20:2,5 (v/v/v) para a lecitina de soja.

Diferentes concentrações foram testadas para cada surfactante em placas contendo amostras de tempo de reação 24 h e branco 24 h, até que fosse obtida uma concentração satisfatória para maior nitidez na visualização das manchas presentes nas placas de sílica. A concentração utilizada para aplicação das amostras envolvendo o Tween 85 na placa foi de 100 mg/mL; para amostras do Tween 80 utilizou-se a concentração de 120 mg/mL; para as amostras do Tween 65 utilizou-se 200 mg/mL; para as amostras da reação com a lecitina de soja e para o ácido oleico puro utilizou-se a concentração de 40 mg/mL. Após uma rigorosa agitação da amostra em agitador de tubos vórtex (Phoenix-AP56), aplicaram-se 10 µL da solução na placa.

Para a revelação das manchas presentes sobre as placas de TLC, testou-se dois métodos: Revelação com vapor de iodo e pulverização da placa com uma solução de sulfato de cobre saturado e ácido fosfórico 85% 50:50 (v/v), logo após a placa foi aquecida em forno a 180 °C por 20 minutos. A metodologia com a utilização do vapor de iodo foi escolhida para a revelação das manchas por apresentar melhor nitidez.

Os surfactantes foram testados em presença da Lipozyme TL IM em reações de 24 horas para verificar a possível ação do biocatalisador sobre os surfactantes.

Para esta reação foram adicionados 10 % (m/m) de surfactante e enzima em relação ao glicerol, na temperatura de 40 °C sob agitação magnética constante de 600 rpm.

A fim de fazer uma comparação da composição das amostras entre si, foram calculados os fatores de retenção (Rf) para cada mancha apresentada nas placas.

O Rf corresponde à razão entre a distância percorrida pela substância em estudo e a distância percorrida pelo eluente (fase móvel).

Essas manchas foram detectadas e anotadas logo após o experimento, mas algumas manchas não apresentaram boa nitidez após o processo de digitalização, em função da rápida evaporação do componente de revelação. Embasado nos estudos de Feltes (2011) e Santos (2011) as manchas foram agrupadas de acordo com a área de abrangência de seus Rfs quanto à fração lipídica correspondente (MAG, DAG, TAG e AGL).

## 3.6 REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA EM DIVERSOS MEIOS REACIONAIS

### 3.6.1 Descrição Geral da Reação de Glicerólise Enzimática

A reação de glicerólise foi conduzida em reator encamisado de 50 mL conectado a um banho termostatizado para controle da temperatura, com agitação mecânica de 600 rpm. A reação foi composta pelos substratos, óleo de peixe OmegaPure<sup>®</sup> e glicerina (tratada previamente com sulfato de sódio anidro), na proporção molar de óleo:glicerol de 2:1, e biocatalisador na proporção de 10% (m/m) do total dos substratos. A reação foi realizada à temperatura de 40 °C, durante 48 horas, onde alíquotas de 300 µL foram retiradas ao longo da reação. Estas alíquotas foram lavadas com hexano/etanol (1:1, v/v) e centrifugadas (3000 rpm por 5 min). Esta operação foi repetida três vezes. Os solventes presentes no meio reacional foram eliminados em banho-maria, sob corrente de nitrogênio. Ao final da reação, o meio restante foi filtrado a vácuo em funil de Büchner acoplado ao kitassato, por meio de 3 lavagens de 20 mL de hexano/etanol 1:1 (v/v) para

separação da enzima imobilizada. Os solventes presentes no meio reacional foram eliminados em evaporador rotativo a vácuo. Ao final do processo todas as amostras foram imediatamente inertizadas sob corrente de nitrogênio e armazenadas em freezer.

A reação descrita acima foi tomada como base para todas as reações de glicerólise realizadas, ocorrendo algumas alterações relacionadas à proporção molar óleo:glicerol, percentual de enzima, percentual de surfactante, ou ausência deste e diferentes temperaturas; dependendo do objetivo da investigação realizada neste trabalho.

### **3.6.2 Cinética da Glicerólise Enzimática para Seleção do Surfactante de Grau Alimentício**

A fim de selecionar o surfactante para glicerólise foram realizadas cinéticas com duração de 48 h, onde foram analisados os surfactantes Tween 80, Tween 85, Tween 65 e Lecitina de soja, como também foi realizada a cinética da reação sem surfactante (reação controle).

A reação foi composta pelos substratos, óleo de peixe OmegaPure e glicerina (tratada previamente com sulfato de sódio anidro), na proporção molar de óleo:glicerol de 2:1, biocatalisador e cada surfactante de grau alimentício na proporção de 10% (m/m, do total dos substratos). A reação foi realizada à temperatura de 40 °C e 600 rpm. O procedimento foi semelhante ao descrito no item 3.6.1. As amostras com os produtos obtidos foram analisados por cromatografia em camada delgada.

### **3.6.3 Determinação Quantitativa dos Produtos das Reações de Glicerólise**

A determinação quantitativa dos produtos das reações de glicerólise foi realizada por cromatografia em fase gasosa.

Para esta quantificação, foram utilizados os padrões de monoleína e dioleína, ambos com 99% de pureza e adquiridos da Sigma-Aldrich e o derivatizante MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamide).

A análise foi realizada com base na Norma DIN EN nº 14105 do Comitê Europeu para Padronizações (2003), com modificações propostas por Krüger (2010).

As amostras reacionais foram previamente tratadas com adição de derivatizante, com o objetivo de transformar o glicerol, mono e diacilgliceróis em compostos mais voláteis do que nas amostras originais.

Após o devido tratamento, as amostras silanizadas foram analisadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010, com injetor automático e *on-column* e detector de ionização de chama (GC-FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, nº de série: (US7162944H), com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm. As condições de operação foram: Temperatura do detector: 380 °C; Programação da temperatura da coluna: 50 °C por 1 minuto, 15 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, 7 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> até 380 °C, permanecendo nesta temperatura por 8 min. Gás de arraste: Nitrogênio (pressão 80 kPa); Volume injetado: 1,0 µL. Esta análise foi realizada no Laboratório de Central de Análises, localizado no Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC.

Os dados coletados foram tratados com auxílio do *software GC Solution* (Shimadzu) através de separação manual das áreas dos picos contidos nos cromatogramas.

## 3.7 MONITORAMENTO PÓS-REAÇÃO

### 3.7.1 Monitoramento da Atividade de Esterificação Residual

A reação de esterificação foi realizada conforme o item 3.2.5, com base na literatura (OLIVEIRA et al., 2006), modificado pela substituição do ácido láurico pelo ácido oleico, pois este possui um comprimento de cadeia mais próximo do EPA e DHA (presentes no óleo de peixe). Os biocatalisadores residuais analisados foram provenientes de reações de glicerólise com os surfactantes *Food Grade* (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de soja) e reação controle. A reação de esterificação foi realizada à temperatura de 40 °C. Aliquotas de 0,15 mL foram retiradas em triplicata nos tempos reacionais de 0 e 40 minutos.



### 3.7.2 Monitoramento do Índice de Acidez (IA)

O monitoramento do índice de acidez ocorreu através das análises comparativas entre o óleo de peixe OmegaPure antes das reações de glicerólise e nas amostras das reações de glicerólise em meio contendo os surfactantes (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de soja) e reação controle. O procedimento foi igual ao descrito no item 3.2.2.

## 3.8 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VARIÁVEIS NA OBTENÇÃO DE DAGS

### 3.8.1 Reação de Glicerólise com Tween 65

Após a análise das cinéticas de glicerólise, definiu-se um planejamento experimental para avaliar os efeitos e as interações dos fatores mais influentes sobre a obtenção do produto de interesse.

Nesta etapa foi selecionado o surfactante Tween 65, por apresentar melhor desempenho nas reações prévias.

Para o estudo da influência das condições experimentais sobre a produção enzimática de DAGs com a enzima comercial Lipozyme® TL IM foi utilizada uma estratégia sequencial de planejamentos fatoriais. Inicialmente optou-se por um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$ , com o ponto central em triplicata. Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental fatorial  $2^2$  com triplicata do ponto central. As variáveis estudadas foram proporção molar de substratos (glicerol e óleo), concentração de enzima, temperatura da reação e concentração do Tween 65. Nestes ensaios, a agitação foi mantida em 600 rpm e o tempo de reação foi fixado em 6 h de reação, baseado nos resultados prévios deste trabalho e nos estudos realizados com sistemas semelhantes (VALÉRIO et al., 2009; KRÜGER et al., 2010; FELTES et al., 2011; SANTOS et al., 2013). A resposta avaliada em todos os experimentos foi a concentração mássica em DAGs (%). A Tabela 3.1 apresenta as variáveis e a faixa de estudo para os delineamentos experimentais realizados.

**Tabela 3.1** - Nível dos fatores investigados nos planejamentos experimentais sequenciais de glicerólise enzimática em meio com surfactante Tween 65.

Variáveis	$2^{4-1}$		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40	55	70
<sup>1</sup> Razão molar (óleo:glicerol)	1:0,5	1:0,75	1:1
<sup>2</sup> Concentração enzima	5	10	15
<sup>3</sup> Concentração surfactante	5	10	15
	$2^2$		
<sup>1</sup> Razão molar (óleo:glicerol)	1:0,1	1:0,3	1:0,5
<sup>2</sup> Concentração enzima	15	20	25

<sup>1</sup>Óleo de peixe:glicerol, TAG:Gli (mol/mol); <sup>2</sup>Enzima (% m/m, em relação aos substratos); <sup>3</sup>Surfactante Tween 65 (% m/m, em relação aos substratos).

### 3.8.2 Reação de Glicerólise sem Surfactante

Um segundo planejamento sem a utilização de surfactante foi realizado pois verificou-se a necessidade de estudar melhor o comportamento da reação em diferentes proporções molares de óleo e glicerol na presença da Lipozyme TL IM.

O meio reacional para os ensaios foi determinado de acordo com o planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$ , com triplicata do ponto central, mantendo constante o tempo de reação de 6 horas e agitação mecânica de 600 rpm.

As variáveis estudadas foram proporção molar de substratos (glicerol e óleo), concentração de enzima e temperatura da reação, o delineamento experimental teve por objetivo investigar os efeitos destas variáveis estudadas, que influenciam significativamente a obtenção de diacilgliceróis durante as reações de glicerólise de óleo de peixe catalisadas pela lipase Lipozyme TL IM avaliadas nos níveis indicados na Tabela 3.2

Os resultados foram expressos em termos de concentração mássica em DAGs (%) formados ao longo da reação e foram tratados estatisticamente.

**Tabela 3.2** - Nível de variáveis investigadas no planejamento experimental (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR)  $2^3$  para reação de glicerólise enzimática em meio sem surfactante.

Variáveis	$2^3$		
	-1	0	+1
<sup>1</sup> Razão molar (óleo:glicerol)	1:0,5	1:0,75	1:1
<sup>2</sup> Concentração Enzima	5	10	15
Temperatura (°C)	40	55	70

<sup>1</sup>Óleo de peixe:glicerol, TAG:Gli (mol/mol); <sup>2</sup>Enzima (% m/m, em relação aos substratos).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada em nível de confiança de 95% com auxílio do Software Statistica versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ÍNDICE DE PERÓXIDO E ACIDEZ DO ÓLEO DE PEIXE

O índice de peróxido e acidez foram medidos para o acompanhamento da qualidade do óleo e comparação do substrato antes e após as reações de glicerólise. A média dos resultados obtidos em triplicata está apresentada na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Índice de peróxido e índice de acidez encontrados para o óleo de peixe OmegaPure<sup>®</sup> comparados com os valores máximos permitidos pelos órgãos reguladores.

Análise	OmegaPure	FDA <sup>1</sup>	Padrão ANVISA <sup>2</sup>
I.P. (meq O <sub>2</sub> /kg de óleo)	1,380 ± 0,050	5	10
IA (g ácido oleico/g óleo)	0,081 ± 0,003	1,51	1,2 - 2,8

<sup>1</sup> Padrão para óleo de savelha (FDA, 2005). <sup>2</sup> Para índice de peróxido é determinado para óleos e gorduras vegetais refinados (Anvisa, 2005) e para índice de acidez, é estabelecido o máximo para óleo de bacalhau e cação, (Anvisa, 1995).

Dado o nível de insaturação dos seus ácidos graxos, os óleos de peixes são muito susceptíveis a processos oxidativos, que comprometem a integridade das duplas ligações, a concentração e a funcionalidade dos ácidos graxos EPA e DHA, além de colocarem em risco a saúde humana (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998; PACHECO; REGITANO-D'ARCE, 2009).

A rancidez quase sempre é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres, o Instituto Adolfo Lutz (1985, p. 595) elenca que, a determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício.

Ao comparar o resultado obtido com os valores da tabela acima observou-se que o óleo OmegaPure<sup>®</sup> apresentou índice de peróxido e acidez dentro dos parâmetros estabelecidos para óleo de peixe pelos

órgãos reguladores, o resultado demonstrou que o óleo apresenta a qualidade necessária para consumo humano e indicou também a manutenção da integridade dos AGPIs presentes no substrato.

Ao longo dos experimentos estas análises foram repetidas a fim de monitorar a matéria prima utilizada (óleo de peixe) e comparar com os resultados após as reações de glicerólise enzimática.

#### 4.2 ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) DO BIOCATALISADOR (LIPOZYME® TL IM)

A análise foi realizada em triplicata onde obteve-se uma média de atividade de água para a enzima Lipozyme TL IM de 0,246.

#### 4.3 CONDICIONAMENTO TÉRMICO DA LIPOZYME® TL IM

A metodologia utilizada para a obtenção da atividade de esterificação deste trabalho foi baseada nas publicações de Oliveira et al. (2006) e Feltes (2011) onde foi utilizada a lipase Novozym 435. Nesses estudos a metodologia citada propunha o condicionamento térmico prévio da enzima.

A fim de avaliar a eficiência deste processo para a Lipozyme TL IM foram analisados os resultados de atividade de esterificação com e sem o condicionamento térmico da enzima. A Tabela 4.2 mostra os resultados obtidos neste experimento.

**Tabela 4.2 – Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM antes e após o condicionamento térmico.**

Lipozyme TL IM	*Atividade de Esterificação [U/(mg - biocatalisador)]
Não condicionada	0,531± 0,011
Condicionada a 40°C por 1h	0,304 ± 0,013

\*Metodologia utilizada Oliveira et al. (2006). Meio contendo ácido láurico e propanol, à 60 °C.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que a enzima não condicionada apresentou maior atividade de esterificação.

Em estudo semelhante, Santos (2011) analisou dois lotes da enzima de *Rhizomucor miehei*, onde concluiu que não houve diferença significativa na atividade de esterificação para esta enzima antes e após o condicionamento a 40 °C, além disso, percebeu através de seus estudos que a temperatura da reação que garante a estabilidade da atividade enzimática em níveis relativamente altos poderia ser comprometida em seu desempenho catalítico.

Segundo Yadav e Devi (2004), determinada quantidade de água é necessária para aumentar a flexibilidade estrutural da enzima e promover a atividade da enzima. Contudo, água em excesso favorece a hidrólise (NIE et al., 2006), além de aumentar a espessura da camada de água ao redor da enzima levando a problemas de difusão de substratos para os sítios ativos da lipase (KHOR et al., 2010; YADAV; DEVI, 2004).

Segundo Dellamora-Ortiz et al. (1997) a mudança nos resíduos dos suportes na região “tampa e dobradiça” da estrutura da enzima podem desempenhar um papel importante na tolerância à baixa atividade de água da mesma, entretanto, é necessária uma quantidade mínima de água para promover a ativação interfacial do sítio ativo da enzima.

Para este trabalho optou-se por não utilizar o prévio tratamento térmico da Lipozyme TL IM nas reações de glicerólise, pois esta condição apresentou o melhor resultado da atividade de esterificação.

#### 4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA (ESTERIFICAÇÃO) PARA A ENZIMA LIPOZYME TL IM

A metodologia para atividade de esterificação segundo Oliveira et al. (2006), utilizada neste trabalho, está consolidada para a lipase Novozym 435, porém existe a necessidade de verificar a aplicação desta metodologia para a lipase Lipozyme TL IM.

Por esse motivo foram escolhidas algumas das temperaturas encontradas na literatura para glicerólise, onde foi utilizada a Lipozyme TL como biocatalisador.

Na Tabela 4.3 são apresentados os resultados deste estudo, que foram avaliados pelo teste de Tukey.

**Tabela 4.3** – Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM em reação com o ácido oleico e propanol em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Atividade de Esterificação [U/(mg - biocatalisador)]
30	0,243 <sup>ab</sup> ± 0,01
40	0,306 <sup>ab</sup> ± 0,02
50	0,346 <sup>a</sup> ± 0,01
60	0,270 <sup>ab</sup> ± 0,11
70	0,150 <sup>b</sup> ± 0,04

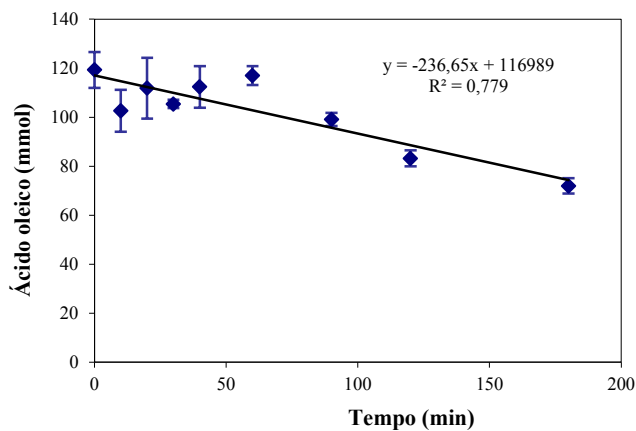
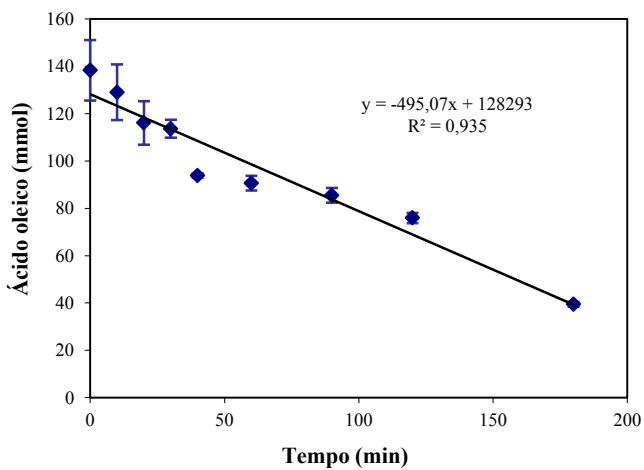
Observando os resultados pode-se constatar que na temperatura de 50 °C, obteve-se a maior atividade de esterificação, no entanto, as atividades de esterificação obtidas à 30, 40 e 60 °C não diferem da atividade à 50 °C, sendo assim, para aprofundar a investigação foi realizado um segundo estudo através da cinética da reação de esterificação, para investigar qual a melhor condição de temperatura para a enzima Lipozyme TL IM.

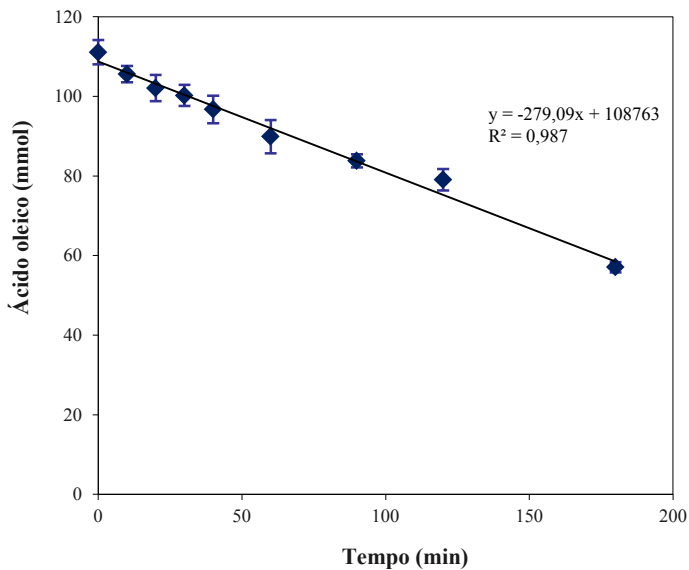
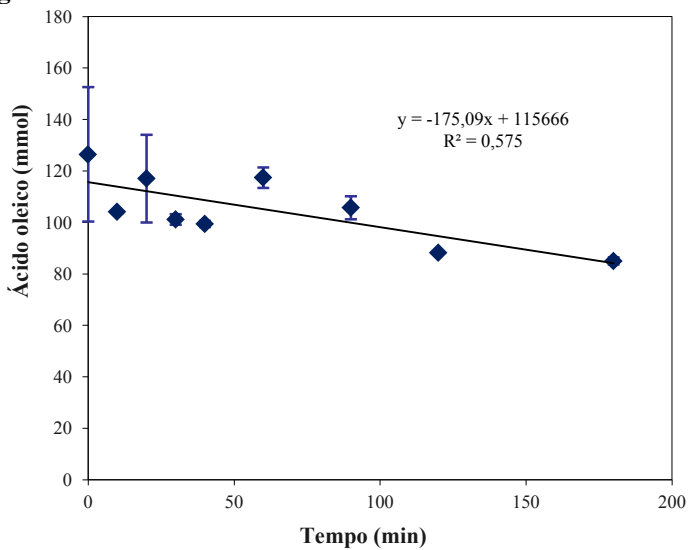
#### 4.5 CINÉTICA DO CONSUMO DE ÁCIDO ÓLEICO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Para o estudo da cinética de esterificação do ácido oleico residual (não esterificado) com propanol (1:1; mol/mol), a 350 rpm, catalisada pela Lipozyme TL IM (5 %, m/m), foram selecionadas as temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, exceto a temperatura de 70 °C por esta ter apresentado a menor atividade de esterificação no estudo anterior.

As cinéticas foram necessárias para a determinação da melhor temperatura de trabalho, a qual propicia a maior atividade enzimática. Através deste estudo também foi possível confirmar o tempo para a obtenção da medida da atividade de esterificação enzimática. Os resultados estão apresentados nos gráficos abaixo (Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4) e na Tabela 4.4.



**Figura 4.1** – Cinética do consumo de ácido oleico a 30 °C.**Figura 4.2** – Cinética do consumo de ácido oleico a 40 °C.

**Figura 4.3** – Cinética do consumo de ácido oleico a 50 °C.**Figura 4.4** – Cinética do consumo de ácido oleico a 60 °C.

**Tabela 4.4** - Atividade de esterificação da Lipozyme TL IM em reação com o ácido oleico e propanol em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Atividade de Esterificação [U/(mg - biocatalisador)]
30	0,151
40	0,317
50	0,178
60	0,112

Na temperatura de 30°C, observou-se uma menor homogeneidade entre os substratos da reação, isso provavelmente ocorreu em função da temperatura utilizada, já com o aumento da temperatura de 40 °C a 60 °C, obteve-se uma maior miscibilidade entre os componentes da reação, favorecendo um aumento na velocidade do consumo de ácido oleico.

Observou-se uma maior atividade de esterificação a 40 °C do que nas outras temperaturas analisadas. Assim, 40°C foi a temperatura escolhida para a reação de verificação da ação do biocatalisador sobre os surfactantes e demais reações de glicerólise enzimática, bem como, ficou confirmado 40 minutos como tempo suficiente para obtenção do resultado desta análise, em função da linearidade da velocidade de consumo do ácido oleico até 40 min, da mesma forma que Oliveira et al (2006), que utilizou ácido láurico como fonte de TAGs e a enzima Novozym 435 como biocatalisador.

#### 4.6 ANÁLISE DA AÇÃO DO BIOCATALISADOR SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO

Os surfactantes foram testados em presença da Lipozyme TL IM em reações de 24 horas para verificar a possível ação do biocatalisador sobre os surfactantes.

Para esta reação foram adicionados 10 % (m/m) de surfactante e enzima em relação ao glicerol, na temperatura de 40 °C sob agitação magnética constante de 600 rpm.

Devido à necessidade de uma análise visual da placa, diferentes concentrações foram testadas para que as manchas

aparecessem com maior nitidez. Após os testes, foram realizadas as placas de TLC para analisar as modificações nos surfactantes Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de soja ao longo das 24 horas de reação.

A fim de fazer uma comparação da composição das amostras entre si, foram calculados os fatores de retenção (Rf) para cada mancha apresentada nas placas. Essas manchas foram detectadas e anotadas logo após o experimento, mas algumas manchas não apresentaram boa nitidez após o processo de digitalização, em função da rápida evaporação do componente de revelação. Embasado nos estudos de Feltes (2011) e Santos (2011) foi possível agrupar as manchas de acordo com a área de abrangência de seus Rfs quanto à fração lipídica correspondente (MAG, DAG, TAG e AGL).

O Rf corresponde à razão entre a distância percorrida pela substância em estudo e a distância percorrida pelo eluente (fase móvel). Segue a Tabela 4.5 com os Rfs calculados por região para a lecitina de soja. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6.

**Tabela 4.5** – Fatores de retenção (Rf) da placa de TLC referentes à avaliação da ação da Lipozyme TL IM sobre a lecitina de soja.

Surfactante	Amostras	MAG	DAG	TAG	AGL
Lecitina de Soja	a) 0h	0,02; 0,13	0,26; 0,34	0,66	0,88
	b) 24h	0,01; 0,08; 0,13	0,25; 0,33	0,65	0,89
	c) Br 24h	0,01; 0,06; 0,10	0,21; 0,28	0,65	0,88
	d) Surf. LS	0,04; 0,12; 0,18	0,29; 0,36	0,65; 0,69	0,89
	e) Ác Ol.	-	-	0,69	0,89

Rfs referentes à placa de TLC das amostras da reação de interesterificação por 24 h, contendo Lecitina de soja, catalisada pela Lipozyme TL IM (10 %, m/m), eluída em solução metanol/clorofórmio/água destilada (90:20:2,5; v/v/v): (a) Reação 0 h; (b) Reação 24 h; (c) Branco 24 h; (d) Lecitina de soja; (e) Ácido oleico.

Regiões das frações agrupadas com base nos estudos realizados por Feltes(2011) e Santos (2011).

Uma das dificuldades enfrentadas nas reações de glicerólise é a imiscibilidade dos seus componentes (glicerol e óleo), a adição de surfactantes ao meio reacional tem por objetivo melhorar a

homogeneidade do sistema, aumentando a velocidade de reação e por consequência aumentando o percentual dos produtos da reação.

Como os surfactantes de grau alimentício utilizados neste trabalho possuem funções químicas que podem servir de substrato para a enzima Lipozyme TL IM, foram avaliadas estas reações a fim de analisar a ação da lipase sobre os surfactantes.

No sistema de solvente utilizado para a migração das amostras contendo a lecitina de soja, metanol/clorofórmio/água destilada (90:20:2,5; v/v/v), as manchas aparecem na sequência MAG- DAG- TAG-AGL.

Ao comparar os Rfs das amostras de tempo de reação 0h (a) e solução de Lecitina de Soja pura (d) com a amostra do tempo de reação 24h (b), observa-se que a estrutura deste fosfolípido foi modificada pela Lipozyme TL IM, tendo em vista que a amostra ao final de 24h não apresentou os Rfs correspondentes ao início da reação, indicando que a lipase agiu sobre a molécula de lecitina de soja.

Estudos semelhantes com as lipases Lipozyme RM IM e Novozym 435 também observaram a modificação dos ácidos graxos esterificados deste fosfolípido (FELTES, 2011; SANTOS, 2011).

Segue a Tabela 4.6 com os Rfs calculados por região para os surfactantes Tween 65, Tween 80 e Tween 85.

**Tabela 4.6** – Fatores de retenção (Rf) da placa de TLC referentes à avaliação da ação da Lipozyme TL IM sobre os surfactantes Tween 65, Tween 80 e Tween 85.

Surfactantes	Amostras	MAG	DAG	AGL	TAG
Tween 65	a) 0h	0,06	-	-	0,52
	b) 24h	0,06	-	-	0,52; 0,57
	g) Surf.	-	-	-	0,46
Tween 80	c) 0h	0,05	-	-	0,45
	d) 24h	0,05	-	0,26	0,45
	h) Surf.	-	-	-	0,45
Tween 85	e) 0h	0,05; 0,10	-	0,28	0,45
	f) 24h	0,05; 0,10	0,17	0,26	0,45; 0,52
	i) Surf.	0,05; 0,10	0,18	0,30	0,49

Rfs referentes à placa de TLC das amostras da reação de interesterificação por 24 h, contendo os Tween 65, 80 e 85, catalisada pela Lipozyme TL IM (10 %,

m/m), eluídos em solução hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1; v/v/v): (a) Tween 65 Reação 0 h; (b) Tween 65 Reação 24 h; (c) Tween 80 Reação 0 h; (d) Tween 80 Reação 24 h; (e) Tween 85 Reação 0 h; (f) Tween 85 Reação 24 h; (g) Surfactante Tween 65; (h) Surfactante Tween 80; (i) Surfactante Tween 85; (j) Ácido oleico.

Regiões das frações agrupadas com base nos estudos realizados por Feltes(2011) e Santos (2011).

No sistema de solvente utilizado para a migração das amostras contendo os tween (Tween 65, 80 e 85), hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1; v/v/v), as manchas aparecem na sequência MAG-DAG-AGL-TAG.

Para o Tween 65 observou-se que a amostra ao final da reação (b), apresentou uma mancha a mais na região de TAG, com Rf igual a 0,57, já a amostra da solução contendo somente o Tween 65 apresentou Rf somente na região de TAG igual a 0,46.

Para o Tween 80 observou-se que a amostra do final da reação (d), apresentou uma mancha a mais na região de AGL, com Rf igual a 0,26, já a amostra da solução contendo somente o Tween 80 apresentou Rf somente na região de TAG igual a 0,45.

Para o Tween 85 observou-se que a amostra do final da reação (f), apresentou uma mancha a mais na região de DAG e TAG, com Rfs de 0,17 e 0,52, já a amostra da solução contendo somente o Tween 85 apresentou manchas em todas as regiões.

Ao analisar as Tabelas 4.5 e 4.6, observou-se a presença de diferentes frações lipídicas em todos os surfactantes testados, podendo a lipase utilizá-los como substratos na reação.

As amostras ao final das reações com os surfactantes não apresentaram os mesmos Rfs do início das reações, sugerindo que todos sofreram alguma modificação na sua estrutura lipídica, especialmente a Lecitina de soja e o Tween 85 que apresentaram maior diferença entre as manchas das amostras reacionais de tempo 0 h e 24 h.

Santos et al. (2013), em seu estudo com Lipozyme RM IM, não observaram modificações desta lipase nos Tweens 65, 80 e 85, sugerindo que estes poderiam atuar apenas como agentes tensoativos no meio trifásico, glicerol (hidrofílico)/óleo (lipofílico)/enzima (sólido).

Em trabalhos citados por Bendikienė et al. (2005) foi observada a hidrólise de diferentes Tween (20,40,60,80,85) pela lipase *Pseudomonas mendocina*, onde estes Tween podiam apresentar tanto a

função de surfactante como de substrato para a enzima. Tendo o Tween 85 apresentado maior suscetibilidade à hidrólise provavelmente devido a sua estrutura com três ligações éster de ácido oleico, porém quando este Tween era adicionado em baixas concentrações (0,4-0,8%), atuava apenas como surfactante.

Feltes (2011) observou que o Tween 85 foi modificado pela enzima Novozym 435, porém seu estudo sugeriu que as manchas diferentes que surgiram após a reação são relativas aos produtos da oxidação, modificação ou da hidrólise enzimática deste surfactante. Salientando ainda que a produção destas substâncias foi minimizada em meio inertizado com nitrogênio, e que apesar do Tween 85 ter sido modificado pela enzima foi possível obter mono e diacilgliceróis em duas horas de reação de glicerólise de óleo de peixe contendo este surfactante.

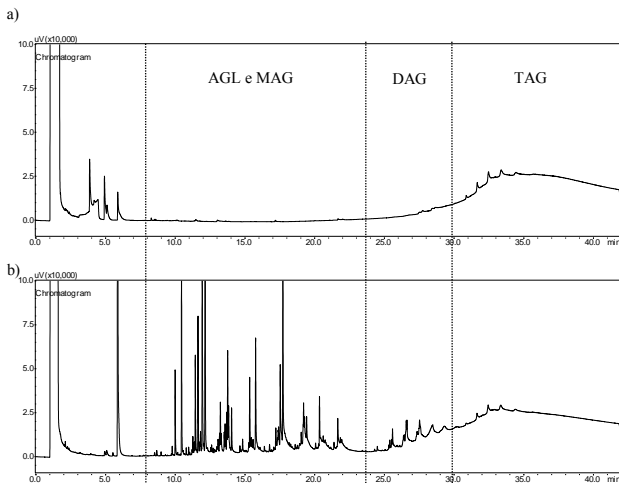
Contudo, como esta análise não foi conclusiva do ponto de vista quantitativo, não foram definidos quais os surfactantes específicos para a etapa de glicerólise, para melhor avaliar o comportamento de cada um dos surfactantes fez-se necessário um novo teste de seleção.

#### 4.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DOS CROMATOGRAMAS

Para avaliar quantitativamente os produtos das reações seguiram-se as condições descritivas na Norma DIN EN nº 14105, com as modificações propostas na literatura (VALÉRIO et al., 2009a; KRÜGER, 2010) e construção das curvas dos padrões de MAG e DAG segundo Remonato (2013).

Para análise inicial dos resultados, estão representados na Figura 4.5 dois cromatogramas obtidos nas análises das amostras por cromatografia em fase gasosa (CG).

**Figura 4.5** – Perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia em fase gasosa, de amostras do meio reacional (a) antes e (b) após 48 h de reação.



MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis; AGL: ácidos graxos livres. Condições reacionais: 600 rpm, 40 °C, razão molar óleo:glicerol 2:1, 10% de surfactante e 10 % de enzima Lipozyme TL IM (m/m, em relação ao total de substratos).

Avaliando-se os cromatogramas da Figura 4.5, observa-se que os picos apresentados na região a partir de 30 min correspondem à retenção dos triacilgliceróis, visto que são os picos evidenciados no tempo zero da reação, enquanto que após 48 horas, percebe-se que pode ter indícios de conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis.

Conforme as condições cromatográficas definidas para estas análises, a ordem de retenção dos componentes presentes nestas amostras é seguida pelo glicerol, ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis.

No cromatograma b, correspondente aos produtos da reação de glicerólise, na região de 7 a 22 min, aproximadamente, percebe-se os picos referentes aos AGL e MAGs, porém não foi possível distinguir-se exatamente o limite entre esses dois produtos o que dificultou a

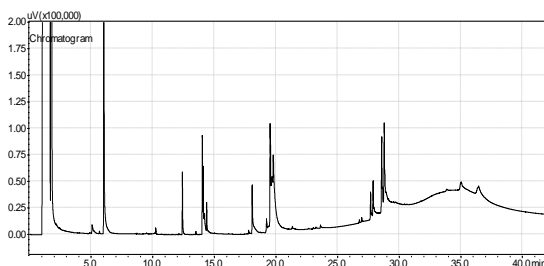


quantificação destas frações lipídicas. Já para a região de 24 a 30 min observou-se a região de retenção dos DAGs.

Cabe salientar que os padrões cromatográficos disponíveis foram aplicados com êxito para os óleos de soja e canola (REMONATO, 2013), por serem estes óleos de composição mais simples do que a composição do óleo de peixe.

A fim de elucidar melhor esta diferença entre os óleos vegetais e o óleo de peixe, está colocado na Figura 4.6 um dos cromatogramas obtidos no trabalho de Remonato (2013), onde pode-se observar as regiões bem delimitadas dos componentes do produto da reação de glicerólise enzimática, onde as áreas correspondem: de 10,5 a 12,5 min à região de ácidos graxos livres, de 12,5 a 24 min à região de MAGs, de 23 a 30 min à região de DAGs e por fim de 32 a 40 min à região de TAGs.

**Figura 4.6** – Cromatograma referente à glicerólise enzimática de óleo de Soja.



Condições da reação: 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 0,8:1 e agitação de 600 rpm e potência de ultrassom de 40% , 3h de reação, enzima utilizada Novozym 435.

Fonte: Remonato (2013).

Os óleos de soja e canola apresentam uma composição mais simples, nestes óleos os ácidos graxos majoritários são os ácidos oleico e o linoleico, já o óleo de peixe apresenta uma composição bastante diversificada de ácidos graxos. Dessa forma, as condições de análise utilizadas permitiram quantificar somente a fração lipídica de DAG.

Por esse motivo e conforme já discutido por Feltes (2011), os resultados dos cromatogramas serão expressos em quantidade de DAG (%). salientando a importância da ingestão humana destes compostos,

pois conforme Cheong et al. (2007) constatou-se que eles podem favorecer a redução dos níveis de triacilgliceróis no sangue, após as refeições e inibir o acúmulo de TAG na gordura do corpo e no fígado. Esta ação benéfica ao ser humano é causada pela forma isomérica sn-1,3-diacilglicerol (isômeros  $\alpha$  e  $\alpha'$ ), uma vez que este isômero é metabolizado de forma diferente do triacilglicerol e do 1,2-diacilglicerol, sendo convertido totalmente em energia (WEBER; MUKHERJEE, 2004). Os DAGs são, portanto, benéficos para prevenção e redução de doenças coronarianas, diabetes mellitus e hipertensão (MATSUO; TOKIMITSU, 2001; MURASE et al., 2002; YUAN et al., 2012). Além disso, a enzima Lipozyme TL IM é 1,3-específica apresentando uma pré-disposição em promover a obtenção de maiores rendimentos de 1,3-diacilgliceróis (FERNANDES et al., 2004).

#### 4.5 CINÉTICA DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA PARA SELEÇÃO DO SURFACTANTE DE GRAU ALIMENTÍCIO

A fim de selecionar o surfactante para glicerólise foram realizadas cinéticas com duração de 48 h, onde foram analisados os surfactantes Tween 80, Tween 85, Tween 65 e Lecitina de soja, como também foi realizada a cinética da reação sem surfactante (reação controle).

A reação foi composta pelos substratos, óleo de peixe OmegaPure e glicerina (tratada previamente com sulfato de sódio anidro), na proporção molar de óleo:glicerol de 2:1, biocatalisador e cada surfactante de grau alimentício na proporção de 10% (m/m, do total dos substratos). A reação foi realizada à temperatura de 40 °C e 600 rpm.

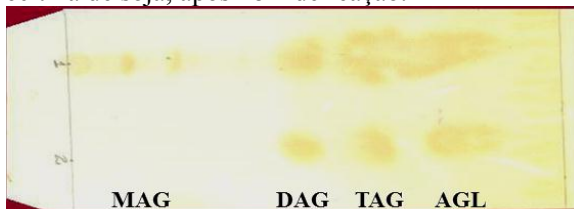
Logo após as reações foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada com as alíquotas referentes ao final das reações de glicerólise, os resultados estão expressos nas Figuras 4.7 e 4.8.

**Figura 4.7** – Placa de TLC das amostras das reações de glicerólise, sem surfactante e com os Tweens 65, 80 e 85, após 48 h de reação.



Placa de TLC referente às amostras do meio após 48 h de reação contendo (a) somente glicerol e óleo (controle); (b) Tween 65; (c) Tween 80; (d) Tween 85; (e) padrão (mistura de MAG, DAG, AGL e TAG). Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, vol/vol/vol).

**Figura 4.8** - Placa de TLC da amostra da reação de glicerólise, meio contendo lecitina de soja, após 48 h de reação.

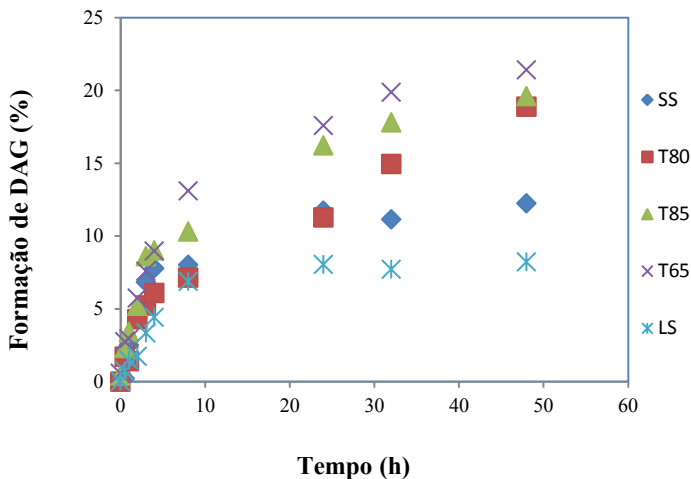


Amostras de (a) meio contendo lecitina de soja após 48 h de reação; (b) padrão (mistura de MAG, DAG, AGL e TAG). Sistema de eluição: metanol/clorofórmio/água destilada (90:20:2,5, vol/vol/vol).

Observou-se nas figuras acima a presença de manchas após 48 horas de reação, indicando que houve a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis.

Como já foi mencionado anteriormente, a maioria dos trabalhos encontrados normalmente utilizam óleos vegetais de composição relativamente mais simples do que o óleo de peixe, pois este possui composição extremamente complexa em termos de ácidos graxos associados aos triacilgliceróis, por esse motivo a análise em CG não possibilitou a distinção exata das áreas relativas aos picos de ácidos graxos livres e MAGs, então, os resultados representados na Figura 4.9 a seguir, estão expressos em formação de DAG %.

**Figura 4.9** – Formação de DAG (%) ao longo de 48 horas de reação de glicerólise em meio contendo surfactantes e reação sem surfactante (controle).



Através da cinética observou-se que nas reações de glicerólise sem surfactante (reação controle) e com Lecitina de Soja, obteve-se a menor formação de DAGs, 14,84% e 12,12% respectivamente, já os meios que se destacaram com maior produção de DAGs foram os que continham o Tween 65 e Tween 85 com a formação de 21,40% e 19,64% respectivamente. Deve-se levar em conta que nas condições experimentais utilizadas, na proporção molar de óleo:glicerol de 2:1, o máximo de DAGs possível de ser obtido é 33%.

Pelos valores alcançados, nota-se que a reação foi favorável à formação de DAGs, uma vez que as condições experimentais eram limitadas em glicerol (relação molar entre glicerol e óleo 1:2). Tentou-se trabalhar com relações molares maiores entre o glicerol e óleo, 2:1, como utilizado em outros trabalhos como Santos et al. (2013) e Feltes et al. (2011), porém os resultados não foram bons para a Lipozyme TL IM, pois este biocatalisador possui suporte hidrofílico, e um excesso de glicerol faz com que este fique aderido ao suporte e prejudique a transferência de massa e, portanto, o contato entre os substratos e a enzima (YANG et al., 2005).

Um estudo mais aprofundado sobre a proporção molar glicerol:óleo foi realizado posteriormente através de planejamento experimental.

#### 4.6 MONITORAMENTO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO RESIDUAL DA ENZIMA

As atividades de esterificação residuais foram medidas ao final de cada reação para comparação com a atividade de esterificação pré-reacional, avaliando-se dessa forma a estabilidade da enzima. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de confiança, e estão expressos na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7** - Atividade de esterificação do biocatalisador antes e após as reações de glicerólise, na ausência e na presença de surfactantes.

<b>Reação</b>	<b>Atividade de esterificação [U/(mg - biocatalisador)]</b>
Pré-reação	0,276 <sup>a</sup> ± 0,02
Sem surfactante	0,284 <sup>a</sup> ± 0,06
Tween 65	0,312 <sup>a</sup> ± 0,14
Tween 80	0,290 <sup>a</sup> ± 0,03
Tween 85	0,320 <sup>a</sup> ± 0,07
Lecitina de soja	0,389 <sup>a</sup> ± 0,03

Metodologia adaptada de Oliveira et al.(2006), utilizando ácido oleico e temperatura de 40 °C.

Comparando os dados da pré-reação com as demais amostras após a reação de glicerólise observa-se que não houve diferença significativa nos valores de atividade de esterificação da enzima Lipozyme TL IM.

O principal objetivo da imobilização enzimática é a reutilização dos biocatalisadores, e isso significa que a enzima imobilizada precisa ser suficientemente estável para ser reutilizada em vários ciclos de reação (LASZLO; EVANS, 2007).

A elevada estabilidade da Lipozyme TL IM estimula a sua utilização nas mais diversas reações (com e sem solventes), muitos processos podem ser catalisados por esta enzima.

Hong, Xuedan e Minhua (2011) realizaram uma reação típica de transesterificação a fim de obter um pró-fármaco potencial de 5-fluorouridina utilizando a Lipozyme TL IM, que manteve 96,3% da sua atividade original depois de ser reutilizada por 10 ciclos.

Em outro relato, após reações de esterificação este catalisador manteve 90% da atividade após 10 ciclos de reação em microemulsões com Tween 20 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Através dos resultados apresentados na Tabela 4.7, nota-se a manutenção da atividade de esterificação do biocatalisador após ser utilizado nas diversas reações, confirmando a estabilidade da Lipozyme TL IM descrita por diversos autores. Estes valores, porém, não descrevem o comportamento do biocatalisador em caráter de reuso, pois os valores foram medidos após apenas uma reação de glicerólise. Contudo, deve-se ressaltar que o resultado desta análise foi promissor, tendo em vista que em nenhuma das reações o biocatalisador demonstrou perda inicial de atividade de esterificação, salientando a viabilidade econômica do processo.

#### 4.7 REAÇÕES DE GLICERÓLISE CONTENDO TWEEN 65 E SEM SURFACTANTE

Levando-se em conta a formação de DAGs obtidos nas cinéticas das reações de glicerólise, a atividade enzimática da Lipozyme TL IM e com base na literatura, definiu-se a continuidade do estudo de produção de DAGs utilizando-se os meios reacionais com surfactante de grau alimentício Tween 65 por este ter destacado-se com a maior produção de DAGs nas cinéticas das glicerólises (21,40%), e apresentado em outros trabalhos (VALÉRIO et al., 2009; FELTES et al., 2010) o melhor desempenho entre os surfactantes utilizados.

Também optou-se por realizar um novo estudo sem a presença de surfactante, para melhor avaliar o fenômeno de encapsulação da enzima pelo glicerol, o que foi detectado em vários ensaios neste trabalho (de menor a maior grau de encapsulamento), sendo que esse fenômeno tem sido descrito para outros biocatalisadores, mas parece afetar de forma mais contundente a Lipozyme TL IM (YANG et al.,

2005; YEOH et al., 2009), reduzindo a atividade enzimática e prejudicando a reação.

A seguir serão apresentados os resultados para os estudos realizados através de planejamentos experimentais.

#### 4.7.1 Reações de Glicerólise Contendo Tween 65

As condições da reação de glicerólise dependem diretamente das condições de processo utilizadas, bem como das características físico-químicas dos substratos. Dentre as variáveis que afetam a reação, pode-se citar a proporção molar dos substratos, a concentração de enzima ou de surfactante, o tempo da reação de glicerólise, a temperatura, a agitação, a pureza dos reagentes, entre outros fatores. A matriz do planejamento experimental  $2^{4-1}$  com os resultados da concentração mássica de DAG (%) está apresentada na Tabela 4.8 a seguir.

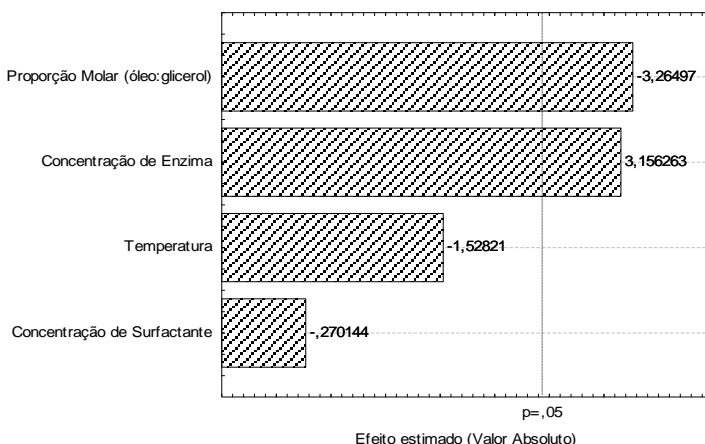
**Tabela 4.8** – Matriz do planejamento experimental  $2^{4-1}$  (valores codificados e reais) com resposta em termos de concentração mássica de diacilgliceróis (%) para a glicerólise de óleo de peixe em presença do surfactante Tween 65.

Ensaio	Temp. (°C)	Óleo:glicerol (mol/mol)	Tween 65 (%)	Enzima (% m/m)	DAG (%)
1	40 (-1)	1:0,5 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	5,25
2	70 (+1)	1:0,5 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	2,60
3	40 (-1)	1:1 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	2,75
4	70 (+1)	1:1 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	1,71
5	40 (-1)	1:0,5 (-1)	15 (+1)	15 (+1)	15,27
6	70 (+1)	1:0,5 (-1)	5 (-1)	15(+1)	11,87
7	40 (-1)	1:1 (+1)	5 (-1)	15 (+1)	5,58
8	70 (+1)	1:1 (+1)	15 (+1)	15 (+1)	1,88
9	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	10 (0)	5,41
10	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	10 (0)	5,52
11	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	10 (0)	7,40

Pode-se observar pelos resultados da matriz apresentada na tabela 4.8 que o melhor resultado quanto a formação de DAGs (%) foi de 15,27% referente ao ensaio nº 5 do planejamento, onde a temperatura foi de 40 °C, a concentração molar (óleo:glicerol) de 1:0,5 (mol/mol), com a utilização de 15% de Tween 65 e 15% de enzima (m/m).

Os resultados do planejamento  $2^{4-1}$  foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 4.10.

**Figura 4.10** – Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis avaliadas sobre a produção de diacilgliceróis em glicerólise enzimática de óleo de peixe.



A razão molar (óleo:glicerol) entre os substratos apresentou efeito negativo significativo, já a concentração de enzima apresentou um efeito positivo significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a produção de DAGs. A temperatura e a concentração de surfactante não apresentaram efeito significativo sobre a produção de DAGs.

Com base nos resultados do primeiro planejamento de experimentos, um planejamento experimental fatorial  $2^2$  foi realizado, mantendo-se constante a velocidade de agitação (600 rpm), tempo de reação (6 horas), concentração de surfactante (5%) e temperatura (40 °C), variando a concentração de enzima e a razão molar entre os substratos.



A Tabela 4.9 apresenta a matriz do segundo planejamento de experimentos com as respostas para a produção de DAGs. A formação de 20,76% (experimento 4) está relacionada a concentração de enzima (25%) e razão molar dos substratos de 1:0,5 (óleo:glicerol), mostrando o efeito positivo dessas variáveis sobre a conversão do produto, cuja proporção máxima é de 50% (mol:mol) por se tratar de uma razão molar de 1:0,5 (óleo:glicerol).

**Tabela 4.9** - Matriz do planejamento de experimentos fatorial 22 com triplicata do ponto central, (valores reais e codificados) com as respostas de formação de diacilgliceróis após 6 h de reação.

<b>Ensaio</b>	<b>Razão Molar (óleo:glicerol)</b>	<b>Enzima (%)</b>	<b>Produção DAG (%)</b>	<b>Predito (%)</b>	<b>EPR*</b> (%)
1	-1 (1:0,1)	-1 (15)	6,834	7,298	6,788
2	-1 (1:0,1)	1 (25)	7,736	8,199	5,990
3	1 (1:0,5)	-1 (15)	15,100	15,564	3,070
4	1 (1:0,5)	1 (25)	20,766	21,229	2,230
5	0 (1:0,3)	0 (20)	13,865	13,073	5,713
6	0 (1:0,3)	0 (20)	13,354	13,073	2,108
7	0 (1:0,3)	0 (20)	13,865	13,073	5,713

\*Erro padrão relativo

Os resultados obtidos no segundo planejamento deste experimento foram analisados estatisticamente e permitiram a construção de um modelo empírico codificado para a produção de DAGs em função da razão molar entre os substratos e da concentração de enzima. O modelo empírico resultante foi validado pela análise de variância (ANOVA). O valor de R-quadrado (0,98) e o teste F ( $F_{\text{cal}}=59,192$   $F_{\text{tab.}}= 9,276$ ) para a regressão mostraram que o modelo (Equação 4) foi capaz de representar os dados experimentais para a produção de DAGs no intervalo dos fatores investigados. Isso implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo empírico, conforme ilustrado pela conversão predita (coluna 5 da Tabela 4.9) e o erro padrão relativo (EPR) (coluna 6 da Tabela 4.9).

$$DAG = 5,667 + 2,799 * Gli - 0,029 * E + 1,191 * Gli * E \quad \text{Equação (4)}$$

Onde:

Gli = razão molar (óleo:glicerol, mol:mol)

E = concentração de enzima (% m/m).

A partir da análise dos resultados pode-se constatar que a reação de glicerólise enzimática apresentou produção máxima de DAGs de 20,76 %, utilizando temperatura de 40 °C, concentração de enzima 25 % (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5, e concentração de surfactante (Tween 65) de 5 %, após 6 h de reação.

Pode-se considerar um excelente resultado quando comparado a formação de DAGs (%) encontrada nas primeiras reações de glicerólise, onde obteve-se um máximo de 21,40% de DAG após 48 h de reação (Figura 4.9), com a otimização obteve-se praticamente a mesma formação de DAG (%) em 6 h de reação.

No trabalho de Feltes et al. (2010), através da glicerólise enzimática de óleo de peixe, utilizando 10% de enzima Novozym 435 (m/m), a temperatura de 55 °C, concentração molar 1:2 de óleo/glicerol, 600 rpm por 2 horas de reação foram obtidos: 19,41 % de DAG em presença de surfactante Tween 65, 15,55 % de DAG com o Tween 80 e 17,04 % com o Tween 85.

Valério et al. (2009), em reação semelhante com óleo de soja como fonte de TAG, utilizando 9 % de enzima Novozym 435 (m/m), a 70 °C por 2 horas, com uma concentração molar de 1:6 (óleo:glicerol), 600 rpm e 16 % de surfactante (m/m), obtiveram um total de 43% (MAG + DAG) utilizando o Tween 65 e 37,02 % (MAG + DAG) utilizando Triton X-100.

Yeoh et al. (2009) compararam o desempenho das enzimas Novozym 435, Lipozyme TL IM e Lipozyme TL RM, utilizando óleo de palma como fonte de TAG, na proporção molar de 1:1,5 (óleo:glicerol), 10% de enzima em relação a massa do óleo, a 55 °C e 200 rpm por 24 horas, onde obtiveram a formação de 43-50 % de DAG com a Novozym 435, para as enzimas Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, após o processo de adsorção do glicerol em sílica por 24 horas, foram obtidos 52 e 45 % de DAG respectivamente.

Em seus trabalhos Yang et al. (2005), utilizando a enzima Novozym 435 e óleo de girassol como fonte de TAG, na proporção de

1:4,5 (óleo:glicerol, mol/mol), 700 rpm a 40 °C, com a utilização de solvente, obteve 70 % de MAG e 27% de DAG após 2 horas de reação. Em outro trabalho dos mesmos autores (2003), com a enzima Lipozyme TL IM, também com óleo de girassol, utilizando 20 % de enzima (m/m), 40 °C, 300 rpm durante 17 horas, com redução para 200 rpm e 5 °C até completar 24 horas, com proporção molar de 1:1 (óleo:glicerol, mol/mol), obteve 5 % de MAG e 50 % de DAG.

No trabalho de Khor et al. (2010) foi realizado um estudo termodinâmico da Lipozyme TL IM na produção de biodiesel, onde foi observado um aumento na velocidade inicial da reação de 30 °C a 40 °C, destacando 40 °C como a temperatura ideal para a reação e as temperaturas acima de 40 °C acarretaram a redução na velocidade inicial da reação. Neste caso a produção de ésteres de ácidos graxos alcançado a 40 °C foi de 83,2%, este valor corresponde ao rendimento relatado de 85,8% em outro trabalho (DIZGE; KESKINLER, 2008), também na temperatura ideal de 40 °C na transesterificação de óleo de canola pela lipase *T. lanuginosus*.

Avaliando-se os resultados obtidos nos experimentos e os trabalhos pesquisados pode-se verificar um desempenho favorável da Lipozyme TL IM, principalmente na temperatura de 40 °C, a atuação positiva do surfactante Tween 65 na produção de DAGs, e em função da fonte de TAG utilizada (óleo de peixe), rica em EPA e DHA, é bem provável que os produtos da reação, resultem em 1,3-DAGs com EPA e DHA.

#### **4.7.2 Reações de Glicerólise sem Surfactante**

As reações de formação de DAGs dependem diretamente das condições de processo utilizadas e das características físico-químicas dos substratos. Avaliando estas condições de processo utilizou-se um planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>3</sup>, com triplicata do ponto central, onde as variáveis estudadas foram a razão molar (óleo:glicerol), a concentração de enzima e temperatura, mantendo constante o tempo de reação de 6 horas e agitação mecânica de 600 rpm, com o intuito de otimizar as variáveis (temperatura, glicerol, enzima) para a produção de DAGs.

A Tabela 4.10 apresenta a matriz do planejamento de experimentos com os valores codificados e reais e as respostas em termos de conversão de DAGs (%).

Observa-se nessa tabela que os melhores resultados foram obtidos nos experimentos 2, 6 e 11 os quais apresentaram concentração mássica de 13,11%; 15,14% e 13,04% respectivamente.

**Tabela 4.10** – Matriz do planejamento experimental para otimização das variáveis avaliadas para a produção de diacilgliceróis de óleo de peixe sem a presença de surfactante.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Óleo:glicerol (mol/mol)</b>	<b>Enzima (% m/m)</b>	<b>DAG (%)</b>
1	40 (-1)	1:0,5 (-1)	5 (-1)	4,11
2	70 (+1)	1:0,5 (-1)	5 (-1)	13,11
3	40 (-1)	1:1 (+1)	5 (-1)	2,10
4	70 (+1)	1:1 (+1)	5 (-1)	0,99
5	40 (-1)	1:0,5 (-1)	15 (+1)	7,09
6	70 (+1)	1:0,5 (-1)	15 (+1)	15,14
7	40 (-1)	1:1 (+1)	15 (+1)	4,53
8	70 (+1)	1:1 (+1)	15 (+1)	2,88
9	38 (-1,68)	1:0,75 (0)	10 (0)	4,19
10	80 (1,68)	1:0,75 (0)	10 (0)	8,46
11	55 (0)	1:0,33 (-1,68)	10 (0)	13,04
12	55 (0)	1:1,17(1,68)	10 (0)	3,30
13	55 (0)	1:0,75 (0)	1,6 (-1,68)	0,47
14	55 (0)	1:0,75 (0)	18,4 (1,68)	8,65
15	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	2,90
16	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	3,56
17	55 (0)	1:0,75 (0)	10 (0)	4,17

Os resultados obtidos no planejamento experimental foram analisados estatisticamente e permitiram a construção de um modelo empírico codificado para a formação de DAGs em função da razão molar dos substratos concentração de enzima e temperatura. O modelo

empírico resultante foi validado pela análise de variância (ANOVA), apresentado na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11** - Efeitos das variáveis avaliadas no rendimento de diacilglicerol.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Fcal	Ftab
Regressão	311,162	9	34,574	26,886	3,677
Resíduo	9,001	7	1,286		
<b>Total</b>	<b>313,154</b>				

\*Nível de 95% de confiança; R= 0,97.

$$\text{DAG} = 3,56 + 1,57*T + 0,92*T^2 - 3,32*Gli + 1,57*Gli^2 + 1,69*E + 0,29*E^2 - 2,47*T*Gli - 0,18*T*E - 0,08*Gli*E \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

T = temperatura (°C)

Gli = razão molar (óleo:glicerol, mol:mol)

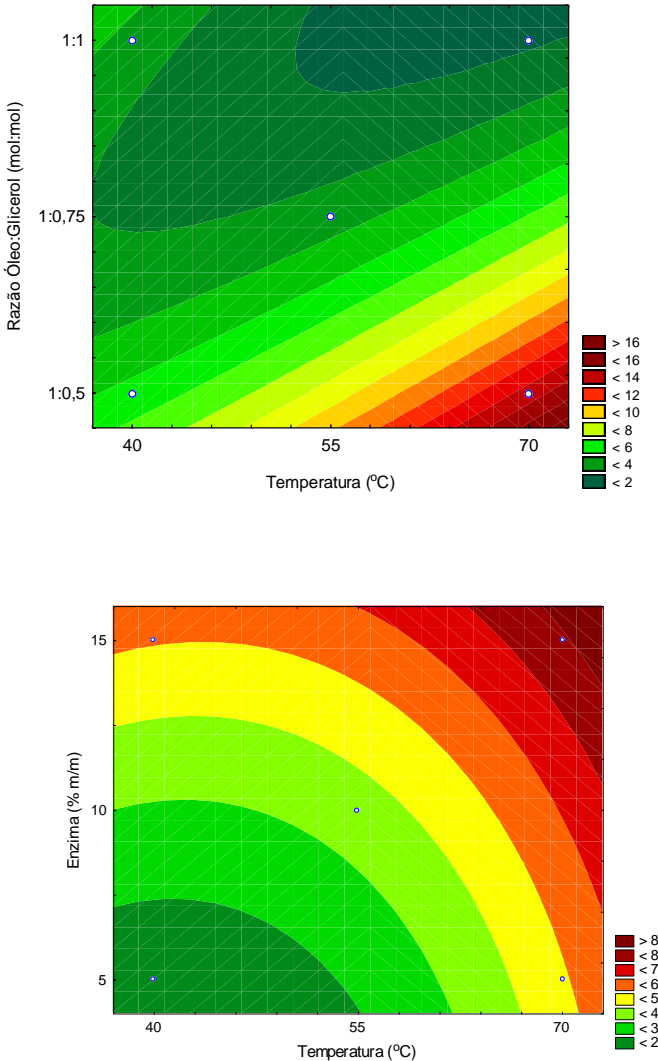
E = concentração de enzima (% m/m).

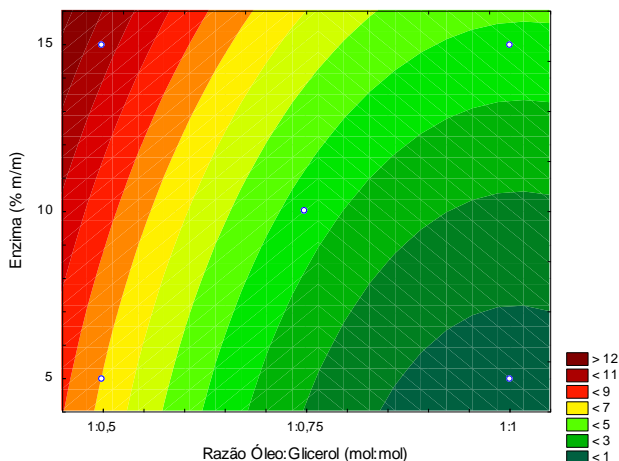
Na Figura 4.11, o aumento da temperatura e menores razões molares apresentam uma tendência no aumento da conversão de DAGs. Isto porque, o acréscimo da temperatura pode aumentar as chances de colisão das moléculas do substrato e as enzimas, formando complexo enzima-substrato, levando a um aumento da atividade da enzima no qual a viscosidade dos fluidos diminui, aumentando assim a solubilidade dos mesmos, melhorando a difusão dos substratos, reduzindo as limitações de transferência de massa, acarretando maior velocidade de reação, em função do favorecimento das interações entre as partículas de enzima e substratos (ANTCZAK et al., 2009; ZHONG et al., 2010; WANG et al., 2010).

O valor de coeficiente de correlação (R= 0,97) e o F-teste calculado (26,886) e tabelado (3,677) para a regressão mostrou que o modelo (Equação 5) foi capaz de representar os dados experimentais de

conversão de DAGs no intervalo dos fatores investigados e permitiu a construção das curvas de contorno apresentadas na Figura 4.11.

**Figura 4.11** – Curvas de contorno com os efeitos das variáveis (razão molar, concentração de enzima e temperatura) na produção de DAG.





Os resultados indicaram que utilizando 70 °C, razão molar de 1:0,5 (óleo/glicerol) e 5 % de enzima, obteve-se a formação em torno de 13,76 % de DAGs. Apesar da concentração de enzima de 15 % apresentar um leve aumento na formação em relação a 5 % de enzima, optou-se por considerar a menor concentração de enzima em função da diminuição dos custos com mesma.

Observou-se também diferentes graus do fenômeno de encapsulação da enzima pelo glicerol, desde a formação de uma leve película ao redor da enzima até a formação de um aglomerado completo entre enzima e glicerol.

A formação da película ocorreu para todas as reações onde a proporção molar (óleo:glicerol) utilizada foi de 1:0,75. Também ocorreu a formação de um aglomerado único em menos de cinco minutos de reação para os ensaios 3, 4, 8, 12 e 13, para a maioria destes ensaios a proporção molar foi de 1:1 (óleo:glicerol), exceto para o ensaio de número 13 que teve a proporção molar de 1:0,75 (óleo:glicerol), porém com uma concentração de enzima baixa (1,6 %, m/m).

No presente estudo a condição que propiciou a não formação de aglomerados entre a enzima e o glicerol e com maior rendimento em DAG ocorreu na proporção molar (óleo:glicerol) de 1:0,50, com uma produção aproximada de 13,76 % de DAGs .

Yang et al. (2005) relataram que no sistema de glicerólise em função da presença do glicerol, as enzimas se agregam mesmo sob agitação e não é possível a sua distribuição uniforme na reação. Em seu estudo, especialmente para a Lipozyme TL IM não foi possível manter a partícula desta enzima estável sob a presença do glicerol, em função de seu suporte à base de sílica o que lhe confere a característica de elevada hidrofobicidade. Neste aspecto pode-se considerar que o presente trabalho apresentou um grande avanço, pois chegou-se a bons resultados através da otimização das condições de reação de glicerólise.

Segundo Khor et al. (2010), a maior dificuldade na glicerólise é a miscibilidade baixa do glicerol em óleos e gorduras, a princípio essa miscibilidade pode ser melhorada até certo grau pelo aumento da temperatura. Porém uma temperatura mais elevada pode afetar a estrutura proteica da enzima, diminuindo a estabilidade da mesma, afetando a atividade enzimática (RANGANATHAN; NARASIMHAN; MUTHUKUMAR, 2008).

Segundo Yang et al. (2005), no sistema de glicerólise, muitas vezes o glicerol se liga à enzima dificultando o acesso das moléculas de óleo à enzima, dessa forma a eficiência da reação normalmente é baixa. Há pouco tempo alguns solventes, como hexano e *tert*-butanol, foram utilizados em glicerólise enzimática a fim de promover a melhor homogeneidade do sistema e melhorar o desempenho das reações, (ELFMAN-BORJESSON e HARROD, 1999; RENDÓN; LÓPEZ-MUNGUÍA; CASTILLO, 2001; FELTES, 2011). Esta linha de pesquisa tende a diminuição de interesse pela indústria devido aos altos custos e a toxicidade elevada dos solventes empregados (BORNSCHEUER 1995; PENG; XU; TAN, 2000).

Por tudo que já foi relatado, o problema da baixa miscibilidade entre os componentes do sistema de glicerólise, as características hidrofílicas do suporte da Lipozyme TL IM, a termosensibilidade das enzimas, o alto custo e toxicidade dos solventes. Concluiu-se que uma ótima opção para este processo é a inclusão de emulsificantes no sistema de glicerólise, de preferência emulsificantes de grau alimentício como os testados neste trabalho, e para o caso específico da Lipozyme TL IM destacou-se com maior rendimento em DAGs o Tween 65.



### 4.7. 3 Monitoramento do Índice de Acidez

O monitoramento do índice de Acidez (IA) do meio ao final da reação foi fundamental para a verificação da ocorrência de oxidação e hidrólise do óleo de peixe, como decorrência das condições aplicadas durante as reações de glicerólise enzimática. Os resultados do monitoramento das reações de glicerólise (antes e após 6 horas de reação) com o surfactante Tween 65 e sem surfactante estão expressos na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12** - Resultados do monitoramento do índice acidez nas reações de glicerólise com Tween 65 e sem surfactante.

Amostras	IA
<b>Óleo (OmegaPure)</b>	<b>0,081</b>
Tween 65*	1,211
Sem Surfactante*	1,371

\*Média dos resultados

Através dos resultados apresentados percebe-se que, nas condições aplicadas, ocorreu certo nível de oxidação do óleo de peixe durante a reação, o que pode ser atribuído às temperaturas utilizadas e ao contato com o oxigênio do ar durante o processo.

Para a análise de índice de acidez os valores encontrados apresentaram-se dentro do limite da legislação, utilizou-se como referência o valor máximo de 2,8 (g de ácido oleico/g de óleo), indicado pelos padrões da ANVISA referente aos óleos de bacalhau e de cação (BRASIL, 1995).

Parte da manutenção da qualidade dos produtos neste trabalho, provavelmente ocorreu pelo rigoroso controle durante o processo de manipulação dos substratos (rápida preparação e pesagem, vedação dos frascos), na reação de glicerólise (reator com tampa), no tratamento das amostras (evaporação dos solventes à vácuo) e no armazenamento (produto imediatamente inertizado com nitrogênio e congelado).

O processo de inertização foi realizado tanto para o óleo de peixe estocado (logo após a pesagem), como para os produtos obtidos nas reações, assim o ar presente no espaço livre dos frascos de

armazenamento foi substituído por nitrogênio gasoso, formando uma atmosfera protetora, que prolonga a vida útil do produto estocado.

Segundo Feltes et al. (2010), o óleo de peixe OmegaPure® utilizado neste trabalho é composto dos seguintes ácidos graxos (% em proporção relativa): mirístico (8,65), palmítico (18,48), palmitoléico (11,47), esteárico (3,60), oléico (10,15), linoléico (2,10), linolênico (1,71), estearidônico (3,14), araquidônico (1,21), EPA (13,34), docosapentaenóico – DPA (2,47) e DHA (13,34). Constituinto-se em uma fonte dos ácidos graxos ômega-3 (EPA, DPA e DHA) com teor total de 29,15%.

Quanto maior o grau de insaturação do óleo maior a propensão à oxidação. Como foi citado anteriormente, os óleos de peixes são muito suscetíveis a processos oxidativos em função do grau de insaturação de seus ácidos graxos, o que compromete a integridade das duplas ligações, e consequentemente a concentração e a funcionalidade dos ácidos graxos EPA e DHA de suma importância para o organismo humano (SILVA; QUEIROZ, 2002).

O óleo obtido precisa de proteção adequada por meio de adição de antioxidantes, injeção de gases inertes e embalagem em recipientes hermeticamente fechados, a fim de garantir sua qualidade para o consumo humano (LANDS, 2005; FELTES, 2011).

Com base nestes resultados presume-se que os DAGs formados tenham mantido uma boa qualidade nos seus ácidos graxos poli-insaturados.

Diante do exposto, observou-se que o grande desafio nas reações de glicerólise catalisadas pela Lipozyme TL IM, foi a homogeneização dos substratos utilizados, entretanto, as análises de monitoramento mostraram a manutenção da qualidade dos produtos obtidos, proporcionando maior segurança na sua utilização comercial. Além disso, pode-se destacar como potenciais desta lipase a possibilidade de reuso nos processos em função da sua alta estabilidade (LASZLO; EVANS, 2007; HONG; XUEDAN; MINHUA, 2011), bem como, a sua especificidade na formação de 1,3 DAGs (FERNANDES-LAFUENTE, 2010), e a probabilidade de que os produtos obtidos tenham agregados a sua composição os ácidos graxos EPA e DHA, indispensáveis à dieta humana (FELTES et al., 2011; SANTOS et al 2013), porém para confirmar a funcionalidade dos DAGs obtidos se faz necessário uma análise adequada dos produtos.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos através deste trabalho permitiram fazer as seguintes conclusões:

As análises de avaliação da qualidade do substrato mostraram que o óleo de peixe OmegaPure<sup>®</sup> utilizado como fonte de triacilgliceróis apresentou a qualidade necessária para consumo humano e, por conseguinte, indicou a manutenção da integridade de boa parte de seus ácidos graxos poli-insaturados.

Os surfactantes testados (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e Lecitina de Soja) foram alterados pela enzima Lipozyme TL<sup>®</sup> IM, ou seja, foram utilizados como substrato pela enzima, isto ocorreu especialmente com a Lecitina de soja e o Tween 85, porém, pela baixa concentração de surfactante utilizada para auxiliar as reações de glicerólise, presume-se que tal fator não interfira na função de homogeneização dos surfactantes.

O biocatalisador manteve a atividade de esterificação após 48 h de reação de glicerólise em presença dos surfactantes de grau alimentício, confirmando a estabilidade da Lipozyme TL IM e salientando a viabilidade econômica do processo.

Entre os surfactantes testados nas cinéticas das reações de glicerólise, o surfactante Tween 65 apresentou após 48 h o maior desempenho na formação de DAGs (21,40%), onde as condições de reação foram: temperatura de 40 °C, concentração de enzima 5% (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5, concentração de surfactante (Tween 65) de 5%, sob agitação constante de 600 rpm.

Os planejamentos experimentais utilizados contribuíram para avaliar as condições das reações na formação de diacilgliceróis (%). Sobre os melhores resultados obtidos em 6 h de reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe (OmegaPure<sup>®</sup>) com a utilização da enzima Lipozyme TL<sup>®</sup> IM como biocatalisador pode-se dizer que:

A reação de glicerólise com o surfactante Tween 65, à temperatura de 40 °C, concentração de enzima 25% (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5, concentração de surfactante de 5%, sob agitação constante de 600 rpm, apresentou em 6 horas de reação a formação de 20,76% de diacilgliceróis.

A reação de glicerólise enzimática sem surfactante, à temperatura de 70 °C, concentração de enzima de 5% (m/m de substrato), razão molar entre óleo de peixe e glicerol de 1:0,5 sob agitação mecânica de 600 rpm, apresentou em 6 horas de reação a formação aproximada de 13,76% de diacilgliceróis.

De maneira geral, verificou-se que tanto a reação de glicerólise em presença do surfactante (Tween 65) como a reação sem o surfactante favorecem a formação de diacilgliceróis. Na prática, para produção em maior escala, é importante levar em consideração o custo benefício dos processos: para a reação com Tween 65, o custo do próprio surfactante e da enzima que para esta primeira condição foi utilizada em maior concentração, já para a reação sem surfactante o custo da energia empregada, já que esta segunda condição necessita do uso de maior temperatura.

A utilização do biocatalisador imobilizado Lipozyme TL IM mostrou-se viável em relação à reação de glicerólise de óleo de peixe, pois obteve-se uma razoável formação de diacilgliceróis, 20,76% e 13,76% nas reações com e sem surfactante respectivamente, levando em consideração que a formação máxima possível (nas condições deste trabalho) seria em torno de 33% de diacilgliceróis. Sendo provável a formação de diacilgliceróis ricos em ácidos graxos EPA e DHA provenientes do óleo de peixe.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser sugeridas:

- Avaliar o número de ciclos de utilização da Lipozyme TL IM, especialmente em glicerólise com a presença do surfactante de grau alimentício Tween 65.

- Aplicar técnica analítica adequada para a quantificação de AGL, MAG, DAG e TAG contido nos produtos das reações de glicerólise com óleo de peixe.

- Quantificar o teor de EPA e DHA dos produtos obtidos nas reações de glicerólise.

- Estudar a reação de glicerólise enzimática em sistema de batelada alimentada.

- Realizar a separação de MAGs e DAGs ao final da glicerólise enzimática.

- Testar a utilização do ultrassom para glicerólise com a Lipozyme TL IM.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C.A. **Oxidations and antioxidants**. In: Nutricines. Food components in Health and Nutrition. Universidade de Nottingham. Cap. 2, p. 11-34, 1999.

ALVARENGA, B. M.; SOARES, M. A. Potencialidade de produção de biodiesel por óleos e gorduras residuais na cidade de Itabira-MG. **Revista Ceres**, v. 57, n. 6, 2010.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p.1185–1194, 2009.

ARAGÃO, V. C.; ANSCHAU, A.; PORCIUNCULA, B. D. A.; THIESEN, C.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V.; BURKRT, J. F. M. Síntese Enzimática de Butirato de Isoamila Empregando Lipases Microbianas Comerciais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2268-2272, 2009.

ARAÚJO, J. M. A., **Química de Alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Atual. Ampl. Viçosa, MG: ED. UFV, 2011.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: Um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26, p. 56-62, 2007.

BABICZ, I.; LEITE, S. G. F.; SOUZA, R. O. M. A.; ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.

BANSAL, K.; McCRADY, J.; HANSEN, A.; BHALERAO, K. Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel. **Fuel**, v. 87, p. 369-3372, 2008.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, Campinas, v.30, n.2, p. 409-414, 2007.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; DE LIMA, D. P. Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v.xy, p. 1-14, 2011.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D.L. Determinação da solubilidade protéica de farinhas de subproduto de aves com a pepsina em baixa concentração. In: CONFERENCIA APINCO 2003. FACTA. Campinas. **ANAIS da Conferencia APINCO 2003**, p 82, 2003.

BENDIKIENĖ, V.; SURINĖNAITĖ, B.; BACHMATOVA, I.; MARCINKEVIČIENĖ, L.; JUODKA, B. The specificity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. Hydrolysis. **Biologija**, n. 1, p. 27-30, 2005.

BENITES, C. I.; SBAITE, P.; MARTINS, P. F.; MACIEL, M. R. W. Produção de monoacilgliceróis por glicerólise do óleo de canola. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ. **ANAIS do COBEQ**, p. 7195-7201, 2010.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003.

BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 578-586, 1995.

BOYLE, E. Monoglycerides in food systems: current e future uses. *Food Technology*, v. 51, p. 52-59, 1997; He, X-L.; Chen, B-Q.; Tan, T-W.; **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 18, p. 333, 2002.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – Área: Alimentos. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, "REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS,



GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set. de 2005.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - Área: Alimentos. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997, "REGULAMENTO TÉCNICO: ADITIVOS ALIMENTARES - DEFINIÇÕES, CLASSIFICAÇÃO E EMPREGO ". **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 de out. de 1997.

BROUGHTON, K. S; JOHNSON, C. S; PACE, B. K; LIEBMAN, M; KLEPPINGER, K. M. Reduced asthma symptoms with *n*-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 1011-1017, 1997.

CAMPOS, P. R. B. **Acidólise enzimática de óleo de soja para obtenção de triacilgliceróis estruturados funcionais**. Dissertação (mestrado), 69 p. – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Bragança Paulista, 2010.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T. & SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n.1, p.75-80, 2003.

CASTRO, H. F. D. ; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificações de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO, H. F. D.; ANDERSON, W. A. Fine Chemicals by Biotransformation using Lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.

CHEONG, L. Z.; TAN, C. P.; LONG, K.; YUSSOF, M. S. A.; ARIFFIN, N.; LO, S. K.; LAI, O. M. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. **Food Chemistry**, n. 105, p. 1614-1622, 2007.

CNPE. Resolução CNPE nº 6 de 16/9/2009. Brasília: Conselho Nacional de Política Energética 2009.

COLLI, C. Nutracêutico é uma nova concepção de alimento. **Notícias SBAN** (Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição). v. 1, p.1-2, 1998.

CORREIA, A. C.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Produção de Emulsionantes através da Glicerólise de Óleo de Bagaço de Azeitona Catalisada pela Lipase da *Candida Rugosa* Imobilizada em Espumas de Poliuretano. **Millenium**, v. 41, p.7-15, 2011.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**. V.22, n.6, p. 863-873, 1999.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p. 9-18, 2011.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DARIO, M. **Recuperação da glicerina oriunda do processo de produção de biodiesel** – Um processo Quimúrgico. Monografia de graduação em Química-Bacharelado. UFMT, 2006.

DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; MARTINS, R. C.; ROCHA, W. L.; DIAS, A. R. Activity and stability of a Rhizomucor miehei lipase in hydrophobic media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 26, p. 31-38, 1997.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y.; GREEN, R.; KOBOS, P. M.; JOERGER, R.; HAAS, M. J.; DEREWENDA, Z. S. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, p. 524-534, 1994.

DIECKELMANN, G.; HEINZ, H.J. The Basics of Industrial Oleochemistry. **Publisher P. Pomp**, 1988.

DIZGE, N., KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass Bioenergy**, n.32, p.1274–1278, 2008.

DOS SANTOS, N. B. L. e REZENDE, M. J. C. Produção de Monoacilgliceróis: Rotas e Catalisadores. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 118-129, publicação na Web: 5 de abril de 2012. Site: <http://www.uff.br/rvq>

ELFMAN-BORJESSON, I. e HARROD, M. Synthesis of monoglycerides by glycerolysis of rapeseed oil using immobilized lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n. 76, p. 701–707, 1999.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**.4 ed. Berlin: Springer, 2000.

FELTES, M. M. C. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega 3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2011.

FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, D.; BLOCKC, J. M.; NINOW, J. L. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. DOI 10.1007/s11947-012-0836-3. **Food and Bioprocess Technology**, 2012.

FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, J. V. An Overview of Enzyme-Catalyzed Reactions and Alternative Feedstock for Biodiesel Production. In: Mantanera (org) **Alternative Fuel**, p. 21-46, 2011.

FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; BLOCK, J. M.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. Assessment of process parameters on the production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through the enzymatic glycerolysis of fish oil. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 5, p. 701-710, 2010.

FELTES, M. M. C.; PITOL, L. O.; CORREIA, J. F. G.; GRIMALDI, R.; BLOCKC, J. M.; NINOW, J. L. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.

FELTES, M.M.C., VILLENEUVE, P., BARÉA, B., BAROUH, N., OLIVEIRA, J.V., OLIVEIRA, D., NINOW, J.L. Enzymatic production of monoacylglycerols and diacylglycerols from fish oil in a solvent-free system (No prelo). DOI 10.1007/s11746-011-1998-2. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2011.

FERNANDES, M. L. M.; KRIEGER, N.; BARON, A. M.; ZAMORA, P. P.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, p. 43–49, 2004.

FERNANDES, M. R. **Desenvolvimento de um novo combustível microemulsionado base diesel**. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-graduação em Engenharia, Natal – RN, 2005.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197-212, 2010.

FERNÁNDEZ-SAN JUAN, P. M. Fatty acid composition of commercial Spanish fast food and snack food. *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 13, p. 275–281, 2000.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; FONSECA, M. M. R. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, p. 699-711, 2001.

FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of solvent-free lipase catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in Aerosol-OT Surfactant. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 2, p. 708-712, 2009.

FIRESTONE, D. (Ed.). **Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**, Champaign: AOCS Press, 1999.

FILHO, L. C. G.; MIKE, G. A. Determinação de glicerina total em amostras de biodiesel por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, n.30, p. 82-88, 2007.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; FILHO, R. M.; BATISTELLA, C. B. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. **Química Nova**, V. 32, N. 6, p. 1539-1543, 2009.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. Monoglicerídios: produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v.31, n. 6, p. 1514-1521, 2008.

FREITAS, L.; CASTRO, M. B. A.; BRUNO, L. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Utilização do glicerol residual obtido na produção de biodiesel para a síntese de monoglicerídios via glicerólise enzimática. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ). **ANAIS do XVII COBEQ**, Recife, 2008.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p.1360-1366, 2007.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.

GROMPONE, M. A. Mono- y di-glicéridos(No prelo), In: BLOCK, J. M. e BARRERA-ARELLANO, D. (Ed.) **Temas Selectos em Aceites y Grasas**. 1. São Paulo: Editora Blücher, v. 2, 2011.

HASLER, C.M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 52, n. 11, p. 63-70, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. In: \_\_\_\_\_. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ªed. São Paulo, 533p, 1985.

IUPAC. A Guide to Nomenclature of Organic Compounds Recommendations. IUPAC, 1993.

JUDDE, A., et al. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 80, n.12, p.1209–1215, 2003.

JUTILA, A.; ZHU, K.; PATKAR, S. A.; VIND, J.; SVENDSEN, A.; KINNUNEN, P. K. J. Detergent-Induced Conformational Changes of *Humicola lanuginosa* Lipase Studied by Fluorescence Spectroscopy. **Biophysical Journal**. v. 78, p. 1634–1642, 2000.

KHOR, G. K.; SIM, J. H.; KAMARUDDIN, A. H.; UZIR, M. H. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification. **Bioresource Technology**, v. 101, P. 6558–6561, 2010.

KOBLITZ, M. G. B. **Purificação e caracterização de lipase de *Rhizopus sp.* e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis**. 116 Tese de doutorado em Ciência de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2003.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Diacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis: Screening of Commercially Available Lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p.329-334, 2005.

KRÜGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 131p. (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2010.

KRÜGER, R. L.; VALÉRIO, A.; BALEN, M.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M. L. Improvement of mono and diacylglycerol production via enzymatic glycerolysis in tert-butanol system. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 8, p. 921-927, 2010.

LANDS, W. E. M. **Fish, ômega-3 and human health**. 2<sup>a</sup> ed. Champaign/Illinois: AOCS Press, 2005.

LASZLO, J. A.; EVANS, K. O. Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 48, p. 84–89, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. - **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1995.

LIMA, T. B.; JUNIOR, A. E. Aplicação de surfactantes iônicos e não-iônicos para o controle de cianobactérias. **Anais do XV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas** - 26 e 27 de outubro de 2010.

MACHADO, F. M. S; SANTIAGO, V. R. Os benefícios do consumo de alimentos funcionais. In: Torres EAF, Machado FMS. Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns. São Paulo: **Ponto Crítico**, 2001.

MALACRIDA, C. R. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê - óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Brazilian Journal of Food Technology**. São Paulo, v.6, n.2, p. 245-249, 2003.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n. 6, p. 761-770, Campinas, 2006.

MATSUO, N.; TOKIMITSU, I. Metabolic characteristics of diacylglycerol. **Inform**, v. 12, p. 1098-1102, 2001.

MEDINA, A. R.; CERDÁN, L. E.; GIMÉNEZ, A. G.; PAÉZ, B. C.; GONZÁLEZ, M. J. I.; GRIMA, E. M. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 379-391, 1999.

MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; BRITO, Y. C. A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 63-73, 2013. Acesso em março de 2013. <http://www.uff.br/rvq>

MENTEN, J. F. M.; PEREIRA, P.W. Z.; RACANICCI, A. M. C. Avaliação da glicerina proveniente do biodiesel como ingrediente para rações de frangos de corte. In: Conferência Apinco 2008 de Ciência e Tecnologia Avícolas. **ANAIS da Conferência Apinco 2008**, p. 66, Campinas, 2008.

MIRANDA, K.; BAEZA-JIMÉNEZ, R.; NORIEGA-RODRÍGUEZ, J. A.; HUGO, S.; OTERO, C. Optimization of structured diacylglycerols production containing  $\omega$ -3 fatty acids via enzyme-catalysed glycerolysis of fish oil. *Eur. Food Res. Technol.* 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-012-1889-2>

MORETTO, E.; FETT, R., **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. Livraria Varela, São Paulo, 1998.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

MURASE et al. Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice: dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 1312-1319, 2002.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. HARPER. **Bioquímica ilustrada**. 27 ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

NIE et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 43, p. 142-147, 2006.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**. v. 27, n. 1, 2004.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 373-382, 2006.



OPPE, E. E. G.; SALVAGNINI, W. M.; TAQUEDA, M. E. S. Redução da demanda energética na desidratação da glicerina obtida a partir de biodiesel. In: 8º CONGRESSO IBEROAMERICANO DE ENGENHARIA MECANICA. **ANAIS**. Cusco, 2007.

PACHECO, S. G. A. e REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, n. . 4, v. 29, p. 927-932, 2009.

PADILHA, M. E. da S., AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. n. 27(2), p. 285-290, 2007.

PANDEY, A., BENJAMIN, S., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., KRIEGER, N., SOCCOL, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PENG, L., XU, X. e TAN, T. Enzymatic production of high quality monoacylglycerols. In: **Research Advances in Oil Chemistry** (R.M. Mohan, ed.) GRN, Calcutta, India, p. 53–78, 2000.

PIRES-CABRAL, P.; FONSECA , M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of Ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering**, v. 43, p. 327-332, 2009.

POLLONIO, M. A. R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os envolvidos no consumo. **Higiene Alimentar**, v. 14, p. 26-31, 2000.

PRADO, M. A. C.; JOÃO, J. J.; SKORONSKI, E. Otimização da Síntese de Ésteres Catalizada por Lipozyme TL Imobilizada em Organo-Gel. X Salão de Iniciação Científica – PUCRS. **ANAIS do X Salão de Iniciação Científica**, P. 3074-3076, 2009.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**. V. 5, n. 1, Jan-Fev 2013, end. Eletrônico: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/360/279>

RANGANATHAN, S.V., NARASIMHAN, S.L., MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, n. 99, p. 3975–3981, 2008.

REMONATO, D. **Síntese de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleos de soja e canola em sistema livre de solvente orgânico sob agitação mecânica e em sistema assistido por ultrassom**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2013.

RENDÓN, X., LÓPEZ-MUNGUÍA, A. e CASTILLO, E. Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. **Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCs)**, n. 78, p. 1061–1066, 2001.

RIBEIRO, A. P. B., DE MOURA, J. M. L. N.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G. Interesterificação Química: Alternativa para obtenção de gorduras zero trans. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1295–1300, 2007.

RIBEIRO, E. P., SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Blucher, 2007.

RUBIO-RODRIGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Inovative Food Science and Emerging Technologies**, n. 11, p. 1-12, 2010.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. In: **ANAIS do 4º PDPETRO**, Campinas, São Paulo, Outubro de 2007.

SANTOS, J. S.; BLANCO, S. F. M.; FELTES, M. M. C.; DORS, G.; FURIGO JR, A; NINOW, J. L. Estudo dos efeitos da lipase Lipozyme<sup>®</sup> RM IM nos surfactantes de grau alimentício em reação de glicerólise. In: **Cuarto Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, ANAIS do Cuarto Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (IV EnReBB)**, 2010.

SANTOS, J. S. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, área de concentração de desenvolvimento de processos da indústria de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, 2011.

SANTOS, J. S.; FELTES, M. M. C.; BLANCO, S. F. M.; FARIAS, V. B.; FURIGO JR, A; NINOW, J. L. Atividade enzimática residual e oxidação dos produtos após reação de glicerólise de óleo de peixe com surfactantes de grau alimentício. Nono Simpósio Latino Americano e Sustentabilidade (SLACA), In: **ANAIS do Nono Simpósio Latino Americano e Sustentabilidade**, 2011.

SANTOS, J. S.; DORS, G.; OLIVEIRA, D.; BLANCO, S. F. M. M.; OLIVEIRA, J. V.; JÚNIOR, A. F.; NINOW, J. L.; FELTES, M. M. C. Glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial de *Rhizomucor miehei* em meio com surfactante de grau alimentício. **Química Nova**, v. 36, n.1, 2013.

SAHIN, N ; AKOH, C. C.; KARAALI, A. Enzymatic production of human milk fat substitutes containing  $\gamma$ -linolenic acid: optimization of reactions by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 82, p. 549-557, 2005.

SCHMIDT, M. A. **Gorduras inteligentes: Como as gorduras e os óleos da dieta afetam as inteligências mental, física e emocional**. São Paulo: Roca, 2000.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologie. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, p. 230-240, 1998.

SHIMADA, Y. W.; SUGIHARA, A.; BABA, T.; OOGURI, T.; MORIYAMA, S.; TERAJ, T.; TOMINAGA, Y. Ethyl esterification of docosahexaenoic acid in na organic solvent-free system with immobilized *Candida antarctica* lipase. Osaka Municipal Technical Research Institute, **Journal of Bioscienc and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 19-23, 2001.

SHINODA, K.; ARAKI, M.; SADAGHIANI, A.; KHAN, A.; LINDMAN, B. Lecithin-Based Microemulsions - Phase-Behavior and Microstructure. **Journal Physical Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 989-993, 1991.

SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. **Química nova**, v. 32, n. 5, p. 1253-1261, 2009.

SILVA, D.J. e QUEIROZ, A.C. de. **Análise de alimentos, Métodos Químicos e Biológicos**. 3ª edição. Editora da UFV. 235p. 2002.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-6/Omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Reviews International**, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.

STEVANATO, F. B.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V. Aproveitamento de resíduos, valor nutricional e avaliação da degradação de pescado. **PUBVET**, v. 1, n. 7, ed. 6, Londrina, 2007. Disponível em: [http://www.pubvet.com.br/artigos\\_det.asp?artigo=171](http://www.pubvet.com.br/artigos_det.asp?artigo=171). Acesso em: 30/04/2012.

TAKASE, H. Metabolism of diacylglycerol in humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.16, n. 1, p. 398-403, 2007.

TOMONOBU, K.; HASE, T.; TOKIMITSU, I. Dietary diacylglycerol in a typical meal suppresses postprandial increases in serum lipid levels compared with dietary triacylglycerol. **Nutrition**, v. 22, p. 128-135, 2006.

TORRES, C.; LIN, B.; HILL, C. G. J. Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 667-673, 2002.

VALÉRIO, A.; FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Low-pressure lipase-catalyzed production of mono and diglycerides with and without *n*-butane and AOT surfactant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1789-1796, 2009a.

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 805-812, 2009b.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WANASUDNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Biotechnological methods for concentrating omega-3 fatty acids from marine oils. In: SHAHIDI, F.; JONES, Y., et al (Ed.) Seafood safety, processing, and biotechnology. **Lancaster: Technomic**, p. 225-223, 1997.

WANG, Z.; LIN, X.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA, H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment, **Bioresource Technology**, n.117, p. 222–227, 2012.

WEBER, N.; MUKHERJEE, K. D. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5347-5353, 2004.

XU, X. Biocatalysis for lipid modifications. In: DUNFORD, N. T. e DUNFORD, H. B. (Ed). Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing. Champaign: **Journal American Oil Chemists' Society Press**, p. 239-263, 2004.

YADAV, G.D.; DEVI, K.M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: Comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, n. 59, p. 373–383, 2004.

YAMANE, T. **Monoacylglycerols**. In **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation**. JohnWiley & Sons, NewYork, NY, 1999.

YANG, T.; FRUEKILDE, M-B.; XU, X. Applications of Immobilized *Thermomices lanuginosus* Lipase in Interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 9, p. 881-887, 2003.

YANG, T. K.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. **Journal of Food Lipids**, v. 12, p. 299–312, 2005.

YEOH, C. M.; CHOONG, T. S. Y.; ABDULLAH, L. C.; YUNUS, R.; SIEW, W. L. Influence of silica gel in production of diacylglycerol *via* enzymatic glycerolysis of palm olein. **European Journal Lipid Science and Technology**, n. 111, p. 599–606, 2009.

YOUNG, F. V. K.; POOT, C.; BIERNOTH, E.; KROG, N.; O'NEILL, L. A.; DAVIDSON, N. G. J. **Processing of fats and oils en The Lipid Handbook**. Editores: Gunstone, F. D.; Harwood, J. L. y Padley, F. B. Chapman and Hall, Cambridge, p. 226-232, 1986.

YUAN, Q. et al. Diacylglycerol oil reduces body fat but does not alter energy or lipid metabolism in overweight, hypertriglyceridemic women<sup>13</sup>. **The Journal of Nutrition. Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions**, v. 3, p. 1122-1126, 2012.

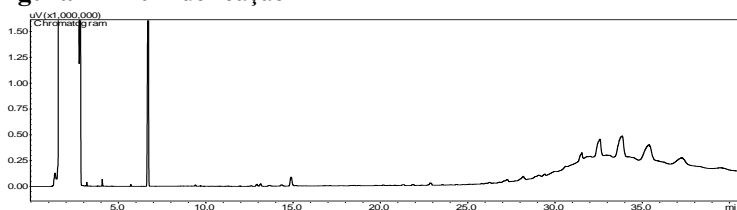
ZHONG, N.; LI, L.; XU, X.; CHEONG, L.; LI, B.; HU, S.; ZHAO, X. An Efficient Binary Solvent Mixture for Monoacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis. **Journal American Oil Chemists' Society**. v. 86, p. 783–789, 2009.

ZHONG, N.; LI, L.; XU, L.; CHEONG, X.; ZHAO, X.; LI, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Journal of Food Chemistry**, n.122, p. 228–232, 2010.

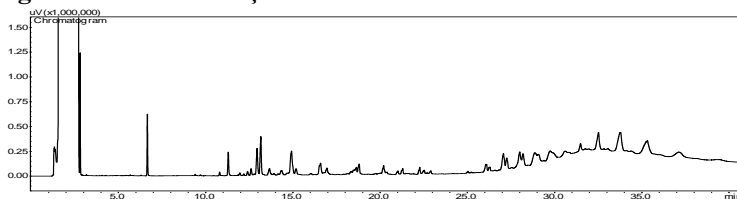
## APÊNDICE A

A título de exemplificação dos resultados obtidos neste trabalho, são apresentados abaixo alguns cromatogramas obtidos no decorrer do estudo. As Figuras 1A a 7A a seguir correspondem aos cromatogramas da cinética de glicerólise enzimática do óleo de peixe OmegaPure<sup>®</sup> utilizando como biocatalisador a Lipozyme TL<sup>®</sup> IM nas seguintes condições: proporção molar de óleo:glicerol de 2:1, biocatalisador e Tween 65 na proporção de 10% (m/m, do total dos substratos), à temperatura de 40 °C e 600 rpm. As áreas entre 7 e 22 min, aproximadamente, correspondem a região de AGL e MAGs, de 24 a 30 min correspondem a região de DAGs e a partir de 30 min correspondem a região de TAGs.

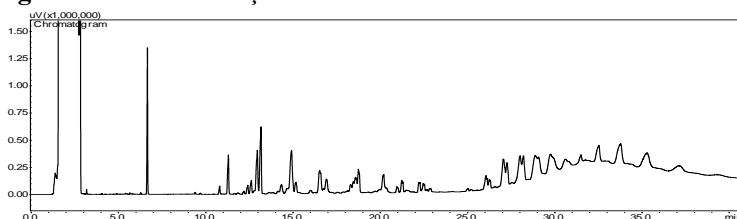
**Figura 1A - 0 h de reação**

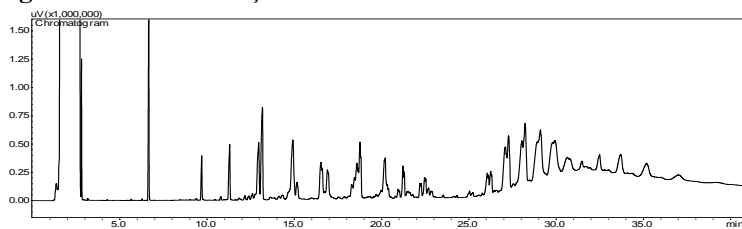
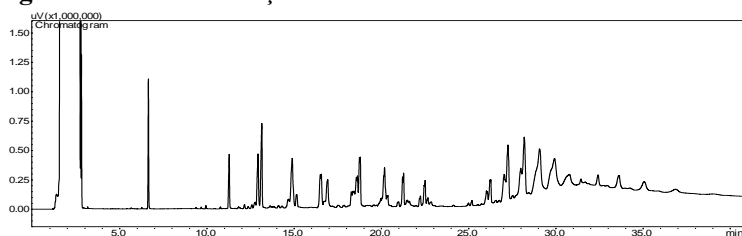
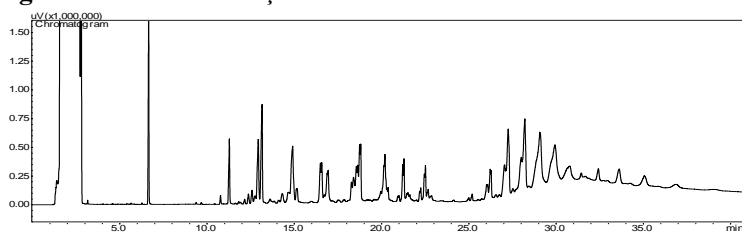
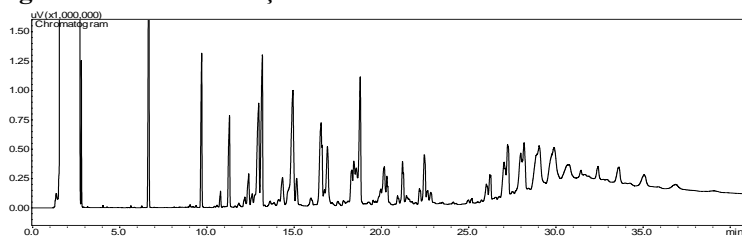


**Figura 2A - 1 h de reação**



**Figura 3A - 3 h de reação**



**Figura 4A - 8 h de reação****Figura 5A - 24 h de reação****Figura 6A - 32 h de reação****Figura 7A - 48 h de reação**





<b>Embalagem:</b>	Para maiores informações veja a lista de embalagens.
<b>Armazenamento recomendado:</b>	
Melhor utilizar antes de	Quando armazenado conforme recomendado, o produto deve ser utilizado dentro de 3 meses a partir da data de entrega.
Temperatura de armazenamento	0-10°C (32°F-50°F)
Condições de armazenamento	Em embalagem inviolada - seca e protegida do sol. O produto foi formulado para possuir ótima estabilidade. O armazenamento prolongado ou condições adversas como temperatura ou umidade elevadas, podem fazer com que sejam necessárias maiores dosagens do produto.

#### Segurança e precauções de manuseio

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode induzir à sensibilização e causar reações alérgicas em pessoas sensibilizadas. Algumas enzimas podem irritar a pele, olhos e mucosas após contato prolongado. Enzimas em pós são facilmente inaláveis e devem seu manuseio de acordo com precaução para prevenir sua inalação. Todo equipamento e procedimentos de manuseio devem ser desenvolvidos de forma a controlar a poeira derivada de derramamento, mesmo que pequeno, deve ser removido imediatamente. Utilizar proteção respiratória em todos os casos em que um controle completo da poeira não está assegurado. Qualquer derramamento, mesmo que pequeno, deve ser removido imediatamente. Utilizar proteção respiratória. Derramamentos maiores devem ser cuidadosamente removidos com uma pá para dentro de um recipiente revestido com plástico. Derramamentos menores e restos de produto derramado devem ser removidos com limpeza a vácuo ou com água (evitar o uso de água sob alta pressão). Limpadores a vácuo e sistemas centrais de vácuo devem estar equipados com filtros HEPA. Utilizar roupas de proteção, luvas e proteja os olhos/rosto como orientado na etiqueta de aviso. Lavar as roupas contaminadas. Todos os produtos são acompanhados de uma ficha de segurança. Veja o manual de segurança para mais informações sobre como manusear o produto seguramente.