



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

**PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS A PARTIR DA
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE
UTILIZANDO MEIO COM SURFACTANTE
DE GRAU ALIMENTÍCIO**

JOANNA SILVA SANTOS

Florianópolis, 2011

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

**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 do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

JOANNA SILVA SANTOS

Engenheira de Alimentos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Dr^a Maria Manuela Camino Feltes

Florianópolis, 2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S237p Santos, Joanna Silva

Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício [dissertação] / Joanna Silva Santos ; orientador, Jorge Luiz Ninow. - Florianópolis, SC, 2011. 157 v.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. Diglicerídeos. 3. Óleo de peixe. 4. Lipase. 5. Tensoativos. I. Ninow, Jorge Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663

Dedico este trabalho a minha família, em especial, meus pais, Lucas S. Santos (*in memoriam*) e Elza S. Santos, que são os primeiros sinais, evidentes, da afeição do Infinito pela minha vida.

*“Procuro a fim de saber algo e não a fim
de pensá-lo.”*

(AGOSTINHO. Solilóquios e A vida feliz)

AGRADECIMENTOS

Ao atingir mais esta etapa da vida desejo agradecer profundamente:

A Deus, por se fazer sempre Presente;

À CAPES e PGEA-UFSC por proporcionarem esta esplêndida oportunidade de aprendizado e crescimento;

Ao Prof. Jorge Ninow por acreditar no meu objetivo e protegê-lo;

À grande e querida Maria Manuela, Manu, que é exemplo de pesquisadora, mestra e doutora;

Ao Prof. Agenor Furigo, Prof. Willibaldo Schmidell, Prof^a Graça Nascimento e Prof. Barbeta, pela dedicação em ensinar;

À Prof^a Débora Oliveira e Prof^a Clarissa Rosa, por toda assistência, em especial, enquanto realizei experimentos na URI;

A amiga, bela e doce companheira de vida, Francisca;

À equipe interessada, Vinícius, Felipe e Henrique, por estarem prontos para o que der e vier;

Ao grupo ENGEBIO, que é bastante participativo e solidário. Em especial, Gisa, Lú, Ander, Letícia, Américo, Denise e Robson;

Aos “familiares” de Floripa, pessoas que representam a minha família também, Luís, Lucila e Kamila. Além de Lú e Lívia, pelo intenso convívio;

Aos amigos que me conduziram a este momento desde o início do mestrado. Em particular, Ana Carolina e Raquel.

A todos os amigos do Movimento Comunhão e Libertação pela companhia, orientação e acolhida em todos os lugares e momentos;

Desde sempre:

Aos meus pais, Lucas (*in memoriam*) e Elza, por serem a minha eterna companhia e referência.

Aos meus irmãos, Júnior e Lara, pelo carinho e força;

Aos meus familiares de sangue, pelo apoio e compreensão;

À Ernesto (Tinho), antes de tudo meu grande amigo e hoje meu namorado, por sempre confiar em mim.

Aos amigos da minha história, vocês são inesquecíveis;

Por fim, a todos que fizeram e fazem parte da minha vida.

RESUMO

Nas pesquisas com óleos e gorduras alimentícios, estudos vêm indicando que os produtos ricos em diacilgliceróis, em especial *sn*-1,3-diacilgliceróis, podem apresentar uma ação benéfica sobre a saúde humana, pois são metabolizados totalmente, o que não ocorre com as moléculas de triacilgliceróis. Aliado a isto, sabe-se que a glicerólise de óleos é, estequiometricamente, bastante favorável à produção de mono- e diacilgliceróis. Entretanto, o método tradicional de obtê-los não é indicado para a obtenção de produtos de qualidade, com propriedades funcionais, devido ao emprego de condições agressivas de temperatura e, geralmente, de solventes orgânicos. Logo, observa-se a necessidade de substituir este processo de obtenção de emulsificantes, tão indesejável ecológica, sensorial e, até, economicamente, bem como de fornecer alimentos industrializados que balanceiem a atual proporção de ácido graxos essenciais ômega-6 e ômega-3 na dieta. Por conseguinte, o presente estudo objetivou a produção de diacilgliceróis ricos nos ácidos graxos eicopentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), através da glicerólise enzimática de óleo de peixe (Savelha), utilizando a Lipozyme[®] RM IM como catalisador. Fez-se o estudo cinético das concentrações de diacilgliceróis formadas em condições reacionais pré-estabelecidas, em meio contendo surfactante de grau alimentício (Tween 65, 80 e 85). A auto-oxidação do meio e a atividade de esterificação da enzima foram monitoradas ao final da reação. Inicialmente, adequou-se a determinação da atividade enzimática, e, adicionalmente, verificou-se que a lipase não condicionada termicamente apresentava atividade maior do que a enzima condicionada a 40 °C durante 1 h. Análises preliminares indicaram que a lipase atua sobre a lecitina de soja, motivo pelo qual este fosfolípido não foi empregado na continuidade do trabalho. Além disso, verificou-se que, possivelmente, a lipase não atua sobre os surfactantes selecionados para o estudo cinético. Por fim, observou-se que a reação de glicerólise sem adição de Tween foi a que se destacou positivamente para a produção de diacilgliceróis. Esta reação apresentou a maior produtividade (0,25 mmoles/(g meio reacional.h)) em 56,23% de triacilgliceróis convertidos, associada à maior velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis (0,44 mmoles/(g meio reacional.h)). Também foi a que teve o menor índice de peróxido ao final da reação, entretanto, a atividade específica da enzima foi reduzida em 38,77%.

Palavras-chave: glicerólise, óleo de peixe, EPA, DHA, lipase, diacilgliceróis, surfactante de grau alimentício.

ABSTRACT

Researches on food oils and fats have indicated that products rich in diacylglycerols, especially *sn*-1,3-diacylglycerols, hold a beneficial effect on human health, as they might be completely metabolized, a process which does not occur in triacylglycerol molecules. Besides, it is known glycerolyses of oils are stoichiometrically favorable to the production of mono- and diacylglycerols. The traditional method of obtaining them, however, is not suitable for producing quality products, with functional properties, due to the use of organic solvents and also because of the aggressive temperature conditions involved at it. Thus, there is an urge to replace this process for emulsifiers production, considering the fact that it is so undesirable ecologically, sensory and even economically, as well as to provide foods that balance the current ratio of essential fatty acid omega-6 and omega-3 in the diet. Based on this, the present study aimed to produce diacylglycerols rich in EPA and DHA by means of enzymatic glycerolysis of fish oil (Menhaden) using Lipozyme[®] RM IM as catalyst. The kinetic study of the concentrations of diacylglycerols formed during pre-established reaction conditions, in a media containing a food-grade surfactant (Tween 65, 80 and 85), was performed. The autooxidation of the medium, likewise the enzyme esterification activity, were monitored at the end of the reaction. Firstly, it was necessary the adequacy of the enzyme activity determination. Additionally, it was verified the lipase not conditioned over previous heating was more active than the enzyme conditioned at 40 °C for 1 h. Preliminary analyses revealed that the lipase acted on soy lecithin, and therefore this phospholipid was not employed for further investigation. Moreover, it was observed the lipase possibly did not act on the surfactants chosen for the kinetic study. Finally, it was noticed that the glycerolysis reaction without the addition of Tween was the one which stood out positively for the production of diacylglycerols. It led to the higher productivity (0.25 mmols/(g reaction medium.h)) at 56.23% triacylglycerols converts, associated with a higher specific initial rate of diacylglycerols formation (0.44 mmols/(g reaction medium.h)). It was also the one that had the lowest peroxide value at the end of reaction, however, the specific activity of the enzyme was reduced by 38.77%.

Keywords: glycerolysis, fish oil, EPA, DHA, lipase, diacylglycerols, food-grade surfactant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	33
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
3.1 LIPÍDEOS	35
3.1.1 Ácidos graxos poliinsaturados não-conjugados em óleo de peixe	37
3.1.2 Glicerol.....	39
3.1.3 Reações de transformação de lipídeos.....	41
3.2 LIPASES	42
3.2.1 Lipozyme [®] RM IM.....	48
3.3 TENSOATIVOS.....	50
3.3.1 Aspectos gerais dos emulsificantes mono- e diacilgliceróis	52
3.3.1.1 Monoacilgliceróis (MAGs)	53
3.3.1.2 Diacilgliceróis (DAGs).....	56
3.3.2 Surfactantes de grau alimentício	57
3.4 GLICERÓLISE DE LIPÍDEOS	60
3.4.1 Glicerólise química de lipídeos (Método convencional).....	64
3.4.2 Glicerólise enzimática	65
3.4.3 Meios reacionais.....	71
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
4 MATERIAL E MÉTODOS	75
4.1 MATERIAL.....	75
4.2 MÉTODOS.....	76
4.2.1 Qualidade do óleo de peixe	76
4.2.1.1 Índice de acidez (Método AOCS Ca 5a-40)	76
4.2.1.2 Índice de peróxido (Método AOCS Cd 8-53).....	77
4.2.2 Procedimentos para o estudo da lipase.....	78
4.2.2.1 Procedimento experimental para o estudo da ação da lipase sobre surfactantes de grau alimentício	79
4.2.2.2 Procedimento experimental para a determinação da atividade	

enzimática	80
4.2.2.3 Cinética da atividade enzimática de esterificação em diferentes condições.....	81
4.2.2.4 Determinação da constante de equilíbrio na reação de esterificação	83
4.2.3 Condicionamento térmico da lipase	83
4.2.4 Determinação da atividade de água (aw) da lipase imobilizada ..	84
4.2.5 Análise qualitativa da ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício	84
4.2.6 Cinética da glicerólise enzimática para a seleção do surfactante de grau alimentício.....	86
4.2.7 Quantificação dos diacilgliceróis por cromatografia em fase gasosa.....	88
4.2.8 Velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis, produtividade em diacilgliceróis e conversão de triacilgliceróis	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
5.1 Qualidade do óleo de peixe.....	91
5.2 Atividade enzimática.....	93
5.3 Condicionamento térmico da lipase imobilizada	105
5.4 Ação da enzima sobre surfactantes de grau alimentício.....	109
5.5 Seleção do surfactante de grau alimentício	116
5.5.1 Monitoramento da atividade enzimática residual e do índice de peróxido	116
5.5.2 Velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis, produtividade em diacilgliceróis e conversão de triacilgliceróis	119
6 CONCLUSÕES.....	131
6.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	132
6.2 Agradecimentos.....	133
6.3 Publicações	133
7 REFERÊNCIAS.....	135
APÊNDICE A.....	153
APÊNDICE B.....	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formação de uma molécula de triacilgliceróis.	36
Figura 2 Sistema de numeração IUPAC Δ e ω comum para ácido graxo C18:3 <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9 e <i>cis</i> -12 ou C18:3 <i>n</i> -6. A numeração iniciada no carbono do grupo carboxil (COOH) determina a posição da primeira ligação dupla como Δ 6. A numeração iniciada a partir da extremidade oposta, no carbono do grupo metil (CH ₃ -), define a posição da primeira ligação dupla como ω 6.....	36
Figura 3a Ácido eicosapentaenóico (EPA), C20:5 ω 3 – ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa.	37
Figura 3b Ácido docosahexaenóico (DHA) – C22:6 ω 3 – ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa.....	37
Figura 4 Estrutura química do glicerol.....	39
Figura 5 Produção de biodiesel a partir da transesterificação entre o óleo vegetal e o metanol na presença de catalisador químico.	40
Figura 6 Mecanismo catalítico da interesterificação enzimática por lipase. O sítio ativo das lipases contém a tríade catalítica serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (Ser-Asp/Glu-His, respectivamente). Fonte: Marangoni e Rousseau (1995)	45
Figura 7 Estrutura 3D da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> na forma aberta, obtida a partir do <i>Protein Data Bank</i> (PDB), identificada como 4TGL, utilizando PyMOL vs 0,99. Fonte: Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010b).	48
Figura 8a Estrutura aproximada do Tween 65 (polioxietileno triestearato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).	59
Figura 8b Estrutura aproximada do Tween 80 (polioxietileno monooleato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).	59
Figura 8c Estrutura aproximada do Tween 85 (polioxietileno trioleato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).	59
Figura 8d Estrutura da L-alfa-fosfatidilcolina (uma classe de fosfolípídeo presente em gema de ovo e grão de soja). Fonte: Chemical Book (2011).	59
Figura 9 Esquema da reação de obtenção de monoacilgliceróis por glicerólise enzimática.	61

Figura 10 Reação de glicerólise com formação simultânea de monoacilgliceróis e diacilgliceróis.....	62
Figura 11 Reação secundária da glicerólise química com catalisadores alcalinos para a formação de monoacilgliceróis. Fonte: Grompone (2011).....	64
Figura 12 Aparato experimental utilizado para as reações enzimáticas: banho termostatzado (1); agitador magnético digital (2); reator de vidro encamisado (3); agitador mecânico digital (4).....	79
Figura 13 Reação de esterificação que ocorre entre o ácido láurico e o <i>n</i> -propanol através da lipase.....	81
Figura 14 Esquematzização de um cromatograma obtido por CCD. Fonte: Degani et al. (1998).	86
Figura 15 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 50 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	94
Figura 16 A atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 50 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	95
Figura 17 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	95
Figura 18 A atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	96
Figura 19 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	96
Figura 20 A atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	97
Figura 21 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 70 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (5%, m/m).	97

Figura 22 A atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 70 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m).	98
Figura 23 A relação entre a temperatura e a constante de equilíbrio (K_x) em 20 min da reação de esterificação entre ácido láurico e <i>n</i> -propanol – obtida através da Equação 5, descrita no item 4.2.2.4 – em diferentes temperaturas (50, 55, 60 e 70 °C) e com condicionamento térmico da enzima (a 40 °C por 1 h, conforme item 4.2.3) na temperatura de 60 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m).....	100
Figura 24 Cinética da quantidade de ácido láurico consumido na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a diferentes temperaturas, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m). Valores correspondentes presentes na Tabela A.1 do Apêndice A.....	103
Figura 25 Relação entre o ácido láurico consumido e atividade enzimática específica na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a diferentes temperaturas, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m).	104
Figura 26 Cinética do ácido láurico consumido na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m), na forma condicionada e não condicionada.	107
Figura 27 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM condicionada (5%, m/m), de acordo com o item 4.2.3.....	108
Figura 28 A atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com <i>n</i> -propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM condicionada (5%, m/m), de acordo com o item 4.2.3.....	108
Figura 29 Placas de CCD das amostras da glicerólise da lecitina de soja (10%, m/m), a 55 C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m), no tempo 0 h (1) e após 24 h de incubação na presença (2) e na ausência da enzima (branco) (3); e lecitina de soja pura (4). Concentração das amostras: 40 mg/mL hexano. Eluente de desenvolvimento: clorofórmio/álcool metílico/água destilada 95:20:2,5 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 µL.	111

Figura 30 Placa de CCD das amostras das glicerólises dos Tween 80, 65 e 85 (10%, m/m), a 55 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m), nos tempos de 0h e 24h de incubação na presença e na ausência (Br) da enzima. Padrões: Tween 80, 65 e 85, e ácido oléico (C18:1). Concentração das soluções: 80 mg/mL clorofórmio para o estudo com Tween 80, 20 mg/mL hexano para os demais Tween, e 40 mg/mL hexano para o ácido oléico; eluente de desenvolvimento: hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 µL. Resolução de imagem melhor definida pelo programa GIMP 2.6.7.....	111
Figura 31 Placas de CCD das amostras da glicerólise do Tween 85 (10%, m/m), a 55 C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m), no tempo 0 h (1) e após 24 h de incubação na presença (2) e na ausência da enzima (branco) (3). Padrões: Tween 85 (4); ácido oléico (C18:1) (5) e óleo de peixe OmegaPure® (6) como padrão de triacilglicerol (TAG). Concentração das amostras: 20 mg/mL hexano. Eluente de desenvolvimento: hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 µL.....	115
Figura 32 Avaliação do índice de peróxido do meio reacional e da atividade específica da Lipozyme® RM IM ao final da reação de glicerólise com o óleo de peixe OmegaPure® contendo 10% (m/m) de Tween (65, 80 e 85), catalisada por 10% (m/m) desta lipase, e sem surfactante (Controle) durante 48h.	117
Figura 33 Cromatogramas sobrepostos do óleo de peixe (Savelha) OmegaPure® (contorno preto) e das amostras no tempo inicial (contorno azul) e após 30 min (contorno rosa) referentes à reação de glicerólise de óleo de peixe, sem conter surfactante de grau alimentício (reação controle), a 55 °C e catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m).....	120
Figura 34 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem a presença de surfactante de grau alimentício (reação controle) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m).	122
Figura 35 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 65 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m).....	122

Figura 36 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 80 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).	123
Figura 37 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).	123
Figura 38 Cinética das frações molares de diacilgliceróis correspondentes à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem surfactante de grau alimentício (reação controle) e contendo os Tween 65, 80 e 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).	124
Figura 39 Cromatogramas correspondentes às amostras nos tempos: 2 e 3 h da reação sem surfactante – controle – (a); 1 e 4 h da reação em meio contendo Tween 80 (b); e 2 e 4 h da reação em meio contendo o Tween 85 (c). Condições reacionais: glicerólise de óleo de peixe a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m) e, quando adicionado, 10% (m/m) de surfactante de grau alimentício. Contorno preto refere-se às amostras no tempo anterior (1 e 2 h) e o contorno rosa ao tempo seguinte (3 e 4 h).	128
Figura B1 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise em óleo de peixe, em meio sem surfactante de grau alimentício (reação controle) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).....	155
Figura B2 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise em óleo de peixe, em meio contendo o Tween 65 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).....	156
Figura B3 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise em óleo de peixe, em meio contendo o Tween 80 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).....	156
Figura B4 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise em óleo de peixe, em meio contendo o Tween 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme [®] RM IM (10%, m/m).....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições e resultados de estudos sobre glicerólise enzimática em batelada.	67
Tabela 2 Determinações relativas à qualidade do óleo de peixe (Savelha) OmegaPure®	91
Tabela 3 Parâmetros máximos para índice de acidez e peróxido em relação aos óleos e gorduras em geral, destinados ao consumo humano, estabelecidos pelos órgãos regulamentadores de alimentos internacionais e nacionais, pelo <i>Council for Responsible Nutrition</i> (CRN) dos Estados Unidos sobre o óleo de peixe, e, por fim, a informação do fabricante OmegaPure® para o óleo de peixe em estudo.	92
Tabela 4 Atividade específica da Lipozyme® RM IM na reação de esterificação entre o ácido láurico e <i>n</i> -propanol em diferentes temperaturas, segundo a determinação da atividade enzimática proposta por Oliveira et al. (2006) e adaptada por Krüger (2010).	101
Tabela 5 Valores obtidos para a atividade específica e atividade de água (a_w) da Lipozyme® RM IM submetida ou não a condicionamento térmico (40 °C por 1 h).	105
Tabela 6 Análise de variância dos valores obtidos para a atividade específica em relação ao lote (2008 e 2010) da Lipozyme® RM IM condicionada a 40 °C por 1 h e não condicionada.	106
Tabela 7 Fatores de retenção (R_f) das manchas de interesse das placas de CCD referentes à avaliação da ação da Lipozyme® RM IM sobre os surfactantes de grau alimentício lecitina de soja (Figura 29) e Tween 65, 80 e 85 (Figura 30).	113
Tabela 8 Variáveis de interesse, em função da reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem a presença de surfactante de grau alimentício (reação controle) e com a presença (Tween 65, 80 e 85), em 10% (m/m), a 55 °C e catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m).	127
Tabela A.1 Apresenta a dinâmica do consumo de ácido láurico (esterificado com <i>n</i> -propanol) para quatro temperaturas diferentes e crescentes, catalisada pela Lipozyme® RM IM.	153

Tabela B.1 Valores do índice de peróxido e da atividade enzimática específica residual da Lipozyme RM IM ao final da reação glicerólise com óleo de peixe OmegaPure[®] contendo 10% (m/m) de Tween (65, 80 e 85) e sem surfactante (reação controle), catalisada por 5% (m/m) desta lipase durante 48 h, conforme descrito no item 4.2.6.....155

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A.E.	Atividade enzimática
AG	Ácido graxo
AGL	Ácido graxo livre
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AOCS	American Oil Chemists' Society
a_w	Atividade da água
BHL	Balanço hidrofílico e lipofílico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia em fase gasosa
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oléico
CRN	Council for Responsible Nutrition
DAG	Diacilgliceróis
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
GLI	Glicerol
GRAS	Generally Recognized as Safe
I.A.	Índice de acidez
I.P.	Índice de peróxido
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MAG	Monoacilgliceróis
TAG	Triacilgliceróis
USP	United States Pharmacopeia
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

É crescente a busca por tecnologias que viabilizem a melhor forma de aproveitamento de óleos e gorduras. O setor industrial, gradativamente, interessa-se por pesquisas relacionadas ao uso de biocatalisadores, por questões ecológicas e por maior qualidade dos produtos de interesse, em especial quando destinados para o consumo humano. Entre estes produtos, destacam-se os mono- e diacilgliceróis.

Atualmente, uma das formas industriais de se obter estes acilgliceróis, aditivos com propriedades emulsificantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes, é por glicerólise química. Vale ressaltar que o mecanismo de glicerólise é o mais empregado industrialmente, pois ele apresenta o maior rendimento teórico para a produção de monoacilgliceróis, caso se utilize nesta reação de interesterificação dois moles de glicerol para um mol de triacilglicerol (BORNSCHEUER, 1995). Entretanto, este processo é agressivo para o meio ambiente e para o produto de interesse, por utilizar catalisadores inorgânicos (sódio, potássio e NaOH) a altas temperaturas (acima de 240 °C). Essas condições resultam em reações de polimerização e em produtos com características indesejáveis, como coloração escura e sabor de queimado, além deste processo apresentar rendimentos relativamente baixos (BOYLE, 1997).

Devido a esses efeitos negativos causados pela glicerólise química, várias pesquisas vêm buscando como alternativa a utilização de lipases, como biocatalisadores, as quais são classificadas numericamente pela *Enzyme Commission* de E.C. 3.1.1.3 - glicerol éster hidrolases. A aplicação destes biocatalisadores permite que a reação seja conduzida sob condições brandas (pH entre 4 a 9 e temperaturas desde ambiente até 70 °C) e maior seletividade, obtendo-se, assim, produtos de qualidade superior. Por conseguinte, o uso de lipases possibilita diversas vantagens, dentre as quais baixo custo energético, maior seleção dos produtos e menos resíduos ao final do processamento (KOBELITZ e PASTORE, 2004).

Todavia, para a indústria, o custo dos biocatalisadores ainda é um limitante de investimento. A ideia de imobilizá-los pode compensar esse ponto negativo, uma vez que permite que os catalisadores sejam reutilizados, podendo apresentar uma atividade enzimática residual próxima à de origem. De acordo com a Novozymes (NOVOZYMES,

2010), a Lipozyme[®] RM IM (proveniente de *Rhizomucor miehei*), adsorvida em resina macroporosa, é particularmente adequada para reações de esterificação e interesterificação, inclusive em processos robustos. Além disso, é uma lipase regioespecífica (*sn*-1,3), sobre a qual há muitos estudos. Esta enzima foi a primeira a ter a estrutura descrita (DEREWENDA et al., 1992) e existe um bom conhecimento sobre sua ativação interfacial (PLEISS et al., 1998; PETERS et al., 1999; GASKIN et al., 2001).

Para que a obtenção dos mono- e diacilgliceróis, principais emulsificantes da indústria de alimentos, de fármacos e de cosméticos, seja viável por glicerólise, é necessário que haja uma perspectiva de disponibilidade e de barateamento do glicerol (glicerina com 99,5% de pureza), um dos substratos da reação. Através do gradativo incentivo do governo brasileiro e de outros países à produção de biodiesel via reação tipo alcoólise de triacilgliceróis, percebe-se uma tendência à não escassez deste substrato, visto que, nesta reação, a glicerina gerada como co-produto representa cerca de 10% do total do produto da reação (DEMIRBAS, 2003). O Brasil deve se transformar em um dos grandes incentivadores do setor de biotransformação de óleos e gorduras, uma vez que já está em vigência a Lei 11.097 (ANP, 2005), que exige a adição de 5% de biodiesel ao óleo diesel.

Uma das questões a que vem se dando bastante ênfase é a necessidade de agregar propriedades funcionais aos alimentos ingeridos pelo homem. Com o consumo demasiado de alimentos industrializados, observou-se, em diversos países ocidentais, que a ingestão média em relação à razão entre os ácidos graxos ômega-6 (os ácidos linoléico – C18:2*n*-6 e araquidônico – C20:4*n*-6, por exemplo) e ômega-3 (os ácidos α -linolênico – C18:3*n*-3; eicosapentaenóico – C20:5*n*-2; docosahexaenóico – C22:6*n*-3, por exemplo) está entre 10 – 25:1 (SIMOPOULOS, 1991; MARTIN et al., 2006; SARTORELLI et al., 2010). No entanto, no período anterior à era industrial, estima-se que a razão ômega-6/ômega-3 na dieta das pessoas era em torno de 1 – 2:1. Em consequência do consumo elevado de ácidos graxos ômega-6 e da baixa ingestão de ômega-3, aliado à ingestão excessiva de gorduras saturadas e *trans*, são crescentes os casos de doenças cardiovasculares, inflamatórias, hipertensão, auto-imunes, depressão e outras relacionadas às funções neurológicas (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1998). Por outro lado, estudos clínicos observaram que, quando a razão de ácidos graxos ômega-6/ômega-3 da dieta é de cerca de 5:1, há diminuição de 70% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, redução das doenças inflamatórias como artrite reumatóide e dos sintomas

decorrentes da asma (LORGERIL et al., 1994; JAMES e CLELAND, 1997; BROUGHTON et al., 1997). Além disso, estudos evidenciaram que os ácidos graxos ômega-3 e uma maior razão de ácidos graxos ômega-3/ômega-6 apresentam um efeito protetor independente sobre o metabolismo da glicose em indivíduos diabéticos de alto risco (SARTORELLI et al., 2010). A Sociedade Internacional para Estudos de Ácidos Graxos e Lipídeos (*International Society for Study of Fatty Acids and Lipids* – ISSFAL) orienta que a ingestão adequada de ácido linoléico e α -linolênico deve ser de 2 e 0,7% das calorias consumidas, respectivamente, enquanto que a ingestão mínima dos ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa eicosapentaenóico e docosahexanóico deve ser de 500 mg/dia.

A razão pela qual este desequilíbrio na proporção de ácidos graxos ômega-3 para ômega-6 ingeridos na dieta causa efeitos negativos à saúde é pelo fato de que estes ácidos graxos não são interconversíveis, isto é, competem entre si. Segundo Lands (1986) apud Freitas et al. (2006), o ômega-6 em excesso pode inibir a produção de alguns metabólitos de ômega-3, incluindo seus precursores de eicosanóides. Essa inibição específica provoca alterações nos processos biológicos que envolvem, por exemplo, os tromboxanos e prostaglandinas, formadores da classe dos prostanóides, a qual é uma sub-classe dos eicosanóides. Isto, ocasiona coagulação do sangue e a sua inflamação.

O óleo de peixe possui os ácidos graxos essenciais ômega-3 eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3), precursores dos hormônios tipo eicosanóides, responsáveis por processos biológicos importantes do corpo humano. É notável, portanto, a importância de adicioná-los à dieta dos consumidores, por exemplo, na forma de emulsificantes (mono- e diacilgliceróis). A partir desta análise, estudos indicam a utilização de óleo de peixe como substrato em reações de glicerólise enzimática para a obtenção de mono- e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 (PAWONGRAT et al., 2007; FELTES et al., 2010; EOM et al., 2010). Estudos realizados por Chattipakorn et al. (2009) verificaram uma baixa mortalidade cardíaca em humanos ao observar uma maior frequência de consumo de peixe, sendo esta frequência diretamente associada à relação de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 nos tecidos do coração.

Concomitantemente, para que se proponha uma condição de tecnologia mais limpa através da glicerólise enzimática, sugere-se utilizar surfactantes de grau alimentício no meio reacional, como substitutos dos solventes orgânicos, os quais normalmente são adicionados, atuando como homogeneizadores desta reação. Tendo em

vista esta situação, há um avanço nos estudos que viabilizam a produção dos mono- e diacilgliceróis via glicerólise enzimática em meio livre de solventes orgânicos e contendo surfactantes de grau alimentício (VALÉRIO et al., 2009a, 2009b; FELTES et al., 2010).

O surfactante, quando presente em baixa concentração em um sistema, atua como agente tensoativo entre as fases imiscíveis em contato, por ocasionar a diminuição da energia interfacial livre dos substratos (ROSEN, 2004). Devido à reação de glicerólise enzimática possuir em maior volume a porção de óleo (apolar) em relação à porção de glicerol (polar), o sistema é caracterizado como Água/Óleo, o que requer, teoricamente, o uso de um surfactante com baixo valor de balanço hidrofílico/lipofílico (BHL). Os valores teóricos referentes ao BHL dos surfactantes de grau alimentício Tween (Polioxietileno ésteres de sorbitana) podem estar entre 8 e 15 (OHBA, 1962). Estudo sobre glicerólise de azeite de oliva na presença de Tween 85 (Polioxietileno trioleato de sorbitana) indicou que este surfactante proporcionou bons rendimentos em mono- e diacilgliceróis em apenas 2 horas de reação (VALÉRIO et al., 2009b).

2 OBJETIVOS

A partir das considerações anteriores, o objetivo desta pesquisa foi produzir emulsificantes (diacilgliceróis), através da glicerólise enzimática do óleo de peixe comercial refinado OmegaPure[®], obtido de Savelha, utilizando-se meio contendo surfactante de grau alimentício. Para tal, optou-se por utilizar como biocatalisador a Lipozyme[®] RM IM. Dentro deste objetivo geral, determinaram-se os objetivos específicos a seguir:

- Caracterizar o óleo de peixe quanto aos índices de acidez e peróxido;
- Verificar a ação da lipase Lipozyme[®] RM IM sobre diferentes surfactantes de grau alimentício (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e lecitina de soja);
- Definir metodologia de monitoramento da atividade enzimática e utilizá-la para determinar a atividade enzimática antes e depois das reações de glicerólise;
- Verificar se o condicionamento prévio da lipase pela temperatura propicia maior atividade de esterificação;
- Realizar o estudo cinético das reações de glicerólise enzimática, na presença de diferentes surfactantes de grau alimentício, em condições pré-definidas de acordo com a literatura, comparando os resultados com os obtidos em meio contendo somente glicerol e óleo;
- Verificar o índice de peróxido do meio reacional depois das reações de glicerólise, de forma a avaliar o estado de oxidação dos produtos da reação;
- Selecionar um surfactante de grau alimentício para produzir diacilgliceróis, considerando a sua qualidade e estabilidade da enzima.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

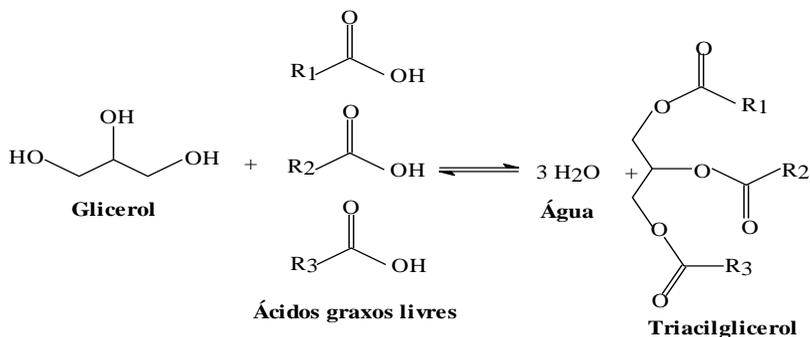
O presente capítulo aborda os fundamentos teóricos necessários para o desenvolvimento do projeto de dissertação a respeito da produção de emulsificantes diacilgliceróis, contendo principalmente ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (ácidos graxos eicosapentaenóico e docosaheptaenóico), via glicerólise enzimática de óleos de diversas origens, em especial obtido de peixe, utilizando diferentes meios reacionais, com enfoque para um sistema contendo surfactantes de grau alimentício.

3.1 LIPÍDEOS

Os lipídeos possuem a característica de serem solúveis em solventes orgânicos (tais como, éter, hexano ou clorofórmio) e, segundo Christie (1982), compreendem uma variedade de produtos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliáticos. No entanto, hoje em dia, o termo “lipídeos” é, geralmente, utilizado para os ácidos graxos e seus derivados de ocorrência natural (éster e amidas), e aos compostos relacionados biosinteticamente aos ácidos graxos.

Os componentes ácidos graxos e álcool compõem os lipídeos simples, como os acilgliceróis, éter acilgliceróis, esteróis, e seus ésteres e ésteres de cera. Os lipídeos complexos incluem os glicerofosfolipídeos (fosfolipídeos), gliceroglicolipídeos (glicolipídeos), e os esfingolipídeos (AKOH e MIM, 2008).

Os óleos e gorduras são compostos essencialmente de triacilgliceróis, cujas estruturas e distribuição de ácidos graxos nas moléculas definem as propriedades físicas. Os triacilgliceróis são obtidos a partir da esterificação de cada grupo hidroxila do glicerol com ácidos graxos, conforme indicado na Figura 1.



R_n: cadeia alquila com diferentes comprimentos e graus de saturação.

Figura 1 Formação de uma molécula de triacilgliceróis.

Os ácidos graxos, de origem vegetal e animal, normalmente, contêm números pares de átomos de carbono (4 – 24) em uma cadeia alifática com um grupo terminal carboxílico. Podem ser totalmente saturados ou conter uma, duas ou mais (até seis) ligações duplas, as quais normalmente têm uma configuração *cis*, isto é, os átomos/grupos estão no mesmo lado de um plano de referência na molécula. O contrário é uma configuração *trans* (CHRISTIE, 1982). Os ácidos graxos de origem animal são, comparativamente, mais simples na estrutura e podem ser subdivididos em famílias bem definidas.

A depender do tipo de ácido graxo, se for insaturado e possuir apenas ligação *cis*, é comum em sua identificação abreviada o uso da notação *n*- ou ω . Este tipo de identificação abreviada informa o número de carbonos em uma cadeia de ácido graxo, em seguida, o número de ligações duplas e a posição da ligação dupla mais próxima do grupo metil (CH₃-) da extremidade da molécula do ácido graxo, conforme indicado na Figura 2.

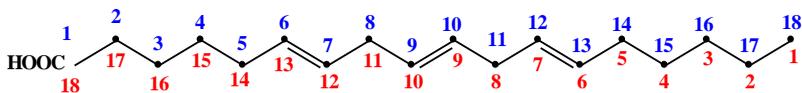


Figura 2 Sistema de numeração IUPAC Δ e ω comum para ácido graxo C18:3 *cis*-6, *cis*-9 e *cis*-12 ou C18:3*n*-6. A numeração iniciada no carbono do grupo carboxil (COOH) determina a posição da primeira ligação dupla como Δ 6. A numeração iniciada a partir da extremidade oposta, no carbono do grupo metil (CH₃-), define a posição da primeira ligação dupla como ω 6.

3.1.1 Ácidos graxos poliinsaturados não-conjugados em óleo de peixe

Há um crescente conhecimento e compreensão sobre os efeitos do comprimento da cadeia dos ácidos graxos, de sua insaturação, e de sua distribuição posicional no metabolismo do corpo humano e, conseqüentemente, em sua saúde (LORGERIL et al., 1994; JAMES e CLELAND, 1997; BROUGHTON et al., 1997, SHAHIDI e WANASUNDARA, 1998 e MARTIN et al., 2006). De acordo com Willis et al. (1998), o crescente conhecimento a respeito dos efeitos benéficos dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) de cadeia longa, particularmente ácido eicosapentaenóico (EPA), C₂₀:5 ω 3 (Figura 3a), e ácido docosahexaenóico (DHA), C₂₂:6 ω 3 (Figura 3b), tem promovido o desenvolvimento de novos métodos de concentração de AGPIs a partir de óleos marinhos. Óleos marinhos, como de salmão e fígado de bacalhau, são fontes ricas destes AGPIs, encontrados nos tecidos animais como importantes componentes de lipídeos complexos. Os autores Haraldsson e Höskuldsson (1989) afirmam que o óleo de peixe pode conter entre 10 e 25% de AGPIs. Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia ímpar têm sido, também, encontrados em alguns óleos de peixes (CHRISTIE, 1982).

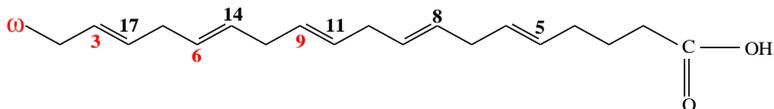


Figura 3a Ácido eicosapentaenóico (EPA), C₂₀:5 ω 3 – ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa.

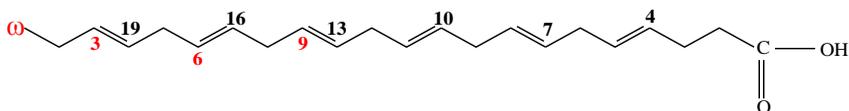


Figura 3b Ácido docosahexaenóico (DHA) – C₂₂:6 ω 3 – ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa.

Os AGPIs, especialmente EPA e DHA, são sintetizados principalmente por plantas marinhas uni ou multi celulares, tais como fitoplânctons e algas (PIGOTT e TUCKER, 1987). São transferidos aos

peixes e mamíferos marinhos através da cadeia alimentar e, assim, incorporados aos seus lipídeos. A presença destes ácidos graxos essenciais é mais comum em peixes de águas frias da região Atlântica. Os ácidos graxos poliinsaturados da família $\omega 3$ são ácidos graxos essenciais, ou seja, não sintetizados pelo homem. Por essas razões, o óleo marinho tem sido tradicionalmente usado como matéria-prima para a obtenção de concentrados e/ou produtos ricos em AGPIs $\omega 3$. No entanto, a obtenção destes concentrados é dificultada pela separação individual dos ácidos graxos, pois o óleo marinho contém uma mistura de ácidos graxos de cadeia de diversos tamanhos e níveis de insaturação.

Esses ácidos graxos atendem às necessidades humanas de crescimento, reprodução e desenvolvimento saudável. Além disso, sabe-se que os ácidos graxos poliinsaturados $\omega 6$ e $\omega 3$ são precursores de compostos tipo hormônio como os eicosanóides, responsáveis por processos biológicos importantes do corpo humano (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1998). No entanto, percebe-se que a dieta ocidental apresenta um desequilíbrio inadequado da relação $\omega 6/\omega 3$ ingerida. Em consequência disso, são crescentes os casos de doenças cardiovasculares, inflamatórias, hipertensão, auto-imunes, depressão e outras relacionadas às funções neurológicas (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1998). Estudos realizados por Chattipakorn et al. (2009) verificaram que a frequência de consumo de peixe estava diretamente associada com a relação de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 nos tecidos do coração em humanos e, a partir do histórico de doenças cardíacas coronarianas, observaram que os altos níveis de ômega-3 e ômega-6, particularmente ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido araquidônico (AA), correspondiam à baixa mortalidade cardíaca.

Pesquisas verificaram que, em adultos, o aumento do consumo de EPA e DHA na forma de peixe e cápsulas de óleo de peixe tem sido associado com a redução de riscos de arteriosclerose, crescimento de tumor, trombozes, hipertrigliceridemia, certos cânceres, baixa imunidade e alta pressão arterial (SHEKELLE et al., 1985; BRADEN e CARROLL, 1986).

Por outro lado, os ácidos graxos poliinsaturados têm um ponto de fusão muito baixo. Devido às múltiplas insaturações, possuem maior susceptibilidade à deterioração oxidativa. Esses ácidos e seus derivados, expostos a altas temperaturas ou a hidrólises alcalinas, sofrem isomerização posicional ou geométrica, formação e migrações de ligações duplas *trans*.

Contudo, diante de toda a relevância funcional dos AGPIs no organismo humano, há o interesse em desenvolver e otimizar a produção

de aditivos alimentícios, como os emulsificantes mono- e diacilgliceróis enriquecidos com tais ácidos graxos.

3.1.2 Glicerol

O glicerol, conhecido também como 1, 2, 3 propanotriol, possui a estrutura apresentada na Figura 4 e refere-se somente ao composto puro. O termo glicerina é designado para os compostos comerciais que contêm quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol (MORRISON, 1994).

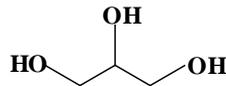


Figura 4 Estrutura química do glicerol.

O glicerol, para ser utilizado pelo ser humano, em alimentos e fármacos, deve apresentar em sua especificação o termo *USP (United States Pharmacopeia)* (MORRISON, 1994). Ele também é considerado como substância GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos (MORRISON, 1994). No Brasil, seu uso em produtos alimentícios é assegurado pela Resolução nº 386 da ANVISA, de 5 de agosto de 1999.

Físico-quimicamente, o glicerol é um líquido incolor, inodoro, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções, e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LÓPES et al., 1999). É atóxico, o que o torna bastante utilizado como aditivo alimentar, atuando como estabilizante, antioxidante, sequestrante, emulsificante e umectante (ARRUDA et al., 2007).

Segundo Brisson et al. (2001), é comum encontrá-lo em diferentes espécies, desde protistas até mamíferos, porém se encontra também como um triacilglicerol, combinado com ácidos graxos. Pode-se encontrá-lo, em grandes quantidades, em óleos ou azeites. O glicerol pode também ser recuperado como um subproduto, principalmente através de dois processamentos industriais: no processo de fabricação de sabão, quando óleos, gorduras ou sebos são saponificados através de lixívia alcalinas (ARRUDA et al., 2007), e na produção de biodiesel, a partir da transesterificação de óleos vegetais com álcoois, na presença de diferentes catalisadores (GONÇALVES et al., 2006).

No decorrer dos últimos anos, observou-se que a produção mundial de biodiesel tem crescido exponencialmente. Considera-se a glicerina como o principal co-produto desta produção, gerada em níveis de aproximadamente 10% (m/m) do óleo processado (THOMPSON e HE, 2006). Conforme o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (Portal do BIODIESEL), a demanda e a produção de biodiesel é crescente, logo, a quantidade de glicerina gerada já é considerável, e a sua utilização tornar-se uma questão bastante relevante. Entretanto, a composição da glicerina, depende da origem da matéria-prima e do processo de obtenção de biodiesel.

O óleo vegetal, formado por triésteres derivados da glicerina, sob ação de um catalisador básico, ou mesmo ácido, e na presença de álcool metílico ou álcool etílico, o óleo sofre uma transesterificação, formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, liberando a glicerina (Figura 5).

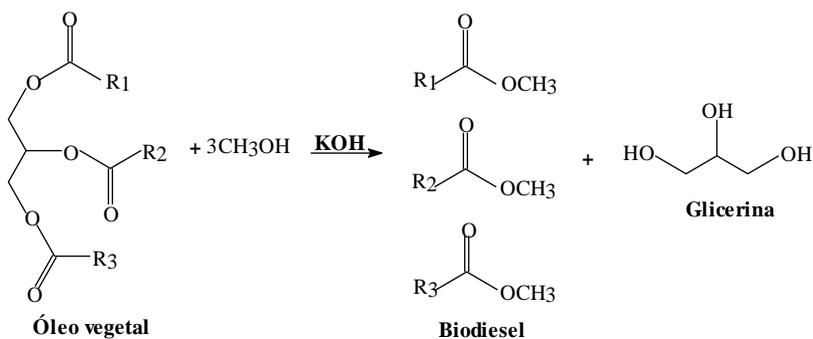


Figura 5 Produção de biodiesel a partir da transesterificação entre o óleo vegetal e o metanol na presença de catalisador básico.

A maioria dos processos industriais de biodiesel utiliza uma razão molar de 6 para 1 de álcool para óleo, que é um excesso de 100%, a fim de conduzir a reação até o final. Após a reação, a maior parte do excesso de álcool (80%) adere-se à camada de glicerol. O álcool é recuperado para reutilização. A purificação da glicerina depende da economia de escala de produção e/ou da disponibilidade de uma instalação de purificação de glicerol. Produtores de biodiesel de maior escala refinam sua glicerina e repassam-na para as indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos. (THOMPSON e HE, 2006).

Alguns dos métodos aperfeiçoados de purificação de glicerina são

através da filtração, adições químicas e destilação fracionada a vácuo para produzir vários tipos comerciais, tais como grau dinamite, destilado amarelo e quimicamente puro (Bailey's Fats and Oils, 1979). A glicerina também pode ser refinada através de um método de filtração de uma série de resinas de troca iônica (MIESIAC, 2003). Salienta-se que o alto custo de purificação não é indicado para produtores de escala moderada.

Os avanços na produção de biodiesel por transesterificação de óleo com álcool metílico ou álcool etílico (alcoólise) no Brasil, particularmente, são especialmente provenientes do surgimento do projeto que incentiva a propagação do biodiesel (PROBIODIESEL, 2003) e a vigência da Lei 11.097 (ANP, 2005), desde janeiro de 2010, que exige a adição de 5% de biodiesel ao combustível diesel. A partir disso e das projeções mundiais, em relação aos avanços nas pesquisas e na crescente aplicação do biodiesel prevê-se um aumento na disponibilidade e, conseqüentemente, o barateamento da glicerina. Tal situação é desejável às indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, uma vez que uma das reações de interesterificação de óleos de grande interesse para a obtenção de emulsificantes é a glicerólise, pois utiliza como um dos substratos a glicerina.

3.1.3 Reações de transformação de lipídeos

É crescente o desenvolvimento de aplicações a partir de recursos renováveis, visando a sustentabilidade, em especial, pela indústria química. Seus custos competitivos, disponibilidade mundial e funcionalidade fazem dos óleos e gorduras atrativos para inúmeras aplicações. Alguns produtos a partir destas aplicações são biodiesel, lubrificantes, surfactantes, revestimento de superfícies, polímeros, farmacêuticos e cosméticos (CORMA et al., 2007).

Observou-se esta ampla funcionalidade de óleos e gorduras a partir de pesquisas destinadas a formas de reorganização de suas estruturas básicas, tais como modificações químicas dos ácidos graxos (hidrogenação), hidrólise e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal dos triacilgliceróis (interesterificação). No entanto, o uso de catalisadores químicos, comumente utilizados para estas reações de transformação, causa limitações na obtenção dos produtos, por resultarem em processos pouco versáteis e exigirem altas temperaturas para que se atinja uma velocidade intermediária de reação. Além disso, esse tipo de mecanismo químico possui baixa especificidade, resultando, normalmente, em produtos de composição química mista ou tóxica, o que leva a uma etapa final obrigatória de purificação mais rigorosa

(SONNTAG, 1982).

Diante disso, processos enzimáticos vêm demonstrando uma boa alternativa para a transformação de óleos e gorduras na indústria. Apresentam vantagens, tais como maior rendimento do processo, utilização de catalisadores biodegradáveis, menor consumo de energia, redução da quantidade de resíduos e introdução de rotas mais acessíveis de produção (HAMMOND e GLATZ, 1988; CASEY e MACRAE, 1992; WILLIS e MARAGONI, 1999). Para a indústria de óleos e gorduras, os processos de maior interesse por tecnologia enzimática são as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos, as quais empregam lipases como biocatalisadores.

O mecanismo enzimático permite a aplicação de temperaturas e pressões brandas no processo, com a manutenção de uma alta atividade catalítica, permitindo a modificação de gorduras poliinsaturadas, conforme já investigado para óleo de peixe (PAWONGRAT et al., 2007; EOM et al., 2010 e FELTES et al., 2010).

3.2 LIPASES

A Comissão de Enzimas (*Enzyme Commission* – E.C.) classifica as lipases como éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3). Estas enzimas atuam sobre ligações éster de vários compostos, sendo o acilglicerol seu principal substrato. Podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas (JAEGER e REETZ, 2000). É interessante observar que o tipo de enzima depende de sua origem, podendo ser proveniente de microorganismos íntegros vivos e de outros materiais biológicos, como RNA, anticorpos, enzimas isoladas ou contidas em células (PEREIRA, 1995; LÉON et al., 1998). Avanços na tecnologia do DNA, segundo Vulfson (1994) e Kazlauskas et al. (1998), permitiram o surgimento de lipases microbianas comerciais com maior atividade e maior estabilidade térmica. Atualmente, os seus principais fabricantes são Novozymes, Amano e Gist Brocades.

A massa molar pode variar entre 20 e 75 kDa, sua atividade enzimática ideal pode ser em pH entre 4 e 9 e em temperaturas desde a ambiente até 70 °C. Normalmente, as lipases são estáveis à temperatura ambiente e possuem uma atividade ótima entre 30 e 40 °C (VULFSON, 1994).

Além disso, as enzimas isoladas ou purificadas possuem alta eficiência catalítica (velocidade da reação 108 a 10¹² vezes maior em relação aos catalisadores químicos) e seletividade. As lipases também possuem uma certa estabilidade em solventes orgânicos e não requerem

a presença de co-fatores (JAEGER e REETZ, 2000).

As lipases podem ser classificadas quanto à especificidade. Existem lipases não específicas, que quebram as moléculas de acilglicerol aleatoriamente, gerando produtos com características similares aos obtidos por catálise química, porém menos termodegradados (KAZLAUSKAS et al., 1998).

Já as lipases *sn*-1,3 específicas, originadas de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roquefortii* e *Rhizomucor miehei*, por exemplo (WILLIS e MARAGONI, 1999; REETZ, 2002; KRISTENSEN et al., 2005), liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 do acilglicerol e formam produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas ou por reações químicas tradicionais. As lipases de ácidos graxos específicos hidrolisam especificamente determinados ácidos, como os ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação *cis* no carbono 9, hidrolisados lentamente por lipase de *Geotrichum candidum* (KAZLAUSKAS et al., 1998).

Além disso, algumas lipases podem ser estereoespecíficas. Jaeger e Eggert (2002) e Jaeger e Reetz (2000) observaram que certas lipases diferenciavam os enantiômeros de uma mistura racêmica. Segundo Choi et al. (1999), esta regiosseletividade é imposta pelas dimensões e pela estrutura do centro ativo à ligação do substrato. Esta seletividade estereoespecífica é provocada pela simetria estrutural (quiralidade) da enzima, que restringe a ação de substratos que não sejam compatíveis com a sua estrutura espacial.

A especificidade apresentada por algumas lipases é útil para a obtenção de ésteres, alcoóis e ácidos opticamente puros (FADNAVIS e KOTESHWAR, 1997; CHOI et al., 1999; JAEGER e REETZ, 2000; JAEGER e EGGERT, 2002).

Geralmente, em reações de glicerólise enzimática, independente do uso de lipases 1,3-específicas, é mais favorável a obtenção de 1(3)-monoacilgliceróis e não de 2-monoacilgliceróis, pois, após a hidrólise do triacilglicerol nos grupos acil externos, ocorre uma migração espontânea do grupo acil da posição intermediária para as posições externas, o que resulta em uma mistura de isômeros.

Sabe-se que as lipases foram diferenciadas das esterases a partir de sua característica cinética, uma vez que elas possuem uma propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, como na interface lipídeo/água (SARDA e DESNUELLE, 1958). Logo, as lipases se tornam ativas na presença de ésteres emulsionados. No entanto, deve-se ressaltar que a maioria das

lipases pode hidrolisar substratos de esterases, porém o inverso não é possível, pois as esterases apenas hidrolisam substratos solúveis em água (FREITAS et al., 2006).

Na Figura 6, é possível observar o mecanismo de ação de lipases 1,3-regioespecíficas em reações de interesterificação enzimática. As lipases específicas incluem o resíduo serina, que é o nucleofílico, e os outros dois aminoácidos, a histidina e o ácido aspártico, os quais são envolvidos por um sistema de retransmissão de carga (*charge-relay*) destinado a melhorar a catálise. Esta tríade catalítica é coberta por um laço na superfície, cadeia polipeptídica, denominado como a “tampa”, “*lid*” ou “*flap*” (LANG et al., 1996). Em contato com as gotas de óleo, a *lid* se move para permitir a interação entre sua face interna hidrofóbica e os resíduos hidrofóbicos que normalmente cercam o sítio ativo da lipase com uma superfície hidrofóbica. Isto é, a lipase torna-se adsorvida nesta superfície hidrofóbica e na sua forma aberta para promover a exposição do sítio ativo ao meio reacional (MILED et al., 2001; GROCHULSKI et al., 1993).

A reação de interesterificação enzimática regioespecífica consiste em quatro etapas (Figura 6). Na primeira etapa, o sítio ativo serina ataca o carbono carbonil de um triacilglicerol, um ácido graxo indissociável ou, como mostra a Figura 6, um éster alquílico de ácido graxo, formando um tetraédrico intermediário (segunda etapa). O papel dos resíduos de histidina e de ácido aspártico é de tornar o grupo de hidroxila da serina um nucleofílico forte, sem necessitar de condições básicas. Este tetraédrico intermediário é estabilizado por grupos amina específicos da “espinha dorsal” dos outros aminoácidos, formando uma estrutura denominada cavidade oxiânion (não apresentada na Figura 6). A ligação carbono-oxigênio do éster é subsequentemente rompida (terceira etapa), resultando em álcool ou em água, dependendo se dado substrato for um triacilglicerol, um éster metílico de ácido graxo ou um ácido graxo. Na quarta etapa, um outro álcool reagirá com o intermediário acil-enzima, formando novamente um tetraédrico intermediário, o qual se rearranjará gerando um novo éster alquílico de ácido graxo, como apresentado na Figura 6, regenerando o sítio ativo da serina.

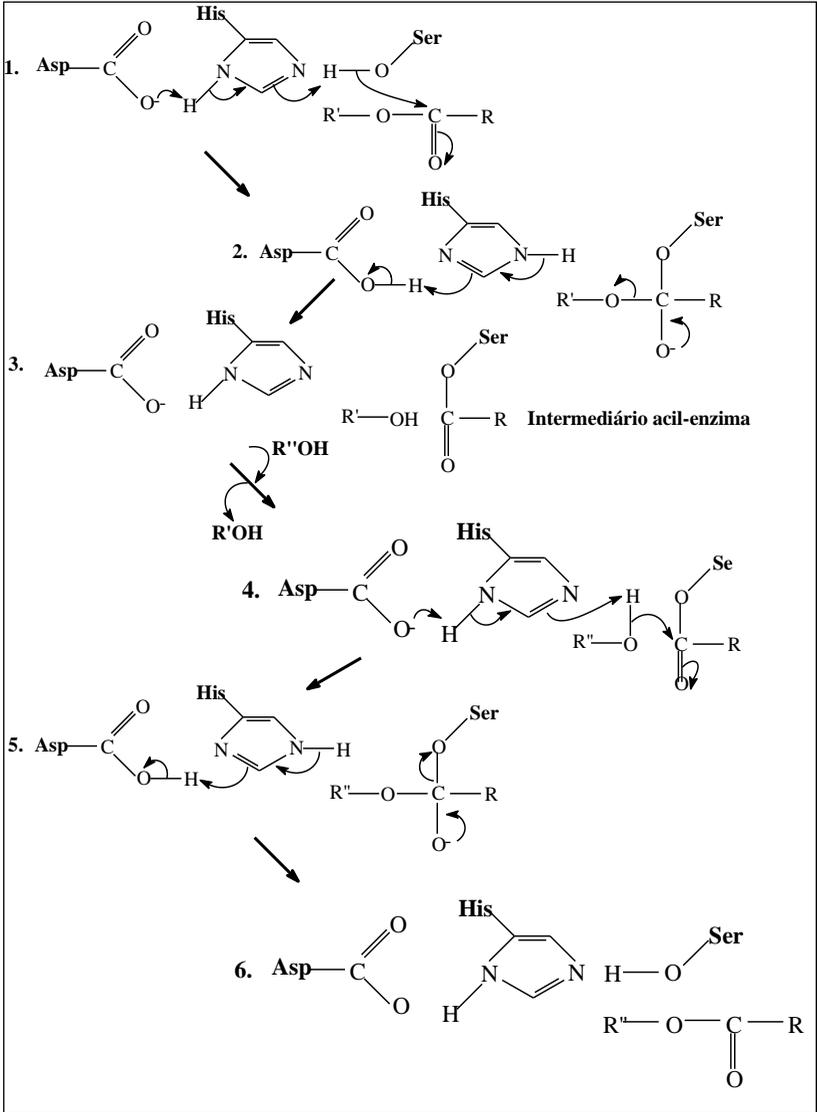


Figura 6 Mecanismo catalítico da interesterificação enzimática por lipase. O sítio ativo das lipases contém uma tríade catalítica: serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina (Ser-Asp/Glu-His, respectivamente). Fonte: Marangoni e Rousseau (1995)

A revisão da literatura feita por Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010a) confirmou que a hidrólise de gorduras e óleos em meio aquoso (emulsão) por lipase segue este mecanismo, tão conhecido como ativação interfacial. Além disso, estudos indicaram que existem superfícies hidrofóbicas que simulam essas gotas de óleo, permitindo que haja a adsorção da forma aberta da lipase ao suporte por meio da ativação interfacial (BAYRAMOGLU et al., 2002, AUCCOIN et al., 2004, WILSON et al., 2006 apud RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

Portanto, percebe-se a importância da existência da interface para a desejada atuação da lipase. Para tal deve-se ter uma quantidade mínima de água que envolva a enzima e hidrate o seu sítio ativo, permitindo, assim, a formação da interface local necessária para que haja a ativação da lipase. Contudo, a presença da água em reações inversas à hidrólise, como interesterificação (glicerólise, por exemplo), deve ser mínima e controlada ao longo da reação. Tendo em vista que já existe uma quantidade mínima de água no próprio meio reacional, mesmo em solventes hidrofóbicos (FREITAS et al., 2006), como também a formação de água que geralmente ocorre através da reação entre o grupo funcional carboxila do grupo acilo ($R - CO -$) e um álcool, como se observa na reação de esterificação da Figura 13. Ressaltando-se que em reações de interesterificação é necessário, também, que ocorram hidrólises, além de esterificações.

Valério (2009) abordou a necessidade de ativação interfacial para a total atividade catalítica das lipases em reações de interesterificação (glicerólise com óleo de oliva usando diferentes emulsionantes com grau alimentício) reduzindo o teor de água da própria lipase (Novozym[®] 435, produzida por *Candida antarctica*), principalmente do suporte, condicionando-a, previamente, em estufa a 40 °C por 1 h.

Todavia, de acordo com Brockman (1984) apud Freitas et al. (2006), as lipases dependem das propriedades físicas da emulsão, dos substratos lipofílicos em si. A partir disso, tem-se uma melhor percepção do mecanismo da lipólise.

Em se tratando de hidrólise, um mecanismo integrante da reação de interesterificação, segundo Buehler e Wandrey (1987) apud Freitas et al. (2006), diferentes parâmetros podem influenciar seu desempenho, como: a relação fase aquosa/ fase oleosa; eventual ação inibitória dos produtos formados; efeito dos íons cálcio e sódio na velocidade de reação; influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo e o efeito da agitação na velocidade de reação. Agregando-se a este conhecimento para justificar o estudo referente ao

acondicionamento térmico da lipase antes de adicioná-la à reação, abordado no item 4.2.3, o sítio ativo das lipases é de extrema flexibilidade, ou seja, suas propriedades catalíticas podem ser facilmente alteradas sem a sua inativação. Assim, as propriedades da lipase podem ser bastante alteradas por ligeiras mudanças nas condições de reação, diferentes formas de imobilização ou por sua composição química ou modificação física (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

De maneira geral, o conhecimento sobre o local e forma de ação da lipase é de grande importância para avanços na otimização da ação biocatalítica e, conseqüentemente, no rendimento do processo. Segundo estudo de Sharma et al. (2001), considerando que as reações lipolíticas ocorrem na interface água-lipídeo (reação heterogênea), torna-se inadequada a aplicação da cinética michaeliana (equações do tipo de Michaelis-Menten), já que se trata de reações heterogêneas. Além disso, os substratos das reações lipolíticas tendem a formar um equilíbrio entre os estados monoméricos, micelar e emulsionados, o que requer uma modelagem cinética específica.

Por conseguinte, a modelagem deste tipo de reação vem sendo amplamente desenvolvida por meio da análise automática do perfil de uma gota de óleo suspensa em água, denominada técnica de camada única, sabendo-se que há também uma redução da tensão superficial entre o óleo e a água, causada pela ação hidrolítica da lipase com o tempo. Por outro lado, o fenômeno da cinética destas reações lipolíticas é bem conhecido como “ativação interfacial”, isto é, o aumento da atividade enzimática está em função de substratos imiscíveis, responsáveis pelas emulsões. De acordo com Jaeger e Reetz (2000), isso se deve à estrutura tridimensional da lipase possuir uma superfície entrelaçada (*lid*) na superfície do sítio ativo. Porém, estudos mais recentes afirmam que essa estrutura na forma de “tampa” não é determinante para a “ativação interfacial” em lipases provenientes de *Pseudomonas aeruginosas*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B e uma lipase pancreática não específica. Mesmo que a *lid* sobre o sítio ativo seja anfifílica. Em consequência disso, as lipases são definidas como carboxilesterases, atuando em substratos emulsionados (JAEGER e REETZ, 2000; KAZLAUSKAS et al., 1998) e catalisando a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER e REETZ, 1998).

Sabe-se que, dependendo dos reagentes de partida, as lipases atuam em reações diversas (KAZLAUSKAS et al., 1998; VILLENEUVE et al., 2000). Podem catalisar reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), onde ocorre

a combinação de reações de hidrólise – a quebra das ligações éster dos triacilgliceróis – e de síntese (reação reversa) sob condições microaquosas.

A interesterificação é o processo mais aplicado em óleos e gorduras para a obtenção de produtos com funções desejáveis na indústria de alimentos, de cosméticos, farmacêutica e de biocombustíveis. Esse tipo de reação consiste em um rearranjo das ligações ésteres dos triacilgliceróis, possibilitando modificações das propriedades dos óleos e gorduras, na presença de um catalisador ativo. Em reações de glicerólise enzimática, no entanto, o controle de água influencia no rendimento de mono- e diacilgliceróis.

3.2.1 Lipozyme[®] RM IM

A obtenção da Lipozyme[®] RM IM é a partir de *Rhizomucor miehei*, produzido por fermentação submersa do microorganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado (NOVOZYMES, 2000). A lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* (*sn*-1,3 específica) foi a primeira a ter a estrutura descrita (DEREWENDA et al., 1992) e existe um bom conhecimento de sua ativação interfacial (PLEISS et al., 1998; GASKIN et al., 2001; PETERS et al.; 1999). A partir dos estudos de Jaeger e Reetz (2000) sobre esta lipase, concluiu-se que o sítio ativo das lipases, em geral, é constituído por uma tríade catalítica, constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. Na Figura 7, observa-se a estrutura em 3D da lipase originada de *Rhizomucor miehei* na forma aberta.

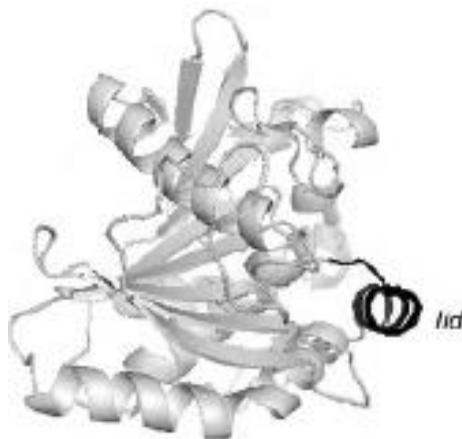


Figura 7 Estrutura 3D da lipase de *Rhizomucor miehei* na forma aberta,

obtida a partir do PDB (*Protein Data Bank*), identificada como 4TGL, utilizando PyMOL vs 0,99. Fonte: Rodrigues e Fernandez-Lafuente (2010b).

A Figura 7 exibe que o sítio ativo da enzima com o movimento de uma tampa helicoidal (*lid*). Derewenda et al. (1992) propôs que a estrutura da enzima neste complexo é equivalente ao sítio ativo gerado pela interface água-óleo.

Comercialmente, pode-se obter esta lipase imobilizada através da Novozymes e, segundo Vicente et al. (2005), custa cerca de 600 €/kg. Esta enzima é adsorvida em resina macroporosa, sendo particularmente adequada para reações de esterificação e interesterificação, inclusive em processos robustos. O seu suporte é Duolite ES 562, baseado numa resina de troca aniônica fraca em co-polímeros de fenol-formaldeído (NOVOZYMES, 2010). Ressaltando-se que Høge-Jensen et al. (1988) relataram que houve alteração da especificidade da lipase frente a diferentes ácidos graxos (C4:0 a C18:1) como consequência da imobilização.

De acordo com as informações técnicas da Novozymes, a Lipozyme[®] RM IM é, particularmente, mais indicada para as reações de interesterificação, atuando nas ligações ésteres das posições 1 e 3 dos triacilgliceróis. Além disso, é aplicável tanto em reatores em batelada como em coluna.

A atividade da Lipozyme[®] RM IM varia e, portanto, é informada a cada lote. Suas atividades características, em média, são de 5 a 6 BAUN/g (Unidade de Acidólise) e 150 IUN/g (Unidade de Interesterificação), de acordo com a Novozymes.

A atividade enzimática, em unidade de acidólise, conforme citado acima, é determinada para esta lipase, pela Novozymes, utilizando-se como substratos o óleo de girassol de alto teor de ácido oléico e ácido decanóico na reação a 70 °C por 60 min. A velocidade de reação é determinada pela quantidade de ácido decanóico incorporado nas posições 1 e 3 dos triacilgliceróis presentes neste óleo de girassol de alto teor de ácido oléico.

A Lipozyme[®] RM IM pertence à classe de hidrolases de triacilglicerol (EC 3.1.1.3). É um produto granular com o tamanho das partículas de 0,2 a 0,6 mm. A densidade volumétrica varia de 350 a 450 kg/m³. A resina de troca aniônica macroporosa está fortemente ligada à lipase por adsorção. Nesta resina não há agentes de ligação cruzada. Além disso, no suporte de imobilização o teor de água da é baixo, geralmente de 2 a 3%.

A coloração da Lipozyme[®] RM IM pode variar de lote para lote.

Esta lipase também atende à especificação de pureza para enzima de grau alimentício determinada pela *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) e pela *Food Chemicals Codex* (FCC) (NOVOZYMES, 2000).

Segundo estudos avaliados pela Novozymes, a atividade máxima de Lipozyme[®] RM IM é obtida quando a enzima, com a matriz do suporte, contém aproximadamente 10% (m/m) de água, sendo que esta lipase pode ser utilizada a temperaturas de 30 a 70 °C.

Em relação ao meio reacional, a Lipozyme[®] RM IM atua tanto em sistemas livres de solvente como em sistemas com solventes inertes (por exemplo, éter de petróleo e *n*-hexano). No entanto, observou-se pela Novozymes que a atividade específica é dependente da qualidade do óleo.

3.3 TENSOATIVOS

Os emulsificantes são tensoativos (agentes redutores da tensão superficial da água, por exemplo) com uma denominação moderna, por agirem como umectantes e penetrantes, possuindo a principal função de estabilizar uma emulsão através do aumento de sua estabilidade cinética. Outra classe conhecida de tensoativos é a de surfactantes, substâncias que ativam a superfície e, especialmente como detergentes, interagem fisicamente tanto com o óleo como com a água, desta forma estabilizando a interface entre as gotas de óleo e água em suspensão (IUPAC, 2010).

A característica marcante de um tensoativo, de maneira geral, é apresentar, em uma mesma molécula, uma parte polar, solúvel em água (hidrofílica) e uma parte não polar, insolúvel em água (hidrofóbica), ou seja, ser anfifílico, o que permite modificar as propriedades da camada superficial que separa duas fases. Na superfície do líquido, a parte hidrofílica adere às moléculas da água, rompendo as atrações intramoleculares, reduzindo a tensão superficial. Instantaneamente, ocorre um aumento da área de superfície de contato, ocasionado pelo colapso da estrutura esférica da gota de água, obtendo-se uma boa ação umectante (DICKINSON, 1992).

Comumente, observa-se que a parte hidrofóbica é formada por uma cadeia de hidrocarbonetos de 8 a 18 átomos de carbono, linear ou ligeiramente ramificada (REIS, 2010). O anel benzênico pode substituir alguns átomos da cadeia. A parte hidrofílica funcional pode variar amplamente, podendo ser aniônica, catiônica, não iônica e dipolar (zwitteriônico). Esta composição serve como critério para a

classificação dos tensoativos.

Os tensoativos não iônicos não contêm carga, porém, geralmente, a porção polar da molécula é formada por polioxietilenos ou grupos glicosídicos, altamente hidrofílicos (Exemplos: Brij, Triton X-100, Tween CxEy, dodecil- β -D-maltosídeo, digitonina) (KIRK, 1997). Mattsson et al. (1994) observaram esta característica hidrofílica através da hidratação dos grupos amida, amina, éteres e hidroxilas. Os não-iônicos não apresentam uma carga líquida, têm baixa condutividade e mobilidade eletroforética, e não se ligam em resinas de troca iônica (Ex: CHAPS, SB 3-10, ASB) (CHEVALLET et al., 1998).

Os surfactantes zwitteriônicos apresentam propriedades combinadas de surfactantes iônicos e não-iônicos, de acordo com o pH do meio.

Uma emulsão é uma mistura estável de dois líquidos imiscíveis, em que um deles (a fase descontínua) encontra-se na forma de finos/pequenos glóbulos imersos no outro líquido (a fase contínua). Como exemplos de produtos emulsionados, tem-se a manteiga e a margarina (emulsões de água em óleo), e maionese e alguns cosméticos (considerados como emulsões de óleo em água) (DICKINSON e STAINSBY, 1982; DICKINSON, 1992).

A estabilidade das emulsões envolve várias etapas: dois líquidos imiscíveis separados em duas fases (I e II); emulsão da fase II dispersa na fase I; a emulsão instável progressivamente retorna ao seu estado inicial de fases separadas; e, o surfactante se posiciona na interface entre as fases I e II, estabilizando a emulsão (AKOH e MIM, 2008). Sabe-se que as emulsões são instáveis termodinamicamente, e, para formá-las, deve-se fornecer energia através de agitação, de homogeneizadores, ou de processos de *spray*. Por exemplo, para impedir que o óleo segmente-se da água, ação natural, utilizam-se agentes emulsificantes (ou surfactantes). Um emulsificante natural é a gema de ovo, que contém o fosfolípídeo lecitina, que estabiliza a emulsão do óleo na água ou no leite.

Outra forma de classificar os tensoativos é através do seu valor Balanço Hidrofílico e Lipofílico (BHL), que compreende valores no intervalo entre 0 e 20. Os valores próximos de zero correspondem aos emulsificantes mais solúveis em óleo do que em água, e os emulsificantes que possuem valores de BHL próximos de 20 apresentam característica contrária. Portanto, emulsificantes com valores baixos de BHL são ideais para estabilizar sistemas Água/Óleo (A/O), como margarina, por exemplo, e aqueles com valor alto de BHL são adequados para emulsionar sistemas Óleo/Água (O/A) (BOCKISCH,

1993).

Segundo Fomuso et al. (2001), os emulsificantes também desempenham um papel na estabilidade oxidativa das gotículas de óleo, comportamento de extrema importância em alimentos. A carga das gotículas nos alimentos, determinada pelos componentes ativos da superfície, influencia no nível de oxidação lipídica em uma emulsão O/A (MANCUSO et al., 1999; MEI et al., 1998; MEI et al., 1999). Além disso, as características físicas das gotículas podem afetar a cinética de oxidação de emulsões O/A. A estrutura física das gotículas depende de sua concentração, tamanho e estado físico. McClements e Decker (2000) já haviam percebido que, em emulsões O/A, existe a necessidade de mais estudos básicos sobre a influência das características das gotas sobre oxidação lipídica.

3.3.1 Aspectos gerais dos emulsificantes mono- e diacilgliceróis

Na indústria de alimentos, observa-se uma vasta aplicação dos emulsificantes monoacilgliceróis e diacilgliceróis, os quais são geralmente obtidos a partir da glicerólise de triacilgliceróis. Entretanto, tanto os processos químicos como os enzimáticos, utilizados para sua obtenção, exigem processos de separação e purificação dos acilgliceróis ao final do processo (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis), além de ácidos graxos livres e glicerol. Motivados por esta questão, Fregolente et al. (2009) estudaram a viabilidade da destilação molecular para concentrar o produto de interesse. Essa destilação, ao contrário da destilação convencional, não causa degradação e oxidação dos compostos, causadas pela aplicação de altas temperaturas, e se baseia nas baixas pressões de vapor dos produtos de interesse. Logo, percebe-se que a destilação molecular não se baseia em uma verdadeira destilação, ou seja, no equilíbrio entre fases, e sim na diferença de massas molares entre si. Os resultados obtidos por Fregolente et al. (2005) para a purificação de monoacilgliceróis resultantes da reação de glicerólise química de óleo de soja foram bastante promissores pois, após várias etapas de destilação molecular, a composição da mistura de acilgliceróis e ácidos graxos livres partiu de 43,6% de monoacilgliceróis para 96,3%.

Em contrapartida, estudos recentes de Fregolente et al. (2009) com glicerólise enzimática combinada com processo *downstream* de destilação molecular apresentaram resultados não tão elevados. Logo após a reação, obtiveram-se 46,63% de diacilgliceróis e 21,72% de

monoacilgliceróis. Após os estágios de destilação molecular em cascata (100 – 250 °C), no óleo resultante da corrente de resíduo obteve-se 30,57% de triacilgliceróis, 54,03% de diacilgliceróis, 14,19% de monoacilgliceróis, 1,21% de ácidos graxos livres e 0% de glicerol, e maior concentração de monoacilgliceróis destilados, de 13,20% para 80%, aplicando-se uma vazão de alimentação de 10 mL/min, temperatura do evaporador de 250 °C e pressão da câmara de vácuo igual a 0,15 mmHg. O objetivo principal deste experimento foi o enriquecimento do óleo de soja com diacilgliceróis.

Diante destes resultados, percebe-se que, embora Fregolente et al. (2009) tenham obtido um óleo concentrado em diacilgliceróis, a reação da glicerólise enzimática livre de solvente em óleo de soja não obteve um bom rendimento de emulsificantes mono- e diacilgliceróis. A agitação mecânica, apenas, não permitiu maior contato interfacial da emulsão com o sítio ativo da lipase. Portanto, em vista disso e da idéia de alimentos mais isentos de substâncias tóxicas, começa-se a propor o uso de surfactantes de grau alimentício com o objetivo de aumentar a área superficial de contato dos substratos, óleo e glicerol, e, assim, a reação ser catalisada pela ação da enzima anfifílica (lipase), que age na sua interface (VALÉRIO et al., 2009b; FELTES et al., 2010). Além disso, este tipo de surfactante apresenta as mesmas características desejáveis dos tensoativos, como formar uma película protetora, impedindo que a emulsão se desestabilize por aglutinação das micromicelas, sendo esse um estudo que deve ser mais aprofundado em relação a influência que pode haver de micelas reversas no sistema.

3.3.1.1 Monoacilgliceróis (MAGs)

A estrutura química do monoacilglicerol é constituída por apenas uma função álcool, geralmente proveniente do glicerol, esterificada com um ácido graxo. O triacilglicerol – três grupos hidroxila do glicerol esterificados com ácidos graxos – é o acilglicerol mais abundante e comum na natureza, em óleos e gorduras.

De acordo com a WHO e os órgãos europeus de regulamentação, os monoacilgliceróis comerciais de uso alimentício devem conter um mínimo de 70 % da soma de monoacilglicerol e diacilglicerol, com o limite mínimo de 30 % de monoacilgliceróis e máximo de 7 % de glicerol (DRAMSTRUP et al., 2006).

As formas isoméricas existentes são 1(3)-monoacilglicerol (isômero α) e 2-monoacilglicerol (isômero β). Sendo que o primeiro isômero, mesmo puro, rapidamente converte-se para o segundo tipo de

isômero, formando uma mistura.

Grompone (2011) afirma que a propriedade funcional do monoacilglicerol é similar aos outros lipídeos, pois fazem parte do ciclo natural do metabolismo. Portanto, não há razões para restringi-los ao consumo humano. O Parlamento e a Direção do Conselho da União Européia aprovam o emulsificante monoacilglicerol (E 471) como aditivo alimentício *quantis satis*, isto é, sem limite máximo permitido, e possui o atestado de GRAS pela *U.S. Food and Drug Administration* (DRAMSTRUP et al., 2006). Na indústria química, pode atuar também como surfactante.

Sabe-se também que os monoacilgliceróis, em meios ácido, básico e enzimático, possuem o mesmo comportamento que as demais gorduras. Já seu ponto de fusão é cerca de 10 a 20 °C superior ao dos demais acilgliceróis. Quando existem ácidos graxos poliinsaturados em um emulsificante, o seu ponto de fusão diminui.

Os monoacilgliceróis possuem pressão de vapor maior que os triacilgliceróis, mas não superior à dos ácidos graxos que o constitui. Além disso, os monoacilgliceróis com ácidos graxos poliinsaturados são os compostos lipídicos simples mais polares e os surfactantes mais utilizados, devido à presença de uma “cabeça” polar composta por dois grupamentos hidroxila ligados ao radical do glicerol e de uma grande cadeia apolar (longos radicais acila).

Os monoacilgliceróis são tensoativos não iônicos, com característica polar, devido à atração existente com as moléculas de água por pontes de hidrogênio. Geralmente, estes emulsificantes distribuem-se entre a interface do sistema bifásico apolar/polar, embora sejam mais solúveis em uma das fases.

Tendo em vista que os monoacilgliceróis tendem a valores baixos de BHL, estes são aplicados para estabilizar emulsão do tipo A/O, como margarina. Este emulsificante causa um segundo efeito favorável à estabilidade da emulsão, o monoacilglicerol possui um ponto de fusão maior do que o do triacilglicerol com o mesmo tipo de ácido graxo, ocorre uma cristalização inicial ao redor das gotas de água que estão emulsionadas no meio lipídico (fase contínua) (BOCKISCH, 1993).

Atualmente, é bastante comum a produção comercial de monoacilglicerol por glicerólise química de óleos, onde se empregam altas temperaturas (220 a 225°C) e catalisadores químicos inorgânicos, em atmosfera inerte de nitrogênio. Este processo causa cor escura e sabor queimado, além de consumir mais energia (DRAMSTRUP et al., 2006) e produzir, aproximadamente, apenas 35 a 50% de mono- e diacilgliceróis, 10% de triacilgliceróis não reagidos, glicerol residual 3 a

4% e ácidos graxos livres entre 1 a 3%.

Dentre os métodos observados na literatura para se obter uma maior concentração de monoacilgliceróis mais puros, destacam-se:

- destilação molecular: os monoacilgliceróis são volatilizados de um filme formado na superfície aquecida moderadamente, sob vácuo. Isto permite até 90% de rendimento sem decomposição do produto (NISHIDE et al., 2004 apud GROMPONE, 2011), e acima de 96% com degradação do glicerol e ácidos graxos;

- extração supercrítica com CO₂: monoacilgliceróis com 99% de pureza utilizando-se de temperaturas baixas (PETER, 1996).

Na indústria, são conhecidos três tipos de monoacilgliceróis: líquidos, plásticos ou sólidos, segundo o óleo/gordura utilizado. De acordo com Stauffer (2004), para cada tipo, existe um índice de iodo característico (nível de insaturação), expresso em número gramas de iodo absorvido por 100,0 g da amostra. O monoacilglicerol sólido apresenta índice de iodo em torno de 5, o destilado em pó entre 19 a 36 e, de tipo plástico, entre 65 a 75.

A partir destas classificações, de acordo com o nível de insaturação, os monoacilgliceróis possuem um emprego específico na indústria. Por exemplo, os produtos de panificação utilizam concentrados de monoacilgliceróis, 50 a 60%, denominados “plásticos”, com a finalidade de retardar o endurecimento do pão. É comum neste ramo o uso de três tipos de produtos: plástico, hidratado e destilado em pó (STAUFFER, 2004). Já em margarinas de mesa, utiliza-se quantidade entre 0,05 a 0,15% de monoacilgliceróis sólidos (saturados). Caso se deseje uma margarina *light*, utilizam-se, em maior quantidade, monoacilgliceróis líquidos (insaturados) (entre 0,2 a 0,3%).

Outra forma de aplicação do monoacilglicerol é a sua modificação, com o objetivo de obtê-lo com propriedades mais eficientes para uso em emulsões específicas, como maior atividade lipofílica ou hidrofílica. Por exemplo, os monoacilgliceróis etoxilados – triacilgliceróis reagidos por glicerólise formando monoacilgliceróis e diacilgliceróis, com os grupos OH livres etoxilados – fortalecem massas em panificação. Outra forma encontrada é de ésteres de monoacilgliceróis com ácidos orgânicos ou até seus anidros (cítrico, acético, láctico, succínio e diacetiltartárico), cuja Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 50 mg/kg corporal (BOCKISCH, 1993; STAUFFER, 2004).

3.3.1.2 Diacilgliceróis (DAGs)

Na estrutura química apresentada pelos diacilgliceróis, há duas funções de álcool ($-OH$) esterificadas por ácidos graxos, os quais podem ser iguais ou distintos. Suas possíveis formas isoméricas são *sn*-1,2 (2,3)-diacilglicerol (isômero α , β) e *sn*-1,3-diacilglicerol (isômero α , α'). A razão destes isômeros nos produtos alimentícios é de aproximadamente 3:7, pois, além de *sn*-1,3-diacilglicerol ser o isômero mais estável, é responsável pelos benefícios à saúde. Isto ocorre porque esse isômero é metabolizado por um caminho metabólico diferente do triacilglicerol e do 1,2-diacilglicerol (MENG et al., 2004).

Os diacilgliceróis são emulsificantes não iônicos muito úteis na indústria de alimentos, cosméticos e fármacos. Estudos recentes indicam que os diacilgliceróis, em si, estão associados a certos benefícios na dieta humana e de animais. Um óleo contendo 80% (m/m) de diacilgliceróis e o restante de triacilgliceróis é comercializado no Japão desde 1999, sendo considerado como óleo de cozinha funcional ou óleo de diacilgliceróis. Alguns dos benefícios comprovados deste tipo de óleo são a redução dos níveis de triacilgliceróis após as refeições (*postprandial*) no sangue e inibição do acúmulo de triacilgliceróis na gordura do corpo e no fígado, segundo Kristensen et al. (2005) e Maki et al. (2009).

Logo, os diacilgliceróis podem ser usados não só como emulsificantes, juntamente com os monoacilgliceróis (FUREBY et al., 1997; GUNSTONE, 1999), mas também como agentes funcionais, substituindo a maior parte dos triacilgliceróis presentes nos óleos alimentícios. Utilizando-se a destilação molecular, Fregolente et. al. (2009) obtiveram óleo de soja concentrado com diacilgliceróis, com coloração e odor semelhantes ao óleo de soja original, embora o óleo tenha sido submetido a aquecimentos, durante o processo. Visto que o óleo foi submetido em contato com o evaporador durante o tempo equivalente a 0,2 a 1 s, no entanto, o óleo destilado apresentou-se sem degradação excessiva, oxidação demasiada ou perda das características, que pode tornar o óleo de diacilgliceróis um bom substituto do óleo de triacilgliceróis na dieta humana. Além disso, os óleos ricos em diacilgliceróis apresentam propriedades de cozinha similares aos óleos que contêm predominantemente os triacilgliceróis, porém, com certos benefícios fisiológicos, incluindo o controle de excesso de massa em animais e em humanos. Estudos sobre o consumo de óleo constituído de diacilgliceróis e produzido por lipase imobilizada da Novozymes, denominado de *Healthy Econa Cooking Oil*, verificaram que o

diacilglicerol é digerido e absorvido no intestino delgado, sendo consumido como energia, sem voltar a ser sintetizado como gordura neutra, como acontece com os óleos convencionais, constituídos principalmente por triacilgliceróis. Conseqüentemente, consegue-se reduzir o teor de gordura neutra no sangue e, ao longo do tempo, combater a obesidade (MENG et al., 2004)

Os diacilgliceróis são codificados pela União Européia da mesma forma que os monoacilgliceróis, E 471. Em gorduras e óleos naturais, normalmente há menos de 5% de diacilgliceróis. O método industrial tradicional de glicerólise de triacilgliceróis por catálise química direciona a reação para a formação preferencial de monoacilgliceróis. Em contrapartida, glicerólises enzimáticas podem possibilitar a obtenção de diacilgliceróis.

Nas reações de glicerólise, o diacilglicerol pode ser formado por duas rotas. Através da remoção de um acilglicerol do triacilglicerol ou por acilação do monoacilglicerol formado durante a reação. Pesquisas verificaram que a aplicação de lipases 1,3-regiosseletivas resultaram em altos rendimentos de 1,3-diacilgliceróis (WATANABE et al., 2003). Todavia, em reações de esterificação de ácidos graxos podem ocorrer migrações intermoleculares de radicais acila, promovendo a formação de triacilgliceróis, sendo necessário um controle cinético destas reações (WALDINGER e SCHNEIDER, 1996 apud GROMPONE, 2011). Entretanto, os diacilgliceróis produzidos através de hidrólises parciais de triacilgliceróis, podem aumentar o seu rendimento após a purificação dos produtos da reação (PLOU et al., 1996).

Na produção de diacilgliceróis é vantajoso ter uma redução dos teores de triacilgliceróis e um aumento do teor de monoacilgliceróis. Desta forma, a purificação dos emulsificantes de interesse é facilitada, tendo em vista que há uma maior diferença de pressão de vapor entre monoacilgliceróis e diacilgliceróis do que entre diacilgliceróis e triacilgliceróis (CHEONG et al., 2007). Os monoacilgliceróis podem ser destinados para a aplicação industrial como emulsificantes ou serem reutilizados na glicerólise para aumentar o rendimento de diacilgliceróis (CHEONG et al., 2007).

Além disso, apesar de os diacilgliceróis serem formados pela hidrólise de triacilgliceróis no trato intestinal, é necessária a sua ingestão (SEONG-KOON et al., 2007).

3.3.2 Surfactantes de grau alimentício

Os tipos de surfactantes/emulsificantes baseados em lipídeos

mais importantes na indústria de alimentos são os surfactantes de moléculas pequenas não iônicas (por exemplo, monoacilgliceróis, ésteres de sacarose, Tweens, Spans), aniônicas (por exemplo, ácidos graxos), ou zwitteriônicas (por exemplo, os fosfolipídeos como lecitina) (AKOH e MIND, 2008).

Em processos biocatalíticos, é mais interessante a ausência de solventes orgânicos, pois podem afetar as enzimas e exigem uma etapa de purificação rigorosa ao final do processo. Existem estudos que sugerem o uso de surfactantes para promover maior dispersão dos substratos orgânicos, imiscíveis (VALÉRIO et al., 2009a). No entanto, para a aplicação de um surfactante mais biodegradável e obtenção de aditivos mais adequados para consumo humano, outros estudos apontam a possibilidade de se utilizar surfactantes de grau alimentício, como os Tweens (polioxietileno ésteres de sorbitana) nas reações de glicerólise, como, por exemplo, de óleo de oliva e de óleo de peixe, catalisadas pela lipase Novozym[®] 435 (VALÉRIO et al., 2009b; FELTES et al., 2010).

Nas Figuras 8a, b e c estão apresentadas, respectivamente, as estruturas aproximadas dos Tween 65 (polioxietileno triestearato de sorbitana), 80 (polioxietileno monooleato de sorbitana) e 85 (polioxietileno trioleato de sorbitana), avaliados por Valério et al. (2009b) e Feltes et al., (2010) em reações de glicerólise. Para os dois estudos, a condição do sistema com o Tween 65 foi a que apresentou melhor rendimento para diacilgliceróis – aproximadamente 43% (m/m) – na reação de glicerólise de azeite de oliva e óleo de peixe, respectivamente.

A lecitina (fosfolipídeo) apresenta também uma molécula anfifílica, sendo um dos surfactantes de grau alimentício mais utilizados na indústria de alimentos, de fármacos e de cosméticos. Considerando-se a existência de ligações éster nesta molécula (Figura 8d), estudos verificaram a modificação da estrutura dos fosfolipídeos de lecitina da gema de ovo (CHOJNACKA et al., 2009) e de soja (HOSSEN e HERNANDEZ, 2005) por certas lipases, enriquecendo-os com ácidos graxos de interesse, com propriedades funcionais.

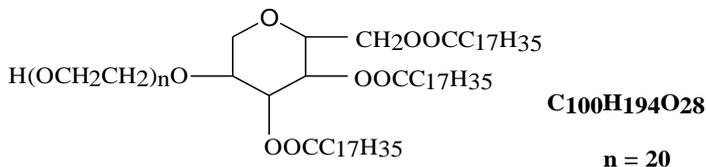


Figura 8a Estrutura aproximada do Tween 65 (polioxietileno triestearato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).

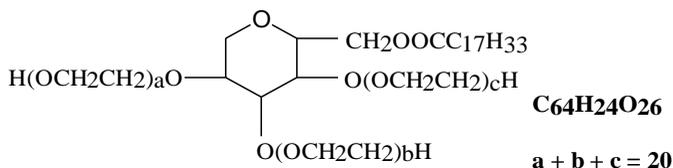


Figura 8b Estrutura aproximada do Tween 80 (polioxietileno monooleato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).

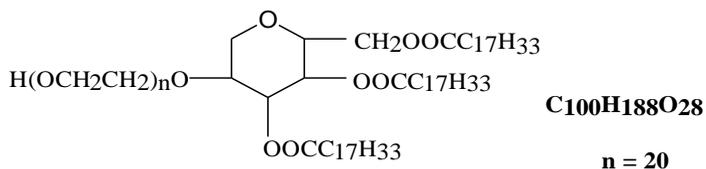


Figura 8c Estrutura aproximada do Tween 85 (polioxietileno trioleato de sorbitana). Fonte: Hua Yuan (2010).

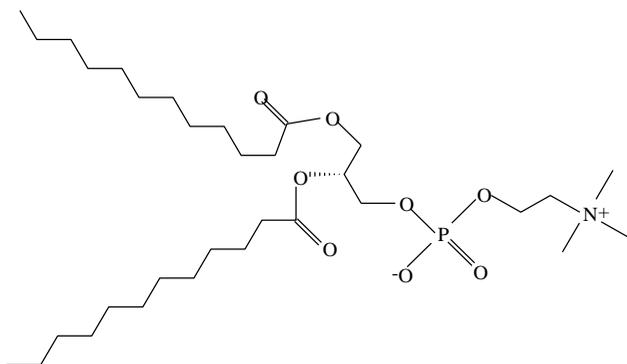


Figura 8d Estrutura da L-alfa-fosfatidilcolina (uma classe de fosfolípídeo presente em gema de ovo e grão de soja). Fonte: Chemical Book (2011).

Estudos indicaram que alguns surfactantes, inclusive surfactantes não iônicos como os Tweens, após pré-tratamento com o detergente colato de sódio podem dobrar a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei*, mesmo em meio orgânico. No estudo de Dellamora-Ortiz et al. (1997) foi demonstrado que o colato de sódio é, possivelmente, um ativador da enzima Lipozyme[®]RM IM, aumentando a atividade da enzima 2,5 vezes, depois de incubada com 7 mM deste detergente. Em seguida, esta enzima foi adicionada em meio reacional com *n*-hexano e 80 mM de Tween 80 ou 90 mM de Tween 20 (polioxietileno monolaurato) e observou-se que a sua atividade foi duas vezes mais alta, aparentemente, por meio da ação adicional de emulsão sobre o substrato.

Adicionalmente, Skagerlind et al. (1998) avaliaram as interações entre a lipase do *R. miehei* e surfactantes, onde se supôs que, mesmo abaixo da concentração micelar crítica de surfactante, ligações ocorrem no local carregado negativamente das enzimas, que fazem com que interajam com os grupos de surfactantes catiônicos, ou seja, a adsorção é um pouco melhorada pela interação entre um domínio hidrofóbico adjacente ao local carregado negativamente da enzima e a cauda do surfactante catiônico. Todavia, tais interações não foram encontradas em surfactantes aniônicos e nem nos não iônicos. A interação entre surfactantes catiônicos com esta lipase provocou a redução da velocidade de reação em hidrólises do óleo de palma, pois a lipase considerou o surfactante catiônico como substrato. Todavia, para assegurar que isso não ocorra com os surfactantes aniônicos e não iônicos com cadeias hidrofóbicas volumosas, indica-se utilizar surfactantes em reações baseadas em microemulsões, tendo a lipase do *R. miehei* como catalisador (SKAGERLIND et al., 1995).

GLICERÓLISE DE LIPÍDEOS

A glicerólise é um tipo de reação de interesterificação em meio orgânico para a transformação de óleos e gorduras. Esta reação de interesterificação pode ser mais vantajosa do que os outros mecanismos de obtenção de mono- e diacilgliceróis. Isto porque, teoricamente, a estequiometria indica a conversão total dos três ácidos graxos dos triacilgliceróis catalisada por lipases, específicas ou não (FREITAS et al., 2008), conforme a Figura 9.

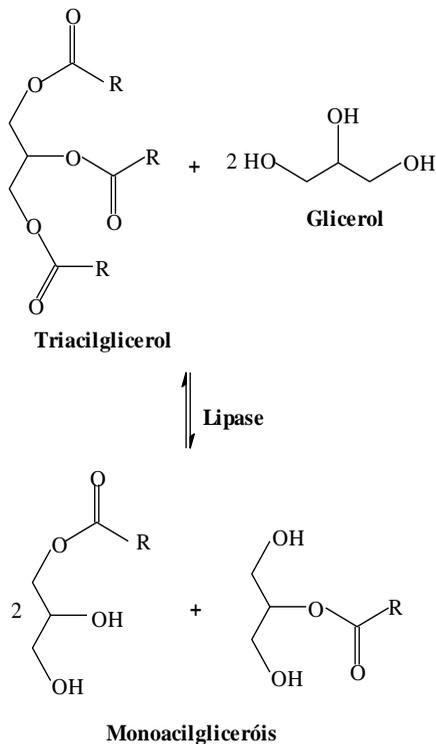


Figura 9 Esquema da reação de obtenção de monoacilgliceróis por glicerólise enzimática.

Nas reações de glicerólise, um mol de triacilglicerol na presença de excesso de glicerol (dois moles, por exemplo) resulta em três moles de monoacilglicerol. No entanto, para que a glicerólise renda resultados consideráveis, é necessário um catalisador químico ou enzimático (KRÜGER et al., 2010).

A composição da mistura final, em especial de mono- e diacilgliceróis, dependerá dos valores das constantes de equilíbrio de ambas as reações, os quais, por sua vez, são dependentes da temperatura e da proporção inicial de glicerol em relação à concentração de triacilglicerol de partida (GROMPONE, 2011). Deve-se salientar, também, que esta reação não forma, simultaneamente, quantidades equimolares de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, como indicado na Figura 10 (GROMPONE, 2011).

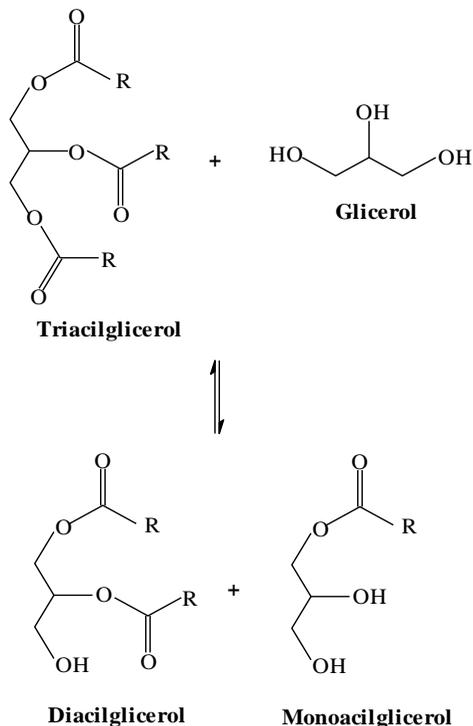


Figura 10 Reação de glicerólise com formação simultânea de monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

Segundo Grompone (2011), a estabilidade relativa dos isômeros existentes de monoacilglicerol e diacilglicerol limita-se principalmente a 1-monoacilglicerol e 1,3-diacilglicerol. Isto é devido à isomerização espontânea do 2-monoacilglicerol a 1-monoacilglicerol e do 1,2-diacilglicerol a 1,3-diacilglicerol, sendo reações reversíveis e com suas próprias constantes de equilíbrio, dependentes da temperatura.

Deve-se ter atenção com a presença de água no meio reacional de glicerólise, pois pode provocar, em paralelo, a hidrólise dos acilgliceróis parciais presentes. Ferreira-Dias et al. (2001) informam que o glicerol é um potente ligante à água e tem uma atividade de água (a_w) baixa, de aproximadamente 0,17. Logo, o aumento do teor de glicerol leva à redução da a_w do meio reacional e, conseqüentemente, inibe as reações de hidrólise concorrentes. Porém, podem ocorrer diferentes afinidades de glicerol (hidrofilicidade) para com o suporte da enzima imobilizada. A Lipozyme[®] RM IM possui um suporte hidrofílico, o que causa uma

maior concentração de glicerol no microenvolvimento desta enzima imobilizada e, assim, baixo rendimento de monoacilgliceróis. Com isso, é dificultado o uso em excesso de glicerol em relação ao triacilglicerol, em glicerólise catalisada pela Lipozyme[®] RM IM. Tal fato ocorreu no estudo de Ferreira-Dias et al. (2001), onde afirmaram que o suporte desta enzima é seis vezes mais hidrofílico que o suporte da Novozym[®] 435 (lipase imobilizada de *Candida antarctica* fração B, comercializada pela Novozymes). A maior concentração de glicerol no microenvolvimento da Lipozyme[®] RM IM forma uma camada neste suporte, o que limita o contato da lipase com os substratos hidrofóbicos (triacilglicerol ou diacilglicerol).

Experimentalmente, observou-se que, de forma geral, nas reações de glicerólise, ocorre a migração do grupo acila, de tal forma que se estabelece um equilíbrio de concentração dos produtos formados na razão de 9:1 (1(3)-monoacilgliceróis para 2-monoacilgliceróis) (HOLMBERG e ÖSTERBERG, 1988). No entanto, o equilíbrio é no sentido desfavorável da reação, o que resulta em baixo rendimento de monoacilgliceróis, 30 a 50%, caso o objetivo seja a formação preferencial destes acilgliceróis. Diante disto, estudos realizados por Holmberg et al. (1989) e Chang et al. (1991) abordaram estratégias para que o equilíbrio desloque-se para o sentido de interesse.

Outros problemas identificados em reações de glicerólise envolvem a aquafilicidade (indicador de afinidade com a água) do suporte de imobilização da enzima (RESLOW et al., 1988 apud FERREIRA DIAS e FONSECA, 1993), a determinação quantitativa dos acilgliceróis parciais (FERREIRA DIAS e FONSECA, 1993) e a temperatura de reação, que não deve atingir a temperatura de fusão dos monoacilgliceróis para que facilite a sua remoção do meio, evitando, assim, o equilíbrio reacional ser logo alcançado (McNEIL et al., 1990). O estudo realizado por McNeill e Yamane (1991) observou também que certos fatores, como o controle do teor de água do meio reacional, variação da polaridade do meio reacional (proporção entre triacilglicerol e glicerol), podem influenciar no melhor desempenho do processo. O glicerol pode gerar desvantagens por não ser solúvel no óleo, e por poder ser adsorvido pelo suporte da enzima imobilizada, o que a faz perder atividade. Este problema possivelmente pode ser contornado pelo uso de sílica gel no meio (GROMPONE, 2011), embora esta seja uma alternativa que pode não ser viável para aplicações industriais.

Dependendo das condições reacionais em sistemas de glicerólise, deve-se observar quais as características de influência negativa das enzimas imobilizadas, como a eletroafinidade do suporte

(FREGOLENTE et al., 2008), a modificação da especificidade da lipase por diferentes ácido graxos após a sua imobilização (HUGE-JENSEN et al., 1988), a robustez do suporte (NOVOZYMES, 2010), e a limitação difusional causada pelo suporte (COSTA NETO, 2002), além do custo elevado. Em contrapartida, o uso de enzimas imobilizadas pode apresentar vantagens, como reutilização, maior rendimento de produto, a não formação de metabólitos contaminantes, e a não alteração das características cinéticas da enzima (SCHMIDELL et al., 2001).

3.3.3 Glicerólise química de lipídeos (Método convencional)

Neste método, os catalisadores comumente aplicados são os inorgânicos, como sódio, potássio ou hidróxido de sódio. Quando se utiliza uma base forte como catalisador, há uma ação saponificante sobre os triacilgliceróis, produzindo sabões, reação secundária não desejada, favorecida pela presença de água e pelo aumento da temperatura (GROMPONE, 2011). Na Figura 11, observa-se a reação secundária indesejável da glicerólise química com catalisadores alcalinos (NaOH, por exemplo) para a formação de monoacilgliceróis.

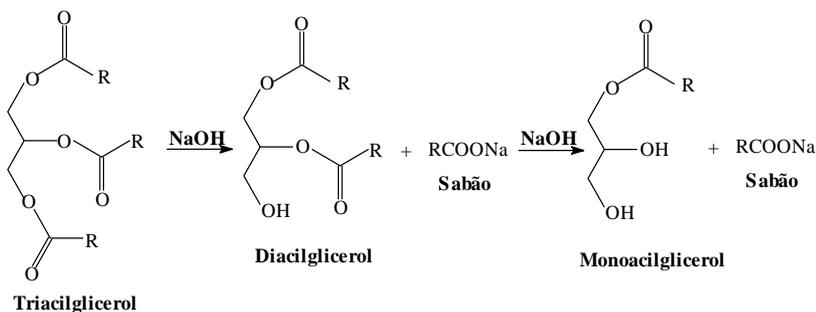


Figura 11 Reação secundária da glicerólise química com catalisadores alcalinos para a formação de monoacilgliceróis. Fonte: Grompone (2011).

A presença de ácidos graxos livres e sabões, no produto final, causa sabor e aroma indesejáveis nos produtos alimentícios, aos quais os mono- e diacilgliceróis, obtidos por este método, são incorporados.

Na obtenção de monoacilglicerol via química, o rendimento será maior quanto maior for a quantidade de glicerol dissolvido, devido ao deslocamento da posição de equilíbrio no sentido de formação de

monoacilglicerol. A quantidade de glicerol dissolvido depende da temperatura, sendo 4% à temperatura ambiente em gorduras comuns, aumentando até 20 – 22% a 175 – 200 °C (SIGUIRA et al., 1995; FLICKINGER, 2004 apud GROMPONE, 2011). Durante a reação, o aumento da quantidade de mono- e diacilgliceróis formados altera a solubilidade do glicerol na gordura.

Por fim, Siguiira et al. (1995) observaram que este tipo de glicerólise envolve uma agitação a temperaturas altas (175 a 250 °C), com atmosfera inerte (situação ideal), um óleo ou gordura com 20 a 25% em contato do catalisador alcalino (0,05 a 0,2% de NaOH). O equilíbrio desta reação é alcançado depois de 3,5 horas utilizando ao final 200 °C e com 16,63% de glicerol e 0,1% de NaOH em relação à massa total. Nestas condições, é possível obter cerca de 37% de monoacilgliceróis, 39% de diacilgliceróis, 17% de triacilgliceróis e 7% de glicerol livre, além da presença de 1% de sabão, devido ao uso de um catalisador alcalino. Estes rendimentos de mono e diacilgliceróis são considerados baixos.

Outro fator que contribui para este baixo rendimento é que ao final da reação, a fase da gordura que contém os mono- e diacilgliceróis formados se torna saturada e, ao esfriar, a quantidade de glicerol dissolvido diminui. Se houver ainda a presença do catalisador no meio, a reação de formação dos acilgliceróis pode deslocar-se para o sentido inverso. Por isso, há a necessidade de eliminar o catalisador, por neutralização, ao final da reação.

3.3.4 Glicerólise enzimática

Recentemente, muitos estudos têm ressaltado a especificidade das lipases como uma característica determinante para a obtenção de novos produtos/triacilgliceróis de maior valor agregado. Por exemplo, como os alimentos com propriedades funcionais e com maior biodisponibilidade no organismo humano, denominados lipídeos estruturados.

Em reações de glicerólise enzimática, as condições são brandas. As reações ocorrem à pressão atmosférica; as temperaturas aplicadas são próximas à ambiente e o pH é aproximadamente neutro (FREGOLENTE et al., 2008)). Isto resulta em produtos de melhor qualidade, com menor intensidade de sabor, aroma e cor indesejáveis, ao contrário do que é obtido no método convencional. A Tabela 1 ilustra algumas pesquisas de interesse para o presente estudo, a qual engloba a aplicação de substratos de origem animal (peixe) e vegetal, refinados e residuais, em ausência de solventes orgânicos, com a aplicação de

agitação magnética para a maioria dos casos.

Entre os estudos apresentados, destaca-se o rendimento de aproximadamente 22% de 1,3-diacilgliceróis para a reação de óleo de colza, na presença de 5% m/m (em relação ao óleo) da Lipozyme[®] RM IM, com agitação magnética de 250 rpm e proporção molar de óleo e glicerol de 1:2, a 65 °C por apenas 2 h. Não obstante, o glicerol foi adsorvido em sílica gel (KRISTENSEN et al., 2005).

Em outra pesquisa apresentada na Tabela 1 (EOM et al., 2010), houve aproximadamente 70% de conversão para diacilgliceróis, obtendo-se um óleo de diacilgliceróis sintético. Dentre a composição de ácidos graxos do teor de 1,3-diacilgliceróis, obteve-se 17,32% de ácido graxo- ω 3; 3,08% de EPA e 12,54% de DHA, a partir de óleo de Atum. Nesta investigação, empregaram-se as seguintes condições: 10% (m/m) da Lipozyme[®] RM IM, razão molar de óleo e glicerol igual a 1:3, 10% de água, 35 °C, apenas com agitação magnética de 500 rpm e com 24 h de reação. Em contrapartida, em estudo com a Novozym[®] 435, obtiveram-se 19,41% de diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir de óleo de Savelha, adicionado em uma proporção molar de 1:2, em relação ao glicerol, a 55 °C por 2 h, homogeneizando-se o meio com agitação mecânica de 600 rpm e 10% m/m (em relação ao total de substratos) de Tween 65 (FELTES et al., 2010). Em outro estudo, obtiveram-se 16,1% de diacilgliceróis, menor rendimento de diacilgliceróis apresentado na Tabela 1, através da reação de glicerólise de óleo de oliva, na mesma proporção molar de substratos, utilizando-se como surfactante Aerosol-OT (4:1 m/m) e *n*-butano pressurizado a 1 bar, a 70 °C por 2 h (VALÉRIO et al., 2009a).

A partir da revisão da literatura sobre glicerólise enzimática (Tabela 1), observa-se que houve avanços na obtenção de mono- e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos poliinsaturados (termoinstáveis e oxidáveis) a temperaturas de no máximo 70 °C. Além disso, normalmente os produtos não necessitam de purificação, em especial devido à especificidade de certas enzimas e dependendo das condições reacionais.

Tabela 1 Condições e resultados de estudos sobre glicerólise enzimática em batelada.

Lipase imobilizada aplicada	Substrato (TAG)	Condições otimizadas	Homogeneizador(es) do sistema	Produtos formados (rendimento-m/m)	Observação	Referência
Lipozyme [®] RM IM ¹	Óleo residual de oliva	Fase orgânica: 12 cm ³ de solução de TAG em <i>n</i> -hexano (30%, m/v); concentração de TAG é a concentração comum de micela (por exemplo, a solução de óleo bruto com hexano após a extração em escala industrial); GLL/TAG = 1 (mol/mol); 12 – 26% (m/m) de lipase; 30 °C e 1 h	Agitação + <i>n</i> -hexano	43 – 45% MAG; ≈ 20% DAG e 10% AGL	26% m/m (em relação ao total de substratos) de Lipoyme [®] RM IM	Ferreira-Dias et al. (2001)
				43 – 45% MAG, 2% AGL	12% (m/m) Novozym [®] 435	
Novozym [®] 435 ²				≈ 20% DAG	26% (m/m) Novozym [®] 435 + GLL:TAG = 1 ou 3 (mol/mol)	
Lipase [®] IM ³	Óleo de soja	TAG = 100 g, GLL = 21 g (0,15% de água); 30 g de lipase, 3 g de água no sistema, 72 h e 5 °C	450 rpm	12,6% TAG; 24,5% MAG; 43,2% DAG; 17,9% AGL e 2,0% GLL.	Reação em presença de água e, onde há cristais parcialmente precipitados (método patenteado)	Sugiura et al. (2002)

Lipozyme® RM IM ¹	Óleo de girassol	TAG:GLI = 1:1 (mol/mol); 20% m/m (em relação ao total de substratos), lipase	Agitação magnética 300 rpm	≈ 48% TAG; 40% DAG; 7% MAG e 4% AGL	A lipase imobilizada possui 3% de água.	Yang et al. (2003)
Lipozyme® RM IM ¹	Óleo de colza	TAG:GLI = 1:2 (mol/mol); 5% m/m (em relação à TAG) de lipase; 3,5% (m/m) de água destilada na massa de GLI; 2 h e 65 °C	Agitação magnética Aproximadamente 250 rpm	≈ 22% DAG 0% (sem reação, a lipase aderiu ao GLI nas paredes do tubo)	GLI adsorvido na sílica gel GLI não adsorvido	Kristensen et al. (2005)
Lipase® RM IM ¹		GLI/TAG (mol/mol) = 4; 10% (m/m) de lipase (em relação à TAG); 3,5% (m/m) de água (em relação ao GLI); 40 °C e 24 h	Agitação magnética (300 rpm)	≈ 58% TAG; 30% DAG; 10% MAG e 7% AGL	A Lipozyme® RM IM causa maior concentração de GLI no microenvolvimento da enzima, pois o suporte tem afinidade 6 vezes maior pela água do que a lipase CA-IM.	Fregolente et al. (2008)
Novozym® 435 ²	Óleo de soja			≈ 10% TAG; 40% DAG; 17% MAG e 7% GL		

Lipase AK "Amamo" ^{3,4}	Óleo de Atum	10% (m/v) de TAG em éter metil <i>tert</i> -butil; GLL:TAG = 3:1; 4% (m/m) de água adicionado ao GLL; 30% m/m (em relação à TAG) de lipase; 45 °C e 24 h.	300 rpm + éter metil <i>tert</i> -butil	24,6% MAG = 56% PUFA (EPA + DHA)	Constantes cinéticas: $K_m = 19,5 \text{ mM}$ e $V_{max} = 2,71 \text{ mg}_{MAG}/\text{min}$	Pawongrat et al. (2007)
		GLL:TAG = 2:1 (mol/mol); 7,5% (m/m) de lipase; 70 °C e 2 h.	600 rpm + 7,5% (m/m) de Aerosol-OT ou AOT	58% MAG; 16,1% DAG; 8,5% TAG		
Novozym [®] 435 ²	Óleo de oliva	GLL:TAG = 2:1 (mol/mol); Solvente: Substrato = 4:1 (m/m); 7,5% (m/m) de lipase; 30 °C e 2 h	600 rpm + 1,3% (m/m) AOT + <i>n</i> -butano pressurizado a 10 bar	45,3% MAG; 20,1% DAG; 18,3% TAG	Na presença de <i>n</i> -butano pressurizado, pode-se utilizar uma temperatura menor e uma menor quantidade de AOT.	Valério et al. (2009a)
		GLL:TAG = 6:1 (mol/mol); 9% (m/m) de lipase; 70 °C e 2 h	600 rpm + 16% (m/m) de surfactante (Tween 65, de grau alimentício, ou Triton X-100, tóxico)	43,17% MAG+DAG e 36,79% TAG 37,02% MAG+DAG e 37,98% TAG		
Novozym [®] 435 ²	Óleo de oliva				Tween 65	Valério et al. (2009b)
					Triton X-100	

Lipozyme® RM IM ¹	Óleo de Atum	GLI:TAG = 3:1; 10% (m/m) de lipase; 10% de água. 35 °C e 24 h	Agitação magnética 500 rpm	1,3-DAG: 17,32% AG- ω 3; 3,08% EPA e 12,54% DHA	Para óleo DAG sintetizado, após ~70% de conversão em DAGs	Eom et al. (2010)
Novozym® 435 ²	Óleo de Savelha	GLI:TAG = 2:1; 10% (m/m) de lipase em relação aos substratos e surfactante; 55 °C e 2 h	Agitação mecânica 600 rpm + Tween 65, 80 e 85	15,51 \pm 0,44% DAG e 42,72 \pm 0,88% TAG	Tween 80	Feltes et al. (2010)
				19,41 \pm 0,68% DAG e 42,72 \pm 0,16 % TAG	Tween 65	
				17,04 \pm 0,07% DAG e 46,31 \pm 1,13% TAG	Tween 85	

¹ *Rhizomucor miehei* e suporte hidrofílico. ² *Candida antarctica* – lipase B e suporte hidrofóbico. ³ *Rhizomucor miehei* e suporte relativamente hidrofílico. ⁴ *Pseudomonas fluorescense* – imobilizada em Accurel EP-100.

3.3.5 Meios reacionais

A literatura indica a utilização de diferentes sistemas para a consecução de reações de glicerólise, como: em presença de solventes orgânicos (McNEIL et al., 1991; FERREIRA-DIAS et al., 2001), na ausência de solventes (McNEIL et al., 1990), sendo este tipo de meio reacional o mais abordado na Tabela 1, e o menos aplicado, em microemulsões (BORNSCHEUER et al., 1994; GROMPONE, 2011).

Estudos indicam que a glicerólise enzimática normalmente apresenta baixo rendimento (25 e 35%) de monoacilgliceróis. Por esta razão, McNEIL et al. (1990; 1991) desenvolveram métodos para elevar os rendimentos das reações. Foi verificado que a remoção constante dos monoacilgliceróis da mistura, durante a reação, promove altos rendimentos. Em destaque, cita-se o método elaborado por Berger e Schneider (1992), que formou 95 a 98% de monoacilgliceróis, por meio de um sistema com um reator e um recipiente resfriado para a cristalização e separação dos monoacilgliceróis, com a recirculação da mistura reacional. Contudo, este método ainda não é interessante para indústria devido à inviabilidade da remoção dos monoacilgliceróis em um reservatório externo e pela atenção em recircular o que não reagiu.

Outro fator que deve ser abordado é a quantidade de lipase utilizada para acelerar a glicerólise. De acordo com estudos de Eom et al. (2010), sobre glicerólise de óleo de Atum livre de solventes, ocorreu um acréscimo da conversão de diacilgliceróis com a adição de Lipozyme[®] RM IM na concentração de até 10%. Acima desta quantidade, a conversão diminuía. Outros estudos de modificações de lipídeos confirmaram que cerca de 10% de lipase em relação à massa total de substratos era a proporção ótima para o maior rendimento de diacilgliceróis. Isto foi verificado em sistemas de glicerólise livres de solventes, utilizando as lipases Novozym[®] 435 e Novozym CALB L, obtidas de *Candida antarctica* B, em óleo de colza (KRISTENSEN et al., 2005), e através da Lipozyme[®] RM IM, em óleo de palma (CHEONG et al., 2007). Supõe-se que, quando há alta quantidade de enzimas no sistema da glicerólise, pode haver uma mistura irregular da reação, e, desse modo, dificultar a transferência de massa.

Em reações de glicerólise, há três fases imiscíveis: óleo (hidrofóbica), glicerol (hidrofílica) e lipase (sólida). Deve-se, portanto, contornar a característica indesejável da maioria das lipases de serem hidrofílicas e, conseqüentemente, de associarem-se principalmente ao glicerol. Isto inibe o acesso do substrato lipídico (óleo) ao sítio ativo da enzima, causando rendimentos relativamente baixos de mono- e

diacilgliceróis (KRISTENSEN et al., 2005).

Por conseguinte, é necessário avaliar estudos de bioconversão em diferentes meios reacionais. Um dos meios mais pesquisados é com solventes orgânicos, para aumentar a solubilidade do glicerol no sistema, promovendo uma maior homogeneidade. Reduz-se a viscosidade do meio, melhorando a transferência de massa. O uso de solventes requer uma purificação mais rigorosa ao final do processo e, assim, gera mais efluentes químicos e tóxicos, e, conseqüentemente, um maior custo (FIAMETTI et al., 2009).

Com isso, estudos com abordagem de sistemas reacionais livres de solventes orgânicos, à pressão atmosférica e sob temperaturas amenas, são bastante convenientes, não só por permitir uma maior separação dos produtos da reação por destilação a vácuo, mas também por implicar em menor consumo energético. Além disso, o sistema livre de solvente orgânico pode preservar a seletividade da enzima e, quando for imobilizada, possibilitar, após a sua recuperação, a sua reutilização (FREGOLENTE et al., 2008), como também promover uma otimização acentuada na produção dos emulsificantes mono- e diacilgliceróis.

Alternativamente, há pesquisas sobre reações catalisadas por lipases em microemulsões, as quais são soluções termodinamicamente estáveis, isotrópicas e transparentes. Formam-se espontaneamente ao misturar proporções pré-definidas de tensoativos, óleo e água, sabendo-se que a fase contínua pode ser o óleo ou a água. A característica que diferencia emulsão de uma microemulsão é que a primeira é turva, ou seja, as gotas possuem dimensões de 0,3 a 200 μm iguais ou maiores que o comprimento de onda da luz visível (400 a 800 nm), enquanto que, para a segunda, as gotas possuem dimensões de 5 a 100 nm que permitem que a onda de luz transpasse-as totalmente (GROMPONE, 2011).

O motivo de se utilizar microemulsões em sistemas de glicerólise é que a área interfacial entre o óleo e a água é muito maior em relação ao sistema bifásico, o que favorece uma ação catalítica mais intensa da lipase na interface dos substratos. Quando a fase contínua é o óleo, as lipases adicionadas ao sistema são dissolvidas nas gotas de água. Assim como as emulsões, existem microemulsões reversas/invertidas, ou seja, pequenas gotas de água envoltas de tensoativos para formar a interface entre as gotas dispersas na fase contínua (óleo), interface onde ocorre a solubilização das lipases, em geral, com ação catalítica constante.

Uma das formas de se obter um sistema de (micro) emulsão para a glicerólise enzimática é utilizando um surfactante, de preferência de grau alimentício, principalmente para a aplicação em alimentos

(FELTES et al., 2010). Valério et al. (2009b), após otimização da glicerólise enzimática de óleo de oliva em meio livre de solvente, porém, utilizando dois surfactantes, Tween 65 (grau alimentício) e Triton X-100, obtiveram rendimentos totais de mono- e diacilgliceróis semelhantes, cerca de 43 e 37% (m/m), respectivamente. Feltes et al. (2010) verificaram, através de planejamento experimental fatorial, bom rendimento em diacilgliceróis (43%, m/m) contendo ácidos graxos essenciais EPA e DHA, em glicerólise enzimática de óleo de Savelha, aplicando-se 15% (m/m) da lipase Novozym[®] 435 a 70 °C, razão molar de glicerol e triacilglicerol 1:1 e 5% m/m (em relação ao total de substratos) de Tween 65. Este surfactante, dentre os Tween 80 e 85, e lecitina de soja, foi selecionado para dar continuidade ao estudo por ter promovido maior rendimento em diacilgliceróis (19,41 ± 0,68%, m/m), a partir da glicerólise enzimática do óleo de Savelha em meio contendo 10% m/m (em relação ao total de substratos), com proporção molar glicerol:óleo igual a 2:1, a 600 rpm, a 55 °C por 2 h.

3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante desta revisão sobre as biotransformações de óleos e gorduras, percebe-se, simultaneamente, a necessidade e a possibilidade de se aprofundar os estudos sobre glicerólise enzimática, utilizando-se como substratos lipídeos termosensíveis e com propriedades funcionais, como o óleo de peixe (PAWONGRAT et al., 2007; EOM et al., 2010 e FELTES et al., 2010). Concomitantemente, busca-se o emprego de uma tecnologia limpa, através da não utilização de solventes orgânicos e de catalisadores químicos, e sim de meios atóxicos.

Como possibilidade viável a essa necessidade, propõe-se o uso de catalisadores enzimáticos em meio contendo surfactante de grau alimentício em reações de glicerólise. Não obstante, verificou-se que os estudos com este tipo de meio reacional em reações de glicerólise são incipientes e escassos (VALÉRIO et al., 2009b; FELTES et al., 2010). Este fato torna evidente a importância da ampliação de pesquisas de glicerólise enzimática em tal meio. O uso de tensoativos deste tipo tende a proporcionar uma produção limpa, além da obtenção de mono- e diacilgliceróis de melhor qualidade e com propriedades funcionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Como substratos, foram utilizados glicerol P.A. (99,5%, Nuclear) e o óleo de peixe comercial refinado OmegaPure[®] (Omega Protein, EUA), obtido de Savelha e estabilizado com uma mistura de tocoferóis e *tert*-butilhidroquinona.

Segundo Feltes et al. (2010), este óleo de peixe OmegaPure[®] 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). Constitui-se em uma fonte dos ácidos graxos ômega-3 (EPA, DPA e DHA) com teor total de 29,15%.

No meio reacional de glicerólise enzimática, empregou-se como surfactante de grau alimentício o polioxietileno triestearato de sorbitana (Tween 65 – ~50% ácido esteárico, balanceado especialmente em ácido palmítico – Sigma), polioxietileno monooleato de sorbitana (Tween 80 – número de hidroxilas: 65 – 80, Vetec), polioxietileno trioleato de sorbitana (Tween 85 – ~70% de ácido oléico, balanceado especialmente em ácidos elaídico, linolênico e palmítico, Sigma) e a lecitina de soja em pó (Alfa Aesar).

Para a determinação da atividade de esterificação, utilizaram-se como substratos o ácido láurico (98%, Vetec) e *n*-propanol (99,5%, Lafan).

O ácido oléico (para síntese, Vetec) foi utilizado como padrão de ácido graxo livre para as análises por cromatografia de camada delgada (CCD), onde utilizaram-se *n*-hexano (P.A.-mistura de isômeros, Isofar) e clorofórmio (99,8%, Quemis), como diluentes das amostras, assim como, para a obtenção de dois tipos de eluentes. Um de caráter apolar, envolvendo *n*-hexano, éter etílico (98%, F. Maia) e ácido acético glacial (99,5%, Nuclear), e o outro caracteristicamente apolar, com clorofórmio, álcool metílico (99,8%, Nuclear) e água destilada.

Os demais reagentes de grau analítico foram álcool etílico (95 – 99,8%, Lafan e Dinâmica), acetona (99,5%, Synth e Quemis), hidróxido de sódio (99%, Vetec), sulfato de sódio anidro (99%, Dinâmica), iodeto de potássio P.A. (98%, Vetec), *n*-heptano P.A. (99,5%,

Vetec), dicromato de potássio (99%, Synth), tiosulfato de sódio (99,5 – 100%, Reagen), ácido clorídrico (36,5 – 40%, Nuclear), biftalato de potássio (99,95 – 100%, Vetec).

A lipase comercial Lipozyme[®] RM IM é proveniente do *Rhizomucor miehei*, gentilmente doada pela *Novozymes Latin American Ltda* (Araucária-PR/Brasil), foi utilizada como biocatalisador. A atividade desta lipase em interesterificação e acidólise, declarada pela Novozymes, é de 150 IUN/g e 5 – 6 BAUN/g, respectivamente, conforme já discutido no item 3.2.1.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Qualidade do óleo de peixe

Aplicou-se a metodologia oficial da *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2003) para determinar os índices de acidez e peróxido. Os índices, formas de determinações mais comuns na análise de óleos e gorduras, expressam as propriedades físicas ou químicas deste tipo de amostra e não as porcentagens dos seus constituintes. Estes índices associados às reações características identificam e avaliam a maioria dos óleos e gorduras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.2.1.1 Índice de acidez (Método AOCS Ca 5a-40)

A acidez pode avaliar o estado de conservação do óleo, uma vez que a concentração dos íons hidrogênio é alterada freqüentemente em processos de decomposição, seja por hidrólise, oxidação (tratamento térmico, luz, lipoxigenase, metais – ferro e cobre – e metaloproteínas) ou fermentação. A decomposição promove a formação de ácidos graxos livres, provenientes dos triacilgliceróis (ARAÚJO, 2006).

O índice de acidez é definido como a quantidade de hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH), em miligramas, necessária para neutralizar uma grama da amostra. Este método é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

O método empregado avaliou a acidez titulável. Adicionou-se 7,05±0,05 g da amostra, inteiramente líquida e bem homogênea, em um erlenmeyer de 250 mL, mantendo a temperatura não acima de 10 °C do ponto de fusão do material (0 a 5 °C para óleo de peixe). Em seguida, a amostra foi dissolvida em 75 mL de álcool etílico entre 35-40 °C e adicionou-se 2 mL do indicador fenolftaleína (1%). A amostra preparada

foi titulada com a solução padronizada de hidróxido de sódio 0,01 (mol/L), agitando-se vigorosamente até o aparecimento de uma primeira coloração rosa permanente, da mesma intensidade que aquela do álcool etílico neutralizado antes da adição da amostra. Esta cor deve persistir por 30 segundos.

O índice de acidez foi expresso em função do ácido oléico, por cento (m/m) conforme a Equação 1:

$$I.A.(%) = \frac{V \cdot C_{NaOH} \cdot M_{\text{Ác.oléico}} \cdot f_{c_{NaOH}}}{m}$$

Onde:

I.A.: índice de acidez em percentual de ácido oléico (g ácido oléico/g óleo);

V: volume (mL) de solução de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação;

C_{NaOH} : concentração molar da solução de NaOH igual a 0,01 mol/L;

$M_{\text{Ác.oléico}}$: massa molar do ácido oléico (282,46 g/gmol);

$f_{c_{NaOH}}$: fator de correção da solução de NaOH 0,01 mol/L;

m: massa da amostra (g).

O valor de ácido total obteve-se multiplicando este índice de acidez (I.A.) por 1,99, conforme AOCS.

4.2.1.2 Índice de peróxido (Método AOCS Cd 8-53)

O índice de peróxido geralmente considera os peróxidos ou outros produtos similares provenientes da oxidação da gordura. É indicado para todos os óleos e gorduras, embora seja uma análise bastante empírica. Qualquer variação em suas etapas pode gerar erro no resultado, tais como: i) variação na massa da amostra e na pureza do solvente; ii) absorção do iodo pelos ácidos graxos insaturados; e iii) liberação do iodo pelo oxigênio dissolvido na solução a ser titulada, resultando em índices elevados (ARAÚJO, 2006).

Esta análise determina todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio, em termos de miliequivalentes (mEq) de peróxido por 1.000 g de amostra. O procedimento avalia a habilidade de liberar o iodo de iodeto de potássio (KI), e tem como reagentes a solução de ácido acético e clorofórmio de 3:2 (v/v), solução saturada de KI e amido 1,0%,

e solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 mol/L padronizada. A metodologia desta técnica consiste na pesagem de 1 g da amostra em erlenmeyer de 250 mL, depois adição de 20 mL da solução de ácido acético-clorofórmio 3:2, agitando-os até dissolver completamente a amostra. Em seguida, adiciona-se em seguida 0,5 mL de KI e intercala três agitações em 1 min de repouso, ao final, imediatamente, adiciona-se 10 mL de água destilada. Depois, titula-se lentamente a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sob constante agitação magnética, até que a cor amarela desapareça quase totalmente, e adicionam-se aproximadamente 2 mL da solução de amido para continuar a titular, sob agitação, até que a cor azul desapareça, liberando todo o iodo da camada do solvente.

Através das substituições dos termos da Equação 2, obtém-se o índice de peróxido em termos de mEq de peróxido por 1.000 g de amostra.

$$I.P. = \frac{(V_a - V_b) \cdot C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 1.000 \cdot f_{c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}}{m}$$

Onde:

- I.P. = índice de peróxido (mEq de peróxido/1.000 g de amostra);
- V_a = volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 mol/L gasto na titulação da amostra;
- V_b = volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 mol/L gasto na titulação do branco;
- $C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ = concentração molar da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ igual a 0,01 mol/L;
- $f_{c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}$ = fator de correção da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 mol/L;
- m = massa da amostra (g).

Deve-se observar que o volume gasto da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para o branco não deve exceder 0,1 mL.

4.2.2 Procedimentos para o estudo da lipase

Para todas as reações enzimáticas avaliadas (determinação da atividade enzimática, avaliação da ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício e a glicerólise em meio contendo ou não surfactante de grau alimentício), utilizou-se o aparato experimental indicado na Figura 12. Este sistema é constituído de um reator de vidro encamisado com volume útil em torno de 40 mL (3), fechado, em agitação

magnética (2) ou, semi-aberto, em agitação mecânica digital (4), e conectado a um banho termostatizado (1).

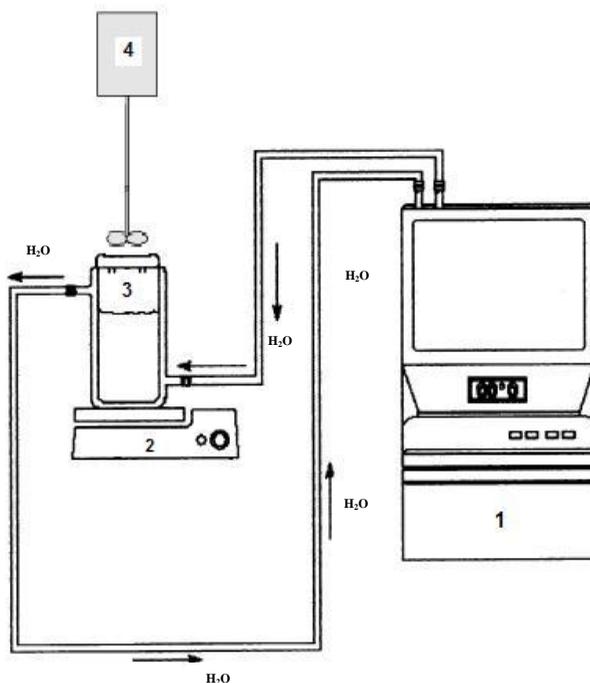


Figura 12 Aparato experimental utilizado para as reações enzimáticas: banho termostatizado (1); agitador magnético digital (2); reator de vidro encamisado (3); agitador mecânico digital (4).

4.2.2.1 Procedimento experimental para o estudo da ação da lipase sobre surfactantes de grau alimentício

Para esta avaliação, simulou-se a reação de glicerólise enzimática, sem a presença do óleo de peixe. No reator, adicionou-se apenas o glicerol (previamente tratado com sulfato de sódio anidro para a redução do teor de água, durante 10 h), o surfactante de grau alimentício e a lipase, sendo os dois últimos na proporção de 10% m/m (em relação ao glicerol). Em seguida, o reator foi fechado e mantido a 55 °C por 24 horas, sob agitação magnética constante. Após a reação, foi feita a lavagem e a filtração a vácuo da enzima, utilizando-se uma

solução de *n*-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 e a 70 °C, para a concentração da amostra referente ao tempo final da reação (24 h). A título de comparação, retirou-se outra alíquota referente ao tempo reacional de 24 h, imediatamente após atingir este tempo e, em seguida, centrifugou-a por 3 min a 14.000 rpm (centrífuga de *eppendorf*, Hsiangtai). Realizou-se também, durante 24 h, a reação do glicerol com o surfactante de grau alimentício sem a lipase, para obter-se a amostra denominada de branco. Todas as alíquotas do meio reacional, incluindo do início da reação (tempo zero) e do final da reação com (24 h) e sem a lipase (branco), foram colocadas em tubos de vidro. Logo em seguida, injetou-se o gás inerte nitrogênio (teor de umidade inferior a 10 ppm) nos tubos, os quais foram vedados e congelados à temperatura de -18 °C para análise posterior.

4.2.2.2 Procedimento experimental para a determinação da atividade enzimática

A partir das adaptações realizadas por Krüger (2010) para a determinação da atividade de esterificação da lipase, segundo metodologia previamente descrita por Oliveira et al. (2006), determinou-se a atividade residual da enzima após ter sido utilizada em reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo surfactante de grau alimentício, conforme descrito no item 4.2.6. Esta metodologia quantifica o ácido láurico esterificado com *n*-propanol, adicionados na razão molar 1:1, conforme reação indicada na Figura 13, conduzida a 60 °C, com 5% m/m (em relação ao total de substratos) de lipase. Alíquotas (150 µL), em triplicata, foram retiradas no tempo zero e de 40 min, e diluídas em 20 mL da solução de acetona e álcool etílico, 1:1 (v/v), para cessar a reação, removendo a água necessária para a ativação interfacial da enzima, e extrair os ácidos graxos fixados no suporte da lipase. Em suma, esse comportamento deve-se à eletroafinidade da solução de acetona:álcool etílico – solventes de média polaridade, conforme Bessler e Neder (2004) – em relação à água e aos ácidos graxos. A quantidade de ácido láurico não esterificado foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 (mol/L) até pH 11. A unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo (esterificação) de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

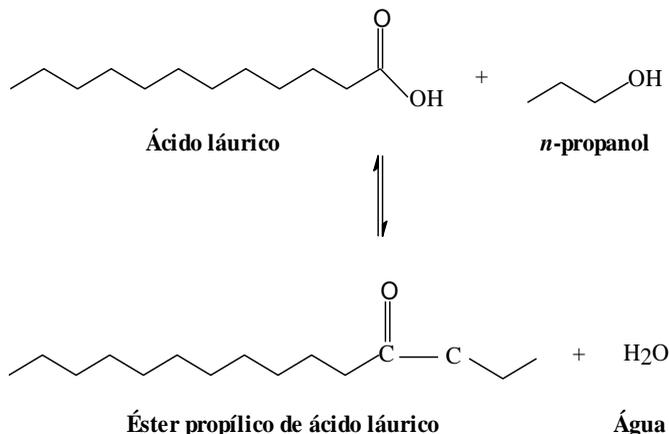


Figura 13 Reação de esterificação que ocorre entre o ácido láurico e o *n*-propanol através da lipase.

4.2.2.3 Cinética da atividade enzimática de esterificação em diferentes condições

Realizou-se o estudo cinético da atividade da lipase em estudo, em diferentes temperaturas (50, 55, 60 e 70 °C), sendo que, para a temperatura de 60 °C, a cinética também foi realizada para a lipase previamente condicionada termicamente, conforme descrito no item 4.2.3.

Para tal, empregou-se a determinação da atividade enzimática por esterificação apresentada no item anterior (4.2.2.2). Entretanto, empregando-se como temperatura de reação 60 °C, 50, 55 e 70 °C. Além disso, a sua duração (40 min) foi estendida para 120 min, período no qual obtiveram-se sete alíquotas (0, 10, 20, 30, 40, 60 e 120 min).

Contudo, vale ressaltar que, para a execução deste estudo, aplicou-se a calibração do pHmetro com soluções-tampão de pH 7 e 4; a alíquota de cada ponto (150 µL) foi constituída por alíquotas retiradas de três pontos distintos e centrais do meio reacional; o volume total de amostras retiradas do meio, ao longo da reação, foi de 10% em relação ao volume total do meio; considerou-se o branco real, isto é, o volume de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01 mol/L necessário para que o volume dos solventes para diluição da amostra atingisse pH 11; e, por fim, foram considerados os dados fornecidos pela literatura para a densidade volumétrica correspondente a cada temperatura trabalhada para o *n*-

propanol (PANGA et al., 2007; KHASANSHIN, 1983). Porém, para o ácido láurico, a densidade volumétrica utilizada foi referente à temperatura de 50 °C (S & J Lipids).

Este estudo cinético visou definir as temperaturas mais adequadas para serem avaliadas em um planejamento experimental futuro para as reações de glicerólise catalisada pela Lipozyme® RM IM. A temperatura escolhida foi aquela que permitiu a obtenção da atividade máxima da lipase.

Fazendo-se a regressão linear na parte linear da curva obtida pela quantidade de ácido láurico residual em função do tempo de reação, o coeficiente angular da curva assim ajustada forneceu o valor da velocidade inicial da reação, em termos de μmol ácido láurico consumido por minuto de reação.

A atividade específica da enzima foi determinada através de velocidade inicial da reação por massa de enzima com suporte utilizada coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo (Equação 3):

$$AE_e = \frac{v_i}{m_{RM}}$$

Onde:

AE_e = atividade enzimática específica μmol de ácido láurico/(min.mg catalisador) ou U/mg catalisador;

v_i = velocidade inicial da reação (μmol de ácido láurico/min);

m_{RM} = massa da lipase Lipozyme® RM IM utilizada na reação (mg).

A equação acima pode ser expressa conforme a Equação 4:

$$AE_e = \frac{(V_0 - V_t) \cdot M \cdot 10^3 \cdot V_f}{t \cdot m_{RM} \cdot V_a}$$

Onde:

AE_e = μmol de ácido/(min.mg catalisador) ou U/mg catalisador;

V_0 = volume de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_t = volume de NaOH 0,01 mol/L gasto na titulação da amostra retirada no tempo t (mL);

M = molaridade da solução de NaOH (0,01 mol/L);

V_f = volume final do meio reacional de cada tempo t (mL);

- m_{RM} = massa da lipase Lipozyme[®] RM IM utilizada na reação (mg);
 V_a = volume da alíquota do meio reacional retirada para a titulação (mL);
 t = tempo de reação (min).

4.2.2.4 Determinação da constante de equilíbrio na reação de esterificação

A esterificação de ácido láurico com *n*-propanol pode ser uma reação reversível, devido à formação de água como co-produto, permitindo a hidrólise dos produtos (ésteres), conforme descrito na Figura 13. Por conseguinte, existe a possibilidade de que esta reação atinja o equilíbrio, isto é, que a velocidade de formação de ésteres seja igual à velocidade de hidrólise destes produtos, tornando-se, portanto, necessário identificar a constante de equilíbrio a partir do instante em que estas velocidades se igualam.

Para este estudo, verificou-se que o equilíbrio era atingido a partir de 20 min; sendo assim, a constante de equilíbrio (K_x), para todas as cinéticas realizadas em reações de esterificação de ácido láurico com *n*-propanol foi determinada no instante de 20 min.

Uma vez atingido o equilíbrio, a proporção entre os reagentes e os produtos, conforme reação apresentada na Figura 13, é descrita por meio da relação matemática da Equação 5, mostrada a seguir:

$$K_{x_{20\text{min}}} = \frac{[EA][H_2O]}{[Ac][Al]}$$

Onde:

$K_{x_{20\text{min}}}$ = constante de equilíbrio em 20 min de reação;

$[EA].[H_2O]$ = multiplicação das concentrações dos produtos (éster propílico de ácido láurico, $[EA]$, e água, $[H_2O]$), equivalente à concentração de ácido láurico consumido (mol/L) em 20 min de reação;

$[Ac].[Al]$ = multiplicação das concentrações dos reagentes (ácido láurico, $[Ac]$, e *n*-propanol, $[Al]$), equivalente à concentração de ácido láurico (mol/L) no tempo zero ao quadrado.

4.2.3 Condicionamento térmico da lipase

O condicionamento da enzima, segundo Valério (2009), foi realizado em estufa a 40 ± 2 °C durante 1 h. Para garantir constância na temperatura de condicionamento, utilizou-se uma estufa de cultura (FANEM, modelo 502). A influência do condicionamento sobre a atividade da lipase foi estudada através da determinação da atividade de esterificação da enzima proveniente de dois lotes distintos, 2008 e 2010, antes e após o condicionamento térmico, aplicando-se a técnica descrita no item anterior (4.2.2.2).

Os resultados obtidos foram testados estatisticamente pela análise de variância de dois fatores (*Two-way ANOVA*), por meio do software estatístico MINITAB® *Release 14*.

4.2.4 Determinação da atividade de água (a_w) da lipase imobilizada

Em duplicata, determinou-se a_w das amostras de lipase condicionadas e não condicionadas termicamente, através do medidor AquaLab Série 3TE, com precisão de $\pm 0,003$. O ajuste da curva padrão deste medidor foi através da solução saturada de cloreto de lítio (LiCl), com a_w igual a 0,11.

4.2.5 Análise qualitativa da ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício

A ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício testados no presente trabalho foi avaliada qualitativamente por CCD, segundo Christie (1982), por ser uma técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas (DEGANI et al., 1998).

Para tal análise, utilizou-se placa de alumínio com sílica-gel 60G, com indicador de fluorescência (Macherey Nagel); cubas bi-partidas com tampa de vidro ou inox (Camag). Como eluente de caráter apolar, utilizou-se *n*-hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v) para as amostras contendo os Tween 65, 80 e 85, ou clorofórmio/ álcool metílico /água 95:20:2,5 (v/v/v) para as amostras contendo lecitina de soja.

Todas as amostras foram diluídas em *n*-hexano, exceto as amostras referentes ao estudo sobre o Tween 80, as quais foram preparadas com clorofórmio. A concentração utilizada para aplicação das amostras envolvendo o Tween 80 na placa foi de 80 g/mL, 20 mg/mL para as amostras relacionadas aos demais Tween (65 e 85) e para amostra pura de lecitina de soja, e 40 mg/mL para as amostras da

reação contendo a lecitina de soja e para o ácido oléico puro. Após uma vigorosa agitação da amostra em agitador de tubos vórtex (Phoenix-AP56), aplicaram-se 10 μ L da solução na placa.

Para a revelação das manchas presentes sobre as placas de CCD, utilizou-se o vapor de iodo, saturado em um recipiente (tampado) envolto, internamente, com papel filtro, sendo denominado de método 'A'. Todavia, a título de comparação para a seleção da melhor forma de revelação das placas, avaliou-se uma técnica que pulveriza uma solução de sulfato de cobre saturado e ácido fosfórico a 85% (50:50, v/v) sobre a placa, e, em seguida, aquecida em forno a 180 °C por 20 min (método 'B').

Para maior nitidez na visualização das manchas presentes na placa envolvendo o estudo realizado com os Tween 65, 80 e 85 (Figura 30), utilizou-se o aplicativo *GNU Image Manipulation Program* (GIMP 2.6.7), aplicando-se o comando *Desaturate*, o qual converte todas as cores da camada ativa para os tons de cinza correspondentes.

Estas condições de análise (concentração da amostra, sistema de eluição e método de revelação) foram ajustadas com base em indicações da literatura (CHRISTIE, 1982; FELTES et al., 2010), de forma a garantir uma boa análise qualitativa por CCD.

Para cada placa, fez-se a comparação das composições das amostras entre si, através dos fatores de retenção (R_f) correspondentes (Tabela 7).

O R_f é o parâmetro mais importante a ser considerado em CCD, o qual corresponde à razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pelo eluente (fase móvel), conforme está apresentado na Figura 14.

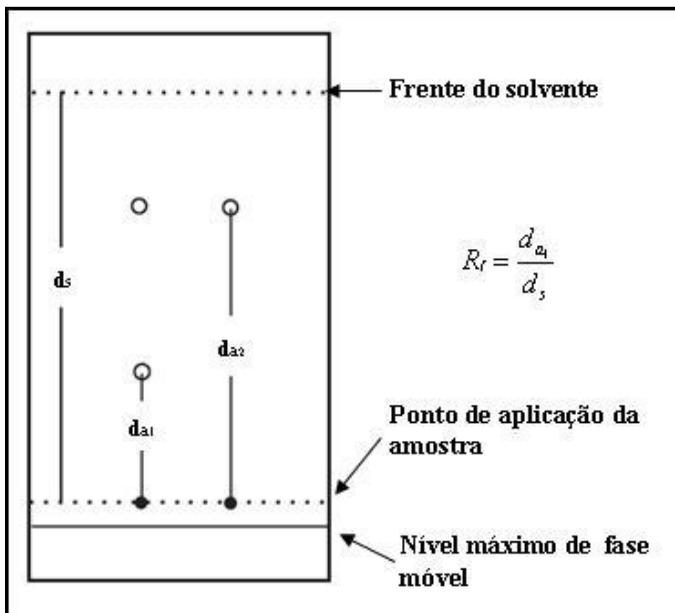


Figura 14 Esquemática de um cromatograma obtido por CCD.
Fonte: Degani et al. (1998).

4.2.6 Cinética da glicerólise enzimática para a seleção do surfactante de grau alimentício

Para selecionar o surfactante de grau alimentício mais favorável ao rendimento de diacilgliceróis em reações de glicerólise enzimática, realizou-se a cinética destas reações em meio contendo surfactante de grau alimentício, nas condições pré-definidas com base na literatura. Os surfactantes avaliados foram os Tween 65, 80 e 85. Nesta etapa, não utilizou-se o surfactante lecitina de soja, pois os resultados obtidos não foram favoráveis à sua aplicação (seção 5.4). No sistema reacional apresentado na Figura 12, adicionou-se no reator de vidro de 40 mL (3), mantido a 55 °C, aproximadamente 30 g dos substratos glicerol (tratado previamente com sulfato de sódio anidro durante 10 h, para a redução do teor de umidade) e óleo de peixe, pesados numa proporção que permitiu um volume útil do meio reacional de aproximadamente 30 mL. Desta forma, foi possível reduzir a porcentagem de erro gerada pela prática experimental, visto que coletaram-se dez alíquotas de 300 µL (micropipeta 100 – 1000 µL, Lab+mate HTL e Digipet) do meio

reacional em intervalos de tempo pré-determinados (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 8; 24; 32 e 48 h) durante a reação (48 h), com a finalidade de quantificar os produtos obtidos ao longo do tempo e avaliar a evolução do seus rendimentos. Ao coletar-se cada ponto da reação, retirou-se, juntamente com a amostra do meio, a lipase.

Após a medida dos substratos, adicionou-se 10% m/m (em relação ao total de substratos) do surfactante de grau alimentício. Em seguida, iniciou-se a agitação mecânica (haste de aço inox e equipamento RW 20 Digital – IKA) – Figura 12(4) – do meio a 600 rpm de forma uniforme. Após os primeiros 10 min, coletaram-se 300 µL da amostra referente ao tempo zero e armazenou-se a -18 °C com o gás inerte N₂. Consecutivamente, adicionou-se 10% m/m (em relação ao total de substratos) da lipase, iniciando-se a cronometragem para a retirada das posteriores amostras durante a cinética de reação.

Tendo em vista a presença da lipase nas demais alíquotas, cada amostra foi colocada em um tubo de centrifuga de aproximadamente 10 mL, para que fosse feita a lavagem da enzima com a solução de *n*-hexano e álcool etílico (1:1, v/v) extraíndo-se, assim, qualquer produto aderido ou adsorvido ao suporte do biocatalisador. Para tal, adicionaram-se, neste tubo de centrifuga, aproximadamente 6 mL da solução de lavagem e, assegurada a sua vedação, agitou-se no vórtex por 1 min. Em seguida, centrifugou-se este volume a 3.000 rpm por 5 min na centrifuga de tubos microprocessada (Quimis).

Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta de vidro *Pasteur*, para um frasco de vidro de 50 mL de boa vedação e refrigerado a 10 °C. A fração decantada (a enzima) foi lavada mais duas vezes. Este procedimento foi repetido para as alíquotas retiradas nos tempos entre 0,5 e 32 h de reação. A amostra do último ponto (48 h) foi obtida após a recuperação da lipase, por meio da sua lavagem e filtração de todo meio, em um sistema contendo um funil de Büchner com papel filtro de café em pó (n° 123) e um Kitasato conectado a uma bomba a vácuo (½ HP, J/B), utilizando-se da mesma solução de lavagem mencionada anteriormente. O filtrado assim obtido (amostra do último ponto da reação, juntamente com o solvente de lavagem) foi tratado em um evaporador rotativo a vácuo, a cerca de 60 a 70 °C e rotação entre 90 e 110 rpm, até concentrar a amostra, deixando-a isenta de solventes. Logo em seguida, essa amostra foi colocada em um frasco identificado, onde o ambiente inerte foi rapidamente obtido com a injeção de N₂, e mantido a -18 °C.

A solução de lavagem presente na lipase recuperada foi evaporada em câmara de exaustão por cerca de 30 min, à temperatura

ambiente. O recipiente contendo a lipase foi coberto com filme de cloreto de polivinila, perfurado para permitir a evaporação dos solventes residuais, e em seguida colocado em refrigeração (8 a 10 °C). Determinou-se a atividade residual da lipase recuoeradadois dias após a sua aplicação, através da atividade de esterificação (OLIVEIRA et. al., 2006 e KRÜGER, 2010).

Do segundo ao penúltimo ponto desta cinética de reação, cada amostra (300 µL, contendo o meio reacional e a enzima), diluída com as lavagens da lipase mencionadas no início deste item, foi transferida para um balão de fundo chato de 50 mL e concentrada em um evaporador rotativo a vácuo, nas mesmas condições mencionadas acima, exceto quanto à rotação, que foi inferior, em torno de 60 a 90 rpm. No entanto, os solventes não foram totalmente evaporados, manteve-se a amostra diluída em um pouco da solução de lavagem e transferiu-a para um frasco de amostra de 5 mL com tampa e batoque, sendo, às vezes, necessário a adição da solução de lavagem ao balão de 50 mL, para garantir a transferência total da amostra para o outro frasco. O solvente remanescente foi evaporado sob aquecimento em banho-maria a 30 a 35 °C, sob corrente de N₂. A evaporação foi realizada até se obter massa constante (terceira casa decimal) em medidas sucessivas da amostra, realizadas em intervalos de 10 min.

4.2.7 Quantificação dos diacilgliceróis por cromatografia em fase gasosa

Analisou-se o teor de diacilgliceróis obtidos nas reações de glicerólise enzimática do óleo de peixe em meio com surfactante de grau alimentício (Tween 65, 80 e 85) e sem surfactante, denominado de controle, por cromatografia em fase gasosa (CG). Para tanto, utilizou-se como base a Norma DIN EN n° 14105 do Comitê Europeu para Padronizações (2003), com as modificações propostas por Krüger (2010). As amostras foram previamente preparadas adicionando-se o derivatizante N-Metil-N-trifluoroacetamida (trimetilsilil) (Fluka Analytica), com o objetivo de transformar o glicerol e os mono- e diacilgliceróis, presentes nas amostras, em derivados silanizados, mais voláteis do que as amostras originais.

As amostras foram injetadas automaticamente (modo *on-column*) no cromatógrafo Shimadzu 2010, com detector de ionização de chama e utilizando-se coluna capilar DB-5HT (5% fenil e 95% metilsiloxano, W Scientific – n° de série US7162944H) com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm. Configurou-se o CG para as condições de análise à temperatura

do detector a 380 °C; temperatura da coluna programada a 50 °C/1 min, 15 °C/1 min até 180 °C, 7 °C/min até 230 °C, 10 °C/min até 370 °C, temperatura final mantida por 5 min; gás de arraste: hélio (pressão 143,5 kPa e fluxo total de 5 mL/min); e volume injetado de amostra: 1,0 µL. Esta análise foi realizada no Laboratório de Termoninâmica Aplicada da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI (Erechim, RS). Para a análise, foram feitas uma ou duas repetições, conforme a quantidade de amostra disponível. As concentrações das soluções de amostras e de padrões seguiram metodologia descrita por Krüger (2010). Após a análise cromatográfica, realizou-se a separação manual das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas, as quais foram integradas pelo *software GC Solution* (Shimadzu). Em seguida, procedeu-se à soma das áreas referentes aos di- e triacilgliceróis. Os resultados foram substituídos nas equações das curvas de calibração dos padrões externos dioleína e trioleína: $Y = 0,0000513.X$ e $Y = 0,0000634.X$, respectivamente. Estes resultados foram divididos pela concentração da solução injetada (em torno de 6.000 ppm) e multiplicados por 100. Os resultados foram expressos em teor mássico percentual em relação ao total de amostra.

4.2.8 Velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis, produtividade em diacilgliceróis e conversão de triacilgliceróis

Com base no estudo cinético das reações de glicerólise, construiu-se o gráfico da fração molar específica de diacilgliceróis (mmol/g meio reacional) em função do tempo de reação (h). O coeficiente angular da parte linear da curva assim obtida, calculado utilizando-se o *software Excel*, corresponde à velocidade inicial específica da reação, expressa em mmoles de diacilgliceróis/(g de meio reacional.h).

Para estes experimentos, a produtividade em diacilgliceróis foi determinada para avaliar o desempenho do processo enzimático sob diferentes condições, tendo sido calculada, no início da reação, onde há a máxima velocidade de formação de diacilgliceróis, conforme a Equação 6:

$$P_{DAG} = \frac{C - C_0}{t}$$

Onde:

P_{DAG} = produtividade em diacilgliceróis [mmol/(g meio reacional.h)];

C = concentração de diacilgliceróis (mmol/g meio reacional) no tempo t ;

C_0 = concentração de diacilgliceróis (mmol/g meio reacional) no tempo zero;

t = tempo de reação (h).

A conversão molar de triacilgliceróis ao longo de cada reação foi calculada com base na Equação 7:

$$Convers\tilde{a}o_{TAG,t}(\%) = \frac{TAG_t}{TAG_0} \cdot 100$$

Onde:

$Convers\tilde{a}o_{TAG,t}(\%)$ = conversão molar de triacilgliceróis em um tempo determinado de reação;

TAG_t = concentração de triacilgliceróis (mmol/g meio reacional) em um tempo determinado de reação;

TAG_0 = concentração de triacilgliceróis (mmol/g meio reacional) no tempo zero de reação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados de relevância para o melhor entendimento das conclusões obtidas neste trabalho

5.1 Qualidade do óleo de peixe

A Tabela 2 apresenta os índices de acidez e de peróxido do óleo de peixe (Savelha) OmegaPure[®].

Tabela 2 Determinações relativas à qualidade do óleo de peixe (Savelha) OmegaPure[®].

Determinações	Resultado ¹
Índice de acidez (g ácido oléico/g óleo)	0,0777 ± 0,0025
Índice de acidez total (mg NaOH/g óleo)	0,1547 ± 0,0051
Índice de peróxido (mEq O ₂ ativo/kg óleo)	0,6594 ± 0,3771

¹ Média da triplicata com desvio padrão.

Os resultados mostrados na Tabela 2 indicam que este óleo apresenta características desejáveis para o consumo humano, quando comparados aos limites máximos determinados pelos órgãos regulamentadores internacionais e nacional para óleos e gorduras específicos, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Parâmetros máximos para índice de acidez e peróxido em relação aos óleos e gorduras em geral, destinados ao consumo humano, estabelecidos pelos órgãos regulamentadores de alimentos internacionais e nacionais, pelo *Council for Responsible Nutrition* (CRN) dos Estados Unidos sobre o óleo de peixe, e, por fim, a informação do fabricante OmegaPure® para o óleo de peixe em estudo.

Parâmetro	FDA ¹	CRN ¹	ANVISA-BRASIL ²	Codex Alimentarius ³	OmegaPure® ⁴
Índice de acidez (g ácido oléico / g gordura)	1,51	1,51	1,2 – 2,8	0,65 – 1,25	0,1
Índice de peróxido (mEq O ₂ ativo/k g gordura)	5	5	10	10	1,0

¹ Os dados apresentados são para óleo de peixe (Savelha) (FDA – 21 CFR Parte 184, 2005) e para óleo de peixe em geral (PULEVA BIOTECH, 2006, p. 48 apud US CRN). ² Para índice de acidez, é estabelecido o máximo para óleo de bacalhau e de cação, 1,2% e 2,8%, respectivamente (BRASIL, 1995). Enquanto que, para índice peróxido, é determinado apenas para óleos e gorduras vegetais refinados (exceto óleo de oliva refinado) (BRASIL, 2004). ³ Parâmetros para óleos e gorduras de origem animal, sendo o limite de índice de acidez menor para banha de porco e o maior para o sebo animal (FAO – WHO). ⁴ Laudo de análises do fabricante OmegaPure® para o óleo em estudo.

A partir da Tabela 3, percebe-se que os limites máximos para os índices de qualidade do óleo de peixe são mais rigorosos. Visto que o óleo de peixe de Savelha, em especial, é notoriamente rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (EPA e DHA), atenta-se para uma maior susceptibilidade à auto-oxidação (peroxidação não-enzimática) destes ácidos graxos. Isto compromete não só a integridade das duplas ligações, como a concentração e a funcionalidade destes ácidos graxos, além de torná-los impróprios para consumo humano (PACHECO e REGITANO-D'ARCE, 2009). Além disso, esta oxidação pode causar ao óleo características sensoriais indesejáveis, como odor inadequado.

Devido à auto-oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, ocorre a formação de hidroperóxidos que sofrem transformações químicas com diversos rearranjos, formando-se concomitantemente ácidos graxos livres, nocivos ao organismo humano. O consumo contínuo de produtos

rancificados aumenta a “carga de radicais livres” no organismo, provocando envelhecimento prematuro e/ou doenças. O cientista Rufus Turner (IFOS, 2005) afirmou que, para certos tipos de óleos oxidados, há indícios do aumento de risco de arteriosclerose e trombose.

Portanto, se o óleo em estudo apresentou índices de acidez e peróxido abaixo dos parâmetros estabelecidos pelas entidades mais exigentes (FDA e CRN) para óleo de peixe, subentende-se que os ácidos graxos ômega-3 que constituem consideravelmente os triacilgliceróis deste óleo (FELTES et al., 2010), não foram degradados. Logo, a obtenção de emulsificantes (acilgliceróis) com estes ácidos graxos essenciais torna-se viável e, com isso, possível a realização do estudo do presente trabalho.

A boa qualidade do óleo é desejável para evitar também o baixo rendimento em diacilgliceróis. O aumento, principalmente, do índice de acidez devido à formação de ácidos graxos livres no meio reacional, reduz o seu pH. Esta condição é desfavorável para a estabilidade da enzima, interrompendo rapidamente a reação (HOLM e COWAN, 2008).

Estes resultados confirmam o estudo anterior com o mesmo lote deste óleo, realizado por Feltes et al. (2010), em que se verificou que os índices de acidez – 0,1368% (g ácido oléico/g óleo) e 0,2722% (mg NaOH/g óleo) – e peróxido – 0,4490 (mEq O₂ ativo/kg óleo) apresentavam-se adequados para consumo humano segundo os padrões de regulamentação internacional e nacional (Tabela 3).

Feltes et al. (2010) observaram também que o aumento da temperatura facilita a homogeneização desse óleo com o glicerol, o que é desejável durante as reações de glicerólise. No entanto, deve-se ressaltar que trabalhar com esse tipo de óleo, rico em ácidos graxos poliinsaturados, como substrato, requer a aplicação de temperaturas amenas e a ausência de agentes oxidantes.

5.2 Atividade enzimática

A metodologia para atividade enzimática segundo Oliveira et al. (2006), sugerida para aplicação neste trabalho, está consolidada para a lipase Novozym[®] 435. Houve, portanto, a necessidade de verificar a aplicação desta metodologia para a Lipozyme[®] RM IM, através de um estudo cinético.

De forma complementar, decidiu-se fazer este estudo também a 50, 55 e 70 °C, além da temperatura indicada pela metodologia (60 °C),

com o objetivo de obter o indicativo de qual a temperatura mais favorável à ação da lipase, de forma a aplicá-la em planejamento experimental futuro para a otimização da produção de emulsificantes (mono- e diacilgliceróis) ricos em ômega-3 via glicerólise de óleo de peixe em meio com e sem surfactante de grau alimentício.

As Figuras 15, 17, 19 e 21, que apresentam a quantidade de ácido láurico residual em função do tempo às diferentes temperaturas avaliadas (50, 55, 60 e 70 °C), mostram que, para todas as temperaturas, houve um rápido consumo de ácido láurico. Observou-se que, após 20 min de reação, praticamente não há mais consumo de ácido láurico. Verifica-se que a reação foi interrompida, pois a quantidade de ácido láurico se manteve constante.

As Figuras 16, 18, 20 e 22, na ordem correspondente à reação de esterificação a 50, 55, 60 e 70 °C, mostram a velocidade inicial de consumo do ácido nos primeiros 20 min com R^2 acima de 0,8.

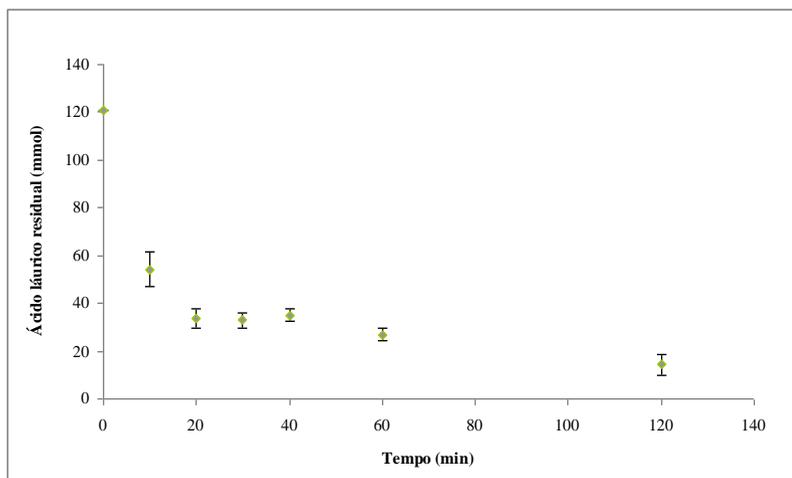


Figura 15 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com *n*-propanol a 50 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

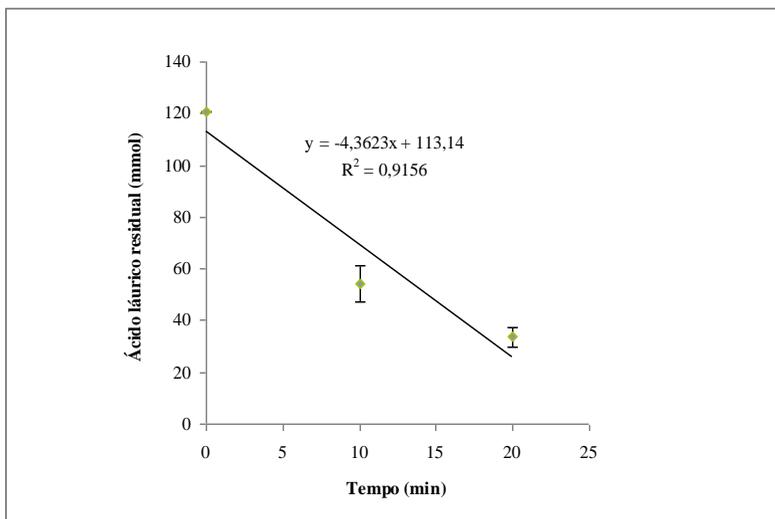


Figura 16 Determinação da atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com *n*-propanol a 50 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

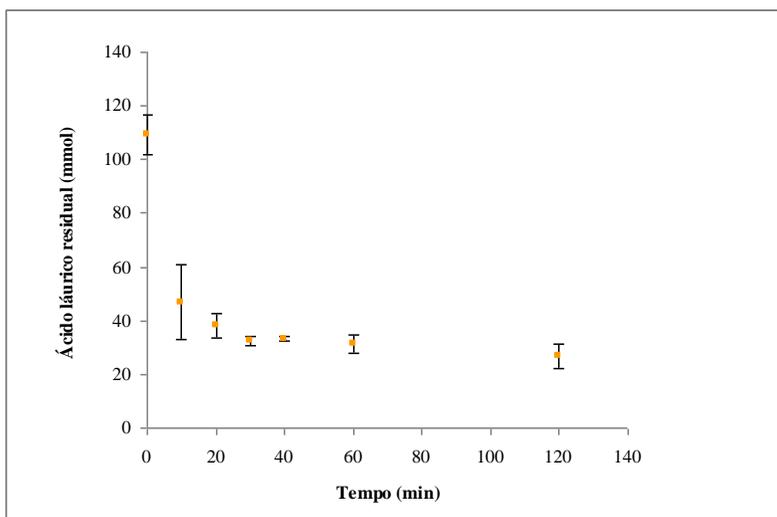


Figura 17 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com *n*-propanol a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

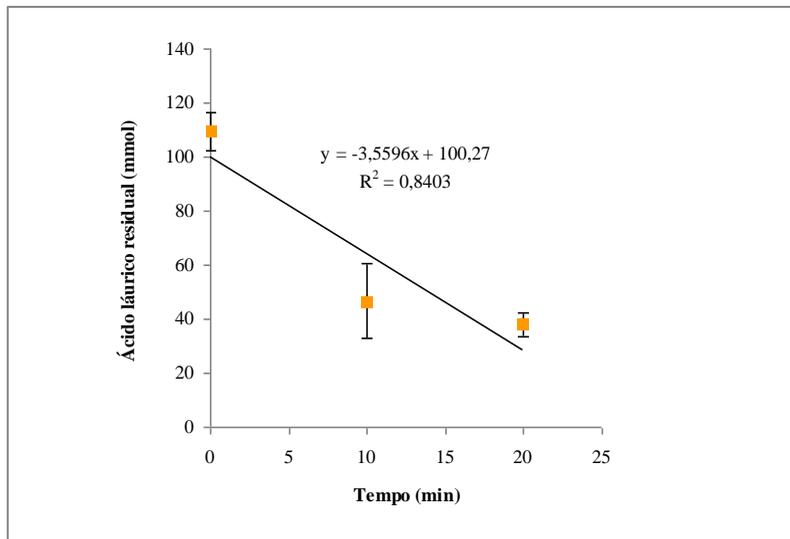


Figura 18 Determinação da atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com *n*-propanol a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

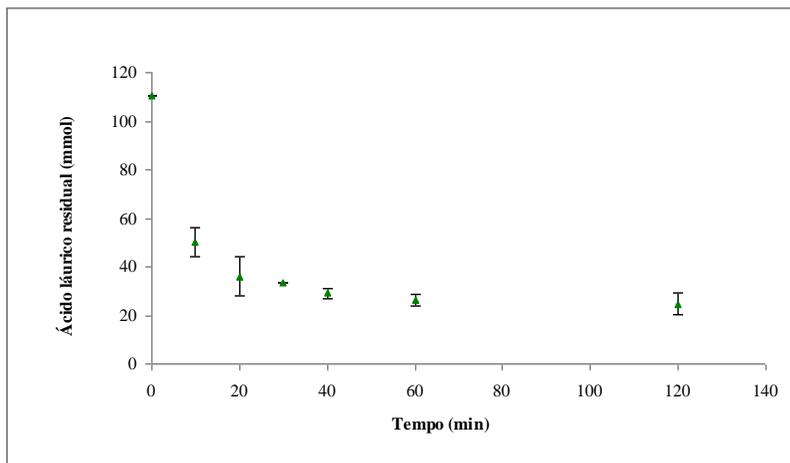


Figura 19 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com *n*-propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

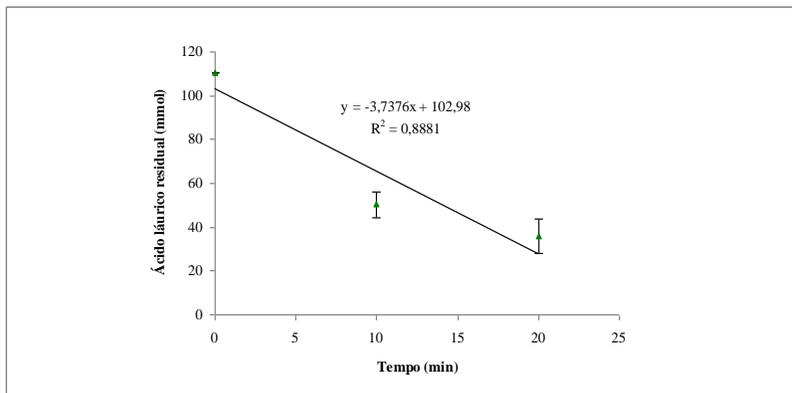


Figura 20 Determinação da atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com *n*-propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

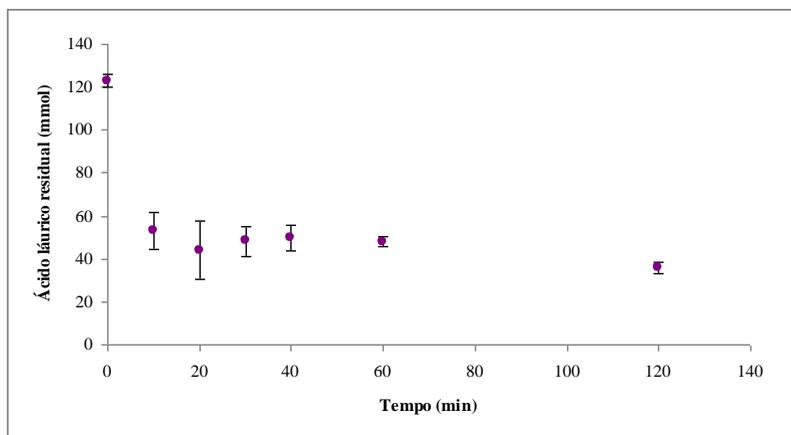


Figura 21 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com *n*-propanol a 70 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

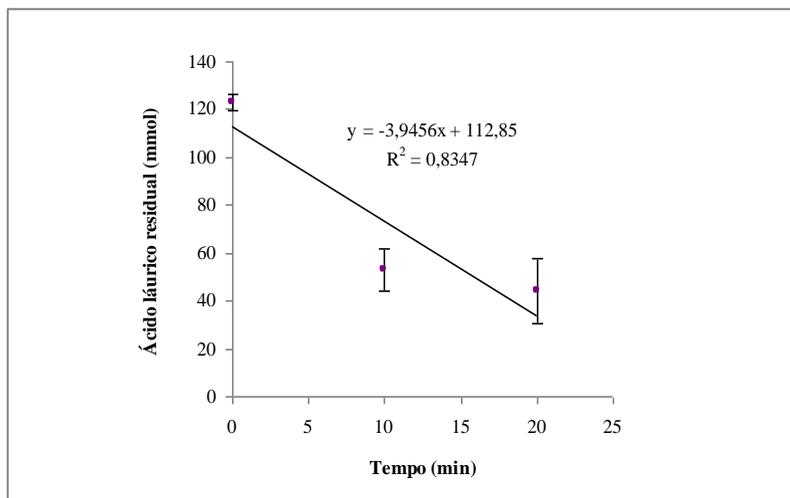


Figura 22 Determinação da atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com *n*-propanol a 70 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

As possíveis razões para que o consumo do ácido láurico seja interrompido nestas reações seriam: i) perda do segundo reagente (o substrato *n*-propanol) por evaporação; ii) perda da atividade enzimática por termodesnaturação e termodesativação da enzima; iii) perda de atividade da enzima sob ação do *n*-propanol; e, por fim, iv) o atingimento do equilíbrio da reação.

Sabe-se que o ponto de ebulição do *n*-propanol (~ 97 °C) (HALL et al., 1975) é superior às temperaturas trabalhadas (50 a 70 °C) e que o sistema era vedado, o que indica que não houve perda significativa deste substrato na reação. Com relação à termodesnaturação e termodesativação da enzima, a literatura indica que a temperatura que proporciona melhor desempenho e estabilidade da lipase de *Rhizomucor miehei*, em diversas reações de biotransformação, é em torno de 40 °C, conforme visto na Tabela 1. A Novozymes, entretanto, informa que esta pode atuar entre 30 e 70 °C. Em diferentes estudos onde se empregaram temperaturas em torno de 60 °C em reações de glicerólise, esterificação, acidólise e interesterificação entre triacilgliceróis e ésteres (KARRA-CHAABOUNI et al., 1998; KRISTENSEN et al., 2005, YANG et al., 2003), a conversão rapidamente se iniciava, porém a reação se estagnava

por volta de 3 h. No presente estudo, as cinéticas apresentadas (Figuras 15, 17, 19 e 21) indicam o fim da reação em menos de 30 min, o que subentende-se que a hipótese de instabilidade enzimática não tenha sido determinante para este resultado.

A literatura vem indicando que álcoois de cadeia curta de carbono, como álcool etílico e metílico, podem inibir e até inativar certas lipases. Shintre et al. (2002), por exemplo, justificaram desta forma a velocidade de reação baixa para a esterificação destes alcoóis com ácido láurico, catalisada pela lipase Lipolase 100 L (*Thermomyces lanuginosus*) não imobilizada. Como estes álcoois são miscíveis em água, tendem a extrair a água em volta da matriz protéica da lipase. Esta película de água, entretanto, é responsável pela integridade e pela conformação cataliticamente ativa da lipase (MILLER et al. 1988; KHMELNITSKY et al., 1994). Shintre et al. (2002) também observaram que, para o meio reacional com *n*-propanol ou *n*-butanol, a constante de velocidade da reação aumenta consideravelmente, sugerindo que, para álcoois contendo acima de dois átomos de carbono na cadeia, ocorre um aumento na sua hidrofobicidade, implicando, assim, em um menor efeito inibitório e de inativação da lipase. Logo, conclui-se que a suposição de que o *n*-propanol inativou a enzima, paralisando as reações apresentadas neste item, é pouco provável, visto que as reações atingiram o equilíbrio em poucos minutos.

A Figura 23 apresenta os dados da constante de equilíbrio (K_x), obtidos a partir dos resultados experimentais das Figuras 15, 17, 19 e 21, considerando que a reação de esterificação atingiu concentrações de equilíbrio em 20 min. Além disso, a figura destaca a influência da temperatura sobre a enzima não condicionada termicamente, em relação ao rendimento em ésteres propílicos de ácido láurico.

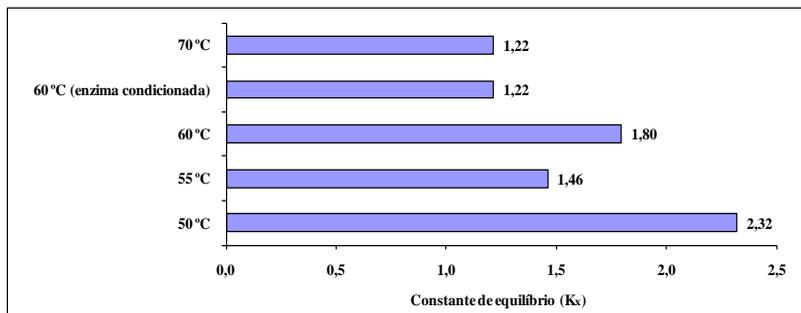


Figura 23 A relação entre a temperatura e a constante de equilíbrio (K_x) em 20 min da reação de esterificação entre ácido láurico e *n*-propanol – obtida através da Equação 5, descrita no item 4.2.2.4 – em diferentes temperaturas (50, 55, 60 e 70 °C) e com condicionamento térmico da enzima (a 40 °C por 1 h, conforme item 4.2.3) na temperatura de 60 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

Na definição de uma reação de esterificação, formam-se moléculas de água concomitantemente com moléculas de éster, fazendo, conseqüentemente, que a reação seja reversível (DIMIAN et al., 2002). Por conseguinte, esta reação pode atingir o equilíbrio, o que impede que o ácido láurico residual seja consumido totalmente juntamente com o *n*-propanol. Dimian et al. (2002) estudaram a reação de esterificação envolvendo também *n*-propanol e ácido láurico. Rodrigues et al. (2001) apud Dimian et al. (2002), a partir da minimização da energia livre de Gibbs, obtiveram a constante de equilíbrio termodinâmico baseada em atividade (K_a); a constante do coeficiente de atividade (K_y), pelo modelo UNIQUAC, utilizado para a descrição de equilíbrio de fases; e a constante de equilíbrio (K_x), baseada em fração molar, através da relação entre K_a e K_y . Os dados termoquímicos e os parâmetros de interação foram ajustados por meio dos dados experimentais de K_x , os quais corresponderam com os resultados preditos por simulação. No estudo destes autores, ao observar-se o gráfico que relaciona estas constantes com a temperatura, nota-se que K_x , para as temperaturas abaixo de 77 °C, tende a ser em torno do intervalo de 1 e 2,5. Este comportamento foi observado para cada cinética de atividade enzimática em diferentes temperaturas e condições abordadas no presente item, conforme apresentado na Figura 23.

Observa-se que a temperatura menor, 50 °C, favoreceu a formação de produto (éster propílico de ácido láurico), por apresentar o

dado de equilíbrio maior ($K_x = 2,32$). Enquanto que, a 70°C, este dado foi o menor obtido ($K_x = 1,22$), indicando que houve menor conversão. Assim como a 60 °C, com a enzima condicionada termicamente, indicando um rendimento menor do que ao empregar a enzima não condicionada.

Eom et al. (2010) verificaram que, utilizando 10% (m/m) de Lipozyme[®] RM IM numa reação de glicerólise (24 h) com óleo de Atum, a maior conversão para diacilglicerol foi atingida a 35 °C, mas a 30 °C e de 40 a 60°C reduziu-se.

No presente estudo, supõe-se que o equilíbrio é rapidamente alcançado (por volta de 30 min) devido à grande quantidade de enzima utilizada, 5% m/m (em relação ao total de substratos). De acordo com Kristensen et al. (2005), o método da Novozymes para a determinação da atividade enzimática, baseado na síntese de éster propílico laurato, utiliza apenas 0,029% m/m (em relação ao total de substratos) de lipase.

Na Tabela 4 podem ser observados os valores das atividades enzimáticas para as quatro temperaturas avaliadas (50, 55, 60 e 70 °C), sendo que a atividade enzimática foi definida como a velocidade média inicial do consumo de ácido láurico durante os primeiros 20 minutos da reação. A razão disto se deve à velocidade de consumo do ácido láurico, em 20 min, ter sido aproximadamente constante (R^2 acima de 0,8) para as quatro situações (Figuras 16, 18, 20 e 22).

Tabela 4 Atividade específica da Lipozyme[®] RM IM na reação de esterificação entre o ácido láurico e *n*-propanol em diferentes temperaturas, segundo a determinação da atividade enzimática proposta por Oliveira et al. (2006) e adaptada por Krüger (2010).

Temperatura	Atividade enzimática [U/(mg-catalisador)]*
50 °C	3,11
55 °C	2,64
60 °C	2,67
70 °C	2,92

* Método de determinação descrito no item 4.2.2.3, aplicando-se a definição da Equação 3.

Diante do exposto pela Tabela 4, é provável que, à temperatura de 50 °C, o consumo de ácido láurico tenha sido maior, tendo em vista que a sua atividade enzimática específica foi um pouco superior do que para as demais temperaturas de reação.

Estudos já verificaram que as enzimas podem ser desnaturadas por ação da temperatura, visto que são proteínas. Costa Neto (2002) afirma que a causa mais comum da inativação das enzimas é a temperatura elevada, com a perda da conformação secundária ou terciária. Contudo, segundo Turner e Vulfson (2000), a termodesnaturação é dependente da quantidade de água associada à proteína. Verificou-se que a lipase de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym[®] 435), catalisando a transesterificação de octadecanol com estearato palmítico a 130 °C, permanece ativa por mais de 1 h, sendo que a enzima e os substratos haviam sido previamente secos para a remoção máxima de água, por meio de CuSO₄ anidro por 30 dias. No mesmo trabalho, demonstrou-se que temperaturas em torno de 200 °C são necessárias para remover a água fortemente ligada às enzimas, e que o aquecimento destas proteínas, a esta temperatura, não provocou a clivagem das cadeias polipeptídicas, além de muito pouca, ou nenhuma, degradação química de determinados resíduos de aminoácidos. Concluiu-se que as enzimas que requerem pouca água para sua atividade catalítica, deverão permanecer ativas em temperaturas elevadas, desde que se mantenham estáveis contra a termodesnaturação.

O inverso ocorreu com a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada (Lipozyme[®] IM 20), submetida às mesmas condições aplicadas à Novozym[®] 435: A conversão dos substratos foi próxima a 0% e constante, indicando inatividade desta lipase como decorrência de termodesnaturação. Não obstante, de acordo com Turner et al. (1995), a lipase de *R. miehei* em condições secas ($a_w = 0,33$) apresentou-se desnaturada apenas entre 90 a 120 °C.

Adicionalmente, tal como ocorre para a maioria das reações químicas, a velocidade das reações catalisadas por enzimas aumenta geralmente com a temperatura, dentro de certa faixa na qual ela é estável e mantém a sua atividade integral (NELSON e COX, 2000). Caso ultrapasse esta temperatura, pode rapidamente ocorrer a sua desativação em um único ciclo ou em poucos ciclos de reuso.

Na Figura 24, está representada a dinâmica do consumo de ácido láurico (esterificado com *n*-propanol) para as quatro temperaturas avaliadas, o que permite comparar o comportamento da atividade enzimática em estudo, em diferentes temperaturas.

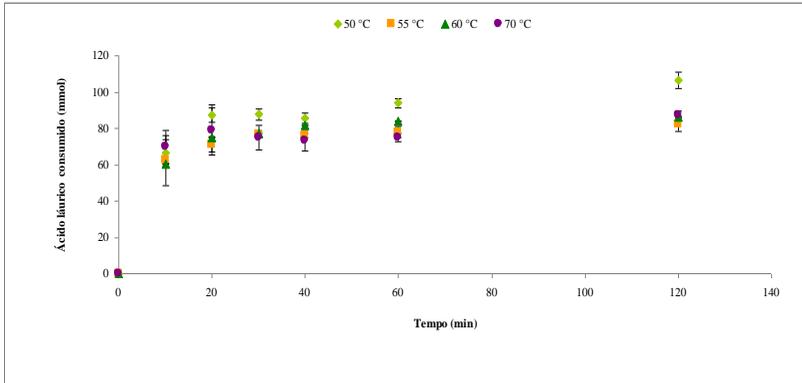


Figura 24 Cinética da quantidade de ácido láurico consumido na reação de esterificação com *n*-propanol a diferentes temperaturas, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m). Valores correspondentes presentes na Tabela A.1 do Apêndice A.

A partir da Figura 24, confirmou-se a menor temperatura de reação (50 °C) foi a que mais favoreceu a esterificação de ácido láurico, não só nos 20 min iniciais, como também ao longo de toda a reação. Logo, isto sugere que a lipase apresentou, discretamente, uma maior e mais estável atividade de esterificação a 50 °C neste tipo de reação de esterificação, descrita no item 4.2.2.2 e com as exigências de análises mencionadas no item 4.2.2.3. Para as demais temperaturas, as superiores, não se pode destacar uma temperatura que tenha proporcionado uma maior conversão do ácido láurico, considerando os desvios padrões existentes para cada instante analisado.

Nos 20 min iniciais de todas as reações (intervalo de tempo onde ocorre a atividade máxima da lipase), concluiu-se que não houve diferenças significativas entre o consumo de ácido láurico para as temperaturas de 55, 60 e 70 °C. Não se pode afirmar diferenças significativas entre estas atividades enzimáticas, considerando os desvios padrão obtidos. Contudo, vale observar que, para 70 °C, o consumo do ácido láurico nos primeiros 10 min foi superior em relação às demais temperaturas empregadas.

Na Figura 25, pode-se perceber que, a 50 °C, o consumo de ácido láurico foi maior nos 20 min iniciais da reação, resultando em uma maior atividade enzimática específica.

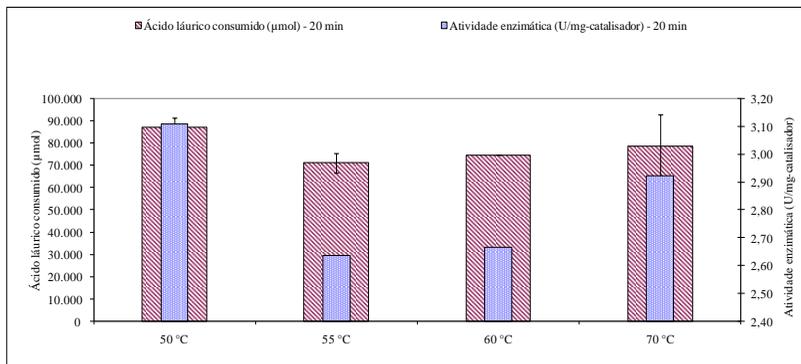


Figura 25 Relação entre o ácido láurico consumido e atividade enzimática específica na reação de esterificação com *n*-propanol a diferentes temperaturas, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (5%, m/m).

Este comportamento da lipase corresponde ao que está descrito na literatura. Segundo Fiametti et al. (2009), é comum, em uma reação de síntese de éster, uma lipase imobilizada possuir uma temperatura ótima de ação. Oliveira et al. (2006) afirmaram que a lipase imobilizada Lipozyme[®] IM, proveniente também do fungo *Rhizomucor miehei*, atinge a sua atividade ótima a 40 °C (NOVO NORDISK, 1992).

Vale ressaltar também que diversos estudos já indicaram que a lipase em estudo tem alta estabilidade em sistemas anidros, o que favorece sua aplicação em reações de esterificação, interesterificação e acidólise (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

De acordo com o presente estudo cinético, verifica-se que a atividade enzimática não foi influenciada significativamente pelas temperaturas trabalhadas (50, 55, 60 e 70 °C), destacando-se um pouco ao final da reação apenas à temperatura de 50 °C, com maior conversão dos substratos. Além disso, percebe-se que, para todas as temperaturas, após 20 min, aproximadamente, a reação atingiu o equilíbrio.

Em vista disto, decidiu-se aplicar neste trabalho a temperatura de 55 °C, a mesma trabalhada por Feltes et al. (2010) nas reações de glicerólise de óleo de peixe (Savelha), onde aplicaram-se as demais condições reacionais da mesma forma (proporção molar de glicerol para triacilglicerol, concentração de enzima e de surfactante de grau alimentício e os seus tipos), exceto a enzima, que foi Novozym[®] 435 no estudo mencionado.

5.3 Condicionamento térmico da lipase imobilizada

Em 1958, Sarda e Desnuelle perceberam que as lipases, em sua maioria, necessitam de uma ativação interfacial para sua total atividade catalítica. Neste mesmo estudo, propuseram várias hipóteses que justificam a ativação interfacial das lipases, como a mudança conformacional induzida interfacialmente, a maior concentração do substrato local e um menor grau de hidratação do substrato, uma vez que a hidratação das moléculas de lipídeos representa uma proteção às suas ligações éster.

O presente estudo avaliou o método de condicionamento segundo Valério (2009) para Lipozyme[®] RM IM por meio do monitoramento da atividade de esterificação (OLIVEIRA et al., 2006; KRÜGER, 2010), conforme o item 4.2.2.2. Inicialmente analisou-se um lote recebido em agosto de 2008, armazenado sob refrigeração, e um lote recebido em agosto de 2010 da Novozymes, com o objetivo de selecionar o lote a ser utilizado em todos os experimentos. As análises foram realizadas em agosto de 2010.

Na Tabela 5 é apresentada a atividade enzimática específica e a respectiva atividade de água (a_w) da lipase proveniente dos lotes distintos, após tratamentos prévios diferentes (com ou sem condicionamento térmico).

Tabela 5 Valores obtidos para a atividade específica e atividade de água (a_w) da Lipozyme[®] RM IM submetida ou não a condicionamento térmico (40 °C por 1 h).

	Lote da lipase	Atividade enzimática [U/(mg-catalisador)] ²	a_w ³
Condicionada¹	2008	1,226 ± 0,076	0,146
	2010	1,445 ± 0,004	0,212
Não condicionada	2008	1,175 ± 0,023	0,404
	2010	1,682 ± 0,002	0,471

¹ Condicionamento prévio da enzima a 40 °C por 1 h, segundo a metodologia detalhada no item 4.2.3. ² Determinação da atividade enzimática em 40 min (OLIVEIRA et al., 2006 e KRÜGER, 2010) catalisada pela Lipozyme[®] RM IM, em triplicata, aplicando a Equação 4. ³ Determinação da atividade de água da lipase imobilizada em duas condições distintas, em duplicata.

Primeiramente, comparou-se a atividade enzimática específica de ambos os lotes e observou-se que a lipase recebida em agosto de 2010 possuiu atividade enzimática específica igual a $1,682 \pm 0,002$ U/(mg-catalisador), aproximadamente 30,12% superior à atividade enzimática específica do outro lote, igual a $1,175 \pm 0,023$ U/(mg-catalisador). Após o condicionamento térmico prévio da lipase para ambos os lotes, observou-se que houve um sutil acréscimo de 4,13% da atividade enzimática específica para a lipase do lote recebido em 2008 ($1,226 \pm 0,076$). A lipase do lote recebido em 2010 apresentou uma redução de cerca 14,10% na atividade enzimática específica, igual a $1,445 \pm 0,04$ U/(mg-catalisador), após o condicionamento.

Através da Tabela 6, a tabela de análise de variância de dois fatores (*Two-way ANOVA*), pode-se observar que os efeitos principais dos dois fatores avaliados (lote e condição da lipase) e da interação entre eles são significativos, por apresentarem valores do teste *F* bem superiores ao tabelado ($F_{0,05;1;8} = 5,32$) (MONTGNOMERY, 1996). O mesmo ocorreu para os valores de *P*, que foram abaixo do nível de significância proposto ($\alpha = 0,05$). No entanto, a partir dos valores destes testes estatísticos, o fator lote foi o que indicou maior efeito sobre a atividade enzimática, enquanto que o fator condicionamento foi o que apresentou menos variabilidade entre os resultados.

Tabela 6 Análise de variância dos valores obtidos para a atividade específica em relação ao lote (2008 e 2010) da Lipozyme[®] RM IM condicionada a 40 °C por 1 h e não condicionada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado da média	Teste <i>F</i>	Valor- <i>P</i> *	Desvio Padrão	R ² (%)	R ² ajustado (%)
Lote	1	0,394690	0,394690	249,28	0,000			
Condicionamento	1	0,026105	0,026105	16,49	0,004			
Interação	1	0,062194	0,062194	39,28	0,000	0,03979	97,44	96,49
Erro	8	0,012667	0,001583					
Total	11	0,495656						

*Nível de significância (α) igual 0,05.

Através dos valores de R², pode-se observar que o modelo de regressão linear ajustou-se bem aos resultados.

Como complemento a esta análise de variância, avaliou-se também o estudo cinético da lipase condicionada termicamente na

reação de esterificação, de acordo com as condições reacionais abordadas no item 4.2.2.2, obedecendo às ressalvas citadas no item 4.2.2.3, permitindo, assim, uma maior confiabilidade dos resultados.

Na Figura 26, observa-se a cinética do ácido láurico consumido (mmol) utilizando-se lipase do lote de 2010, na forma condicionada e não condicionada termicamente, o que possibilita uma melhor compreensão se, o condicionamento térmico tem algum tipo de influência sobre a lipase.

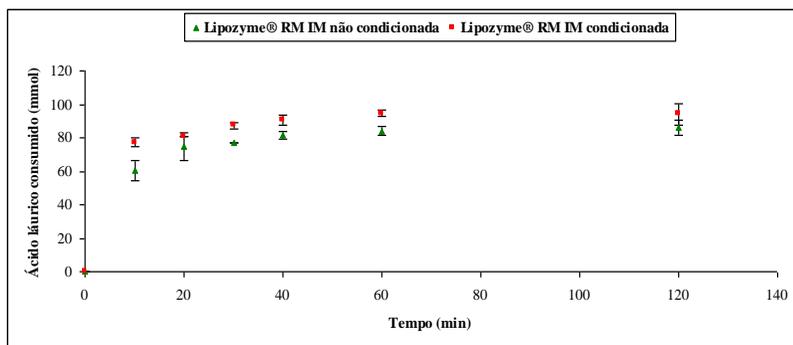


Figura 26 Cinética do ácido láurico consumido na reação de esterificação com *n*-propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m), na forma condicionada e não condicionada.

Percebe-se, através da cinética do ácido láurico consumido (Figura 26), que a lipase condicionada termicamente consumiu mais ácido láurico do que a não condicionada, durante todo o tempo de reação. O comportamento das curvas, porém, foi semelhante, indicando que, após 20 min de reação, o consumo de ácido é reduzido, tornando-se quase constante até o fim da reação. Isto significa que a reação deve atingir o equilíbrio após 20 min, hipótese coerente, como já discutido no item 5.2.

A partir da Figura 27, observa-se a quantidade de ácido láurico residual durante a reação em que se utilizou a lipase condicionada termicamente, e, na Figura 28, confirma-se que a velocidade média inicial da redução de ácido láurico no meio tende a ser constante até 20 min ($R^2 = 0,78$). Verificou-se que, nestas condições, em 20 min, a lipase condicionada apresentou uma atividade enzimática específica ligeiramente maior, 2,99 U/(mg-catalisador), em relação à lipase não condicionada, 2,67 U/(mg-catalisador), valor apresentado na Tabela 4.

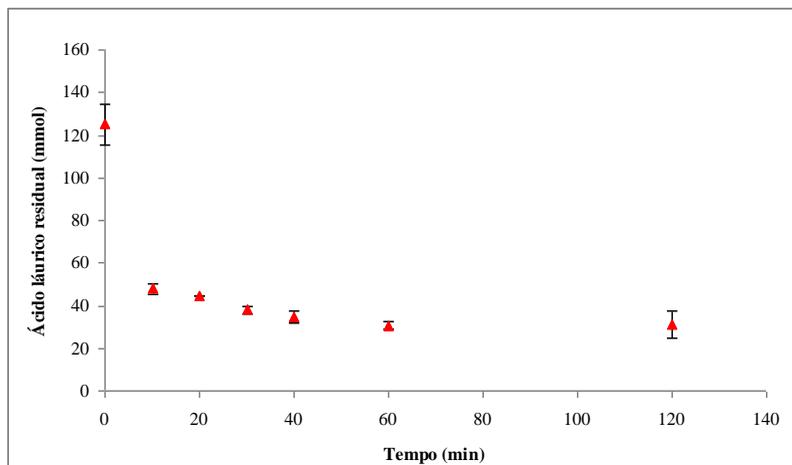


Figura 27 Cinética do ácido láurico residual (não esterificado) na reação de esterificação com *n*-propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM condicionada (5%, m/m), de acordo com o item 4.2.3.

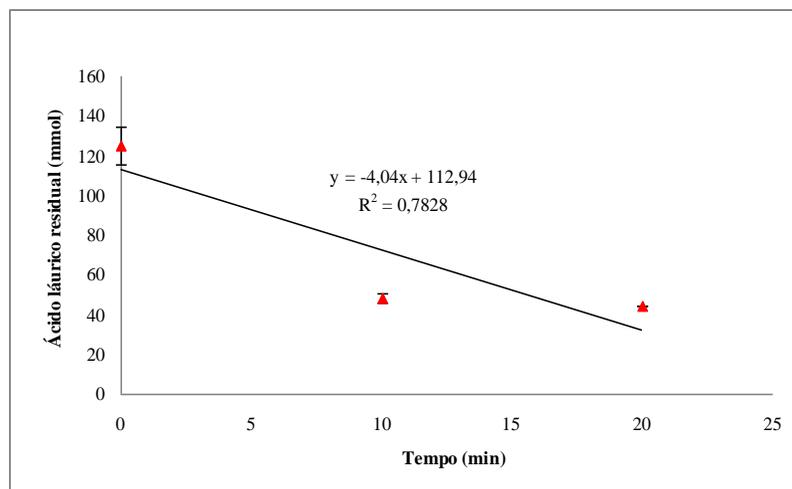


Figura 28 Determinação da atividade enzimática através do coeficiente angular da curva de quantidade de ácido láurico residual em função do tempo na reação de esterificação com *n*-propanol a 60 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM condicionada (5%, m/m), de acordo com o item 4.2.3.

Em consequência das alterações catalíticas que o teor de água pode causar numa reação catalisada por lipase em meios com fases imiscíveis, analisou-se a atividade de água da enzima. O prévio condicionamento térmico do biocatalisador recebido em 2008 provocou uma redução em torno de 64% de água livre no suporte da enzima. Para a lipase do lote recebido em 2010, essa redução foi de 55%. Sabe-se que a estereosseletividade da lipase de *Rhizomucor miehei* está fortemente ligada com a atividade de água inicial do meio reacional: quanto menor a_w , maior a seletividade, sendo que esta enzima é bastante ativa e estável em sistemas com baixa a_w . Entretanto, é necessário um teor mínimo de água que promova a ativação interfacial do sítio ativo da lipase. Estudos com lipases homólogas, *R. niveus* e *R. humicola*, sugerem que mudanças nos resíduos dos suportes na região “tampa e dobradiça” da estrutura podem desempenhar um papel importante na tolerância à baixa atividade de água dessas enzimas (DELLAMORA-ORTIZ et al., 1997).

Diante do exposto, decidiu-se que o aumento da atividade enzimática específica da lipase após o condicionamento térmico não foi significativo, supondo-se que esta variação pode ter sido devida aos erros experimentais estimados pelas diferenças significativas entre os valores do quadrado da média do erro para o fator condicionamento e interação (Tabela 6). Então, optou-se por dar seqüência aos experimentos com a lipase do lote recebido em 2010, sem condicioná-la, visto que esta apresentou seguramente a maior atividade enzimática específica entre as condições testadas.

Além disso, percebeu-se, por meio dos estudos anteriores com a mesma lipase relatados na Tabela 1, e das cinéticas da atividade enzimática a diferentes temperaturas, avaliadas no item 5.2, que se trata de uma enzima sensível à temperatura acima de 40 °C. Logo, submetê-la a um condicionamento térmico prévio a uma temperatura próxima à ideal (40 – 50°C), isto é, a temperatura da reação que garante estabilidade se sua atividade em níveis relativamente altos, pode comprometer o seu desempenho catalítico imediato ao adicioná-la na reação.

5.4 Ação da enzima sobre surfactantes de grau alimentício

Para o presente estudo, é desejável que, na reação de glicerólise enzimática, o surfactante de grau alimentício tenha a função de promover a dispersão do glicerol no óleo, uma vez que estes surfactantes possuem moléculas anfífilas, favorecendo a ação catalítica da lipase, a qual comumente atua nas interfaces. Desta forma, o meio reacional

glicerol/óleo/enzima torna-se mais atrativo para a produção de mono- e diacilgliceróis (ROSEN, 2004).

Todavia, cada surfactante apresenta características próprias; conseqüentemente, o sistema micelar formado pode apresentar diferentes formas de atuação, as quais podem variar devido, por exemplo, à concentração e à composição do surfactante (VALÉRIO, 2009). A partir das estruturas aproximadas da lecitina de soja (Figura 8d) e dos Tween 65, 80 e 85 (Figura 8a, b e c, respectivamente), e de suas capacidades de formar micelas reversas, decidiu-se verificar qualitativamente (em CCD) se estes surfactantes sofrem alguma modificação pela lipase em estudo. Como estes surfactantes apresentam ligações éster, avaliou se estes aditivos podem se comportar como substratos da enzima na glicerólise. Para tal, aplicou-se a metodologia descrita no item 4.2.2.1.

Na busca por um método mais acessível para o trabalho e de melhor revelação das manchas na placa de CCD empregada, avaliaram-se dois métodos de revelação de manchas ('A' e 'B'), descritos no item 4.2.5.

O método 'B' apresentou-se inadequado para a revelação, pois o ácido fosfórico provocou corrosão do alumínio constituinte da placa CCD. Logo, o método de revelação mais viável para o presente trabalho foi o método 'A', o qual permitiu a visualização das manchas sem deteriorar a placa.

Nas Figuras 29 e 30, estão apresentadas as placas de CCD com as amostras relacionadas ao estudo específico da lecitina de soja e dos Tween, respectivamente.

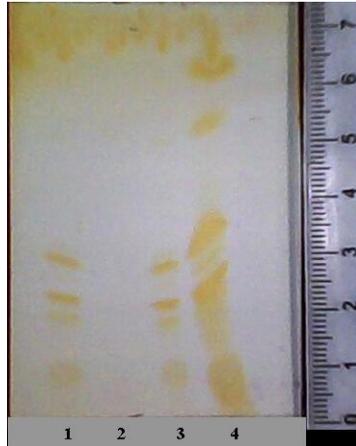


Figura 29 Placas de CCD das amostras da glicérolise da lecitina de soja (10%, m/m), a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m), no tempo 0 h (1) e após 24 h de incubação na presença (2) e na ausência da enzima (branco) (3); e lecitina de soja pura (4). Concentração das amostras: 40 mg/mL hexano. Eluente de desenvolvimento: clorofórmio/álcool metílico/água destilada 95:20:2,5 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 µL.

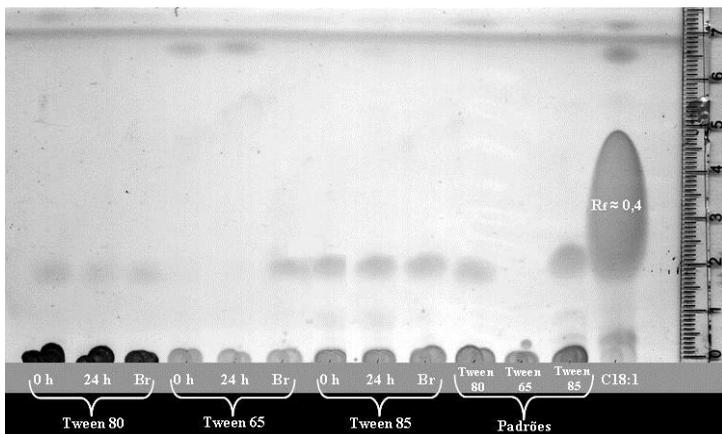


Figura 30 Placa de CCD das amostras das glicérolises dos Tween 80, 65 e 85 (10%, m/m), a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m), nos tempos de 0h e 24h de incubação na presença e na ausência (Br) da enzima. Padrões: Tween 80, 65 e 85, e ácido oléico (C18:1). Concentração das soluções: 80 mg/mL clorofórmio para o estudo com

Tween 80, 20 mg/mL hexano para os demais Tween, e 40 mg/mL hexano para o ácido oléico; eluente de desenvolvimento: hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 μ L. Resolução de imagem melhor definida pelo programa GIMP 2.6.7.

A partir da Figura 29, observa-se que a estrutura da lecitina de soja parece ter sido modificada pela lipase, tendo em vista que a amostra referente ao tempo de reação de 24 h (2) não apresentou as manchas correspondentes à amostra do tempo zero de reação (1) e após 24 h sem a enzima (branco, amostra 3). No sistema de solventes utilizado para a eluição das amostras desta placa, observou-se que o ácido oléico apresenta R_f de aproximadamente 0,93. Os fatores de retenção (R_f s) das manchas das amostras 1 e 3, apresentadas na Figura 29, correspondem aos R_f s das manchas presentes na amostra de lecitina de soja pura (4), conforme mostra a Tabela 7. Subentende-se, portanto, que, após a reação de glicerólise com 10% m/m (em relação ao total de substratos) de lecitina de soja, a lipase agiu na molécula de lecitina de soja, provavelmente hidrolisando os ácidos graxos esterificados em sua cadeia central.

Outros estudos já apontam esta possibilidade, como trabalhos que obtiveram o enriquecimento enzimático de lecitina de gema de ovo com ácido alfa-linoléico e outros ácidos graxos (CHOJNACKA et al., 2009; GULATI et al., 2003).

Hossen e Hernandez (2005) verificaram que a Lipozyme[®] RM IM atuou de forma significativa em fosfolipídeos de lecitina de soja, aos quais foi possível incorporar de forma efetiva o ácido linoléico conjugado, isto é, a lipase modificou a estrutura da lecitina de soja, enriquecendo-a com este ácido graxo.

Para os Tween 65, 80 e 85, presentes em 10% m/m (em relação ao total de substratos) na reação, a Figura 30 indica que as suas estruturas parecem ter sido conservadas após a reação com a lipase, já que a composição de suas amostras manteve-se inalterada após 24 h de reação a 55 °C, bem como para as amostras do branco (24 h de reação sem o biocatalisador) para os Tween 80 e 85. Na Tabela 7, onde estão apresentados todos R_f s das manchas de interesse das placas de CCD (Figuras 29 e 30), observa-se que os R_f s das manchas existentes para tais Tween, no tempo 0 h e após 24 h de incubação, são similares. Os padrões do Tween 80 e 85 apresentaram manchas com R_f s correspondentes, iguais a 0,23 e 0,27, respectivamente. É interessante

observar que a altura destas manchas situa-se no início da mancha do ácido oléico (C18:1), com R_f igual a 0,4, ou seja, supõe-se que os ácidos graxos livres fazem parte da composição destes Tween. Não foram verificadas manchas correspondentes a outras frações lipídicas após as reações, indicando que parece não ter havido ação biocatalítica sobre os substratos da reação.

Tabela 7 Fatores de retenção (R_f) das manchas de interesse das placas de CCD referentes à avaliação da ação da Lipozyme[®] RM IM sobre os surfactantes de grau alimentício lecitina de soja (Figura 29) e Tween 65, 80 e 85 (Figura 30).

Surfactante de grau alimentício	Amostra	Mancha	R_f aproximado
Lecitina de soja	0 h	1 ^a	0,11
		2 ^a	0,26
		3 ^a	0,31
		4 ^a	0,39
	Branco	1 ^a	0,11
		2 ^a	0,26
		3 ^a	0,31
		4 ^a	0,39
	Pura	1 ^a	0,14
		2 ^a	0,27
		3 ^a	0,31
		4 ^a	0,39
5 ^a		0,72	
6 ^a		0,86	
Tween 65	0 h	**	0,87
	24 h	**	0,87
Tween 80	0 h	**	0,26
	24 h	**	0,25
Tween 85	0 h	**	0,25
	24 h	**	0,25

* Os fatores de retenção apresentados seguem a ordem de retenção das manchas nas placas de CCD, de baixo para cima. ** Nestas amostras, visualizou-se somente uma mancha, além da mancha presente na linha base, referente a substâncias polares presentes na amostra.

Diante desta avaliação qualitativa, supõe-se que os Tween 65, 80 e 85 poderão atuar apenas como agentes tensoativos do meio trifásico, glicerol (hidrofílico)/óleo (lipofílico)/enzima (sólido), e não como substratos nas reações de glicerólise enzimática.

Em relação aos dois métodos de obtenção da amostra de 24 h (por centrifugação e o concentrado por evaporação a vácuo), citados no item 4.2.2.1, deve-se comentar que o método por centrifugação não foi adequado. Em vista disso, optou-se por obter a alíquota de 24 h de reação a partir do meio reacional concentrado por evaporação a vácuo. Isto ocorreu devido à não lavagem da enzima com a solução de lavagem *n*-hexano e álcool etílico (1:1, v/v), seguidas vezes, conforme abordado no item 4.2.6.

Dando continuidade ao estudo, focou-se no estudo com o Tween 85, comparando-se as amostras do meio reacional com o padrão de ácido graxo livre, ácido oléico (C18:1), e com o óleo de peixe, o qual possui em maior concentração os triacilgliceróis em sua composição.

Na Figura 31 está apresentada a análise por CCD com os resultados deste estudo, sendo que os resultados exibidos na Figura 30 foram confirmados, ou seja, observa-se que a lipase parece não ter agido sobre este surfactante. Pode-se observar que a composição de acilgliceróis das amostras de 0 h (1) e 24 h (2) é similar entre si, sugerindo a não modificação da estrutura do Tween 85 pela lipase. Além disso, ratificou-se que as amostras do meio reacional e do Tween 85 puro possuem ácidos graxos livres, pois as suas manchas apresentam R_f em torno de 0,31, semelhante ao R_f referente ao ácido oléico (C18:1), no sistema de eluição utilizado para o desenvolvimento das amostras nesta placa.

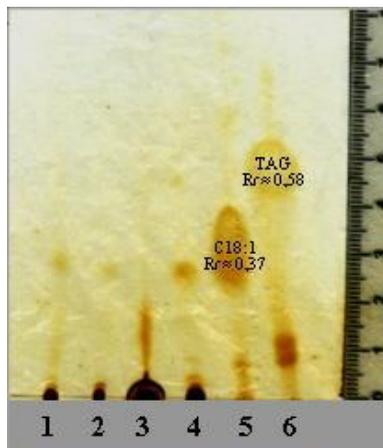


Figura 31 Placas de CCD das amostras da glicerólise do Tween 85 (10%, m/m), a 55 C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m), no tempo 0 h (1) e após 24 h de incubação na presença (2) e na ausência da enzima (branco) (3). Padrões: Tween 85 (4); ácido oléico (C18:1) (5) e óleo de peixe OmegaPure® (6) como padrão de triacilglicerol (TAG). Concentração das amostras: 20 mg/mL hexano. Eluente de desenvolvimento: hexano/éter etílico/ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Volume aplicado de amostra: 10 µL.

A não ação da lipase sobre os Tween 65, 80 e 85 (surfactantes não iônicos) pode ter sido devido ao fato de que estes surfactantes estavam presentes, no meio reacional, em quantidade pequena, 10% m/m (em relação ao total de substratos) e durante 24 h, não provocando uma interação significativa entre a lipase e estes surfactantes. Skagerlind et al. (1998) já haviam verificado que, mesmo abaixo da concentração micelar crítica de surfactante, ocorreram ligações entre surfactantes catiônicos e resíduos negativos da estrutura da enzima *R. miehei*. Isto provocou a formação do complexo enzima e surfactante, semelhante ao complexo enzima e substrato. No entanto, para os surfactantes aniônicos e não iônicos, não existiram tais interações.

Contudo, Skagerlind et al. (1995), em trabalhos anteriores, afirmaram que reações baseadas em microemulsões, catalisadas por lipase de *R. miehei*, podem evitar ainda mais que a lipase interaja com os surfactantes aniônicos e não iônicos com caudas hidrofóbicas volumosas.

Em contrapartida, Bendikienė et al. (2005) observaram que houve

hidrólise de diferentes Tween (20, 40, 60, 80 e 85) pela lipase 3121-1 *Pseudomonas mendocina*. Estes autores perceberam ainda que estes Tween podiam apresentar tanto a função de surfactante como de substrato para esta lipase. O Tween 85, em especial, apresentou maior susceptibilidade à hidrólise, supostamente devido a sua estrutura indicar a presença de três ligações éster de ácido oléico – C18:1 – (Figura 8c), semelhante a uma molécula de trioleato. Todavia, este Tween, em concentrações bem baixas (0,4 – 0,8%), atuou apenas como surfactante. Resultados semelhantes foram obtidos por Feltes (2011a), sendo observado, em placas de CCD, que, apesar do Tween 85 ter sido modificado pela Novozym[®] 435 (*Candida antarctica*), foi possível obter mono- e diacilgliceróis, adicionando-se este surfactante (10%, m/m, em relação ao total de substratos) em reações de glicerólise de óleo de peixe, na presença desta mesma lipase.

5.5 Seleção do surfactante de grau alimentício

5.5.1 Monitoramento da atividade enzimática residual e do índice de peróxido

Tendo em vista que os Tween 65, 80 e 85 parecem não terem sido modificados pela Lipozyme[®] RM IM, decidiu-se selecionar, dentre estes surfactantes, o mais favorável para a obtenção de diacilgliceróis, através da reação de glicerólise de óleo de peixe. Para tal, realizou-se a cinética de cada reação, conforme descrito no item 4.2.6. Os teores de diacilgliceróis foram quantificados por CG, segundo as condições citadas no item 4.2.7.

Em paralelo, determinou-se o índice de peróxido de meio, conforme o Método Cd 8-53 (AOCS, 2003), e a atividade enzimática residual da lipase ao final de cada reação, segundo a metodologia de Oliveira et al. (2006) e adaptada por Krüger et al., (2010). Para a avaliação da atividade enzimática de esterificação, a análise foi realizada a 60 °C por 40 min. Por este motivo, o resultado da atividade enzimática específica residual, obtido pela Equação 4, representa a atividade enzimática específica residual média nos primeiros 40 min de reação.

Avaliou-se desta forma a atividade residual da lipase pelas seguintes razões: i) reduzir os erros experimentais que ocorrem ao retirar-se amostras em tempos curtos da reação, devido à possibilidade de limitação difusional entre a enzima e substrato, imposta pelo suporte; ii) a curva tem comportamento semelhante; e iii) por ser uma metodologia já reconhecida na literatura (KRÜGER et al., 2010;

FIAMETTI et al.; 2009. VALÉRIO et al.; 2009a e 2009b).

Na Figura 32, através do valor do índice de peróxido, é possível visualizar o nível de oxidação que apresentou cada meio reacional, como também a atividade enzimática específica residual da lipase utilizada em cada reação. Estes dados também estão mostrados na Tabela B.1 do Apêndice B. Entre os resultados, há uma reação denominada de controle, na qual empregou-se o mesmo procedimento das demais, exceto pela adição de surfactante.

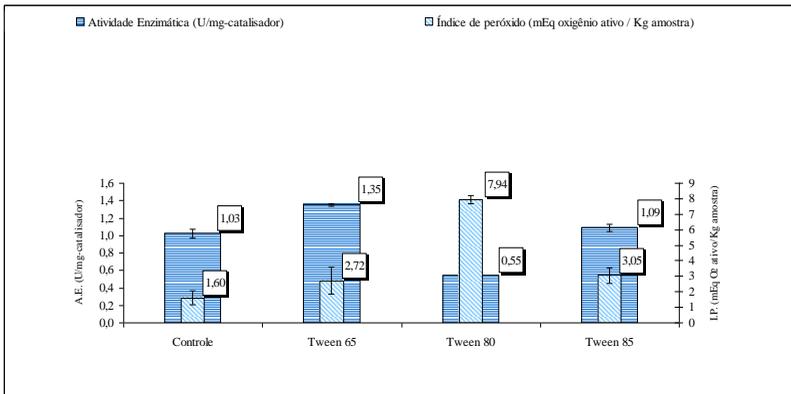


Figura 32 Avaliação do índice de peróxido do meio reacional e da atividade específica da Lipozyme[®] RM IM ao final da reação de glicerólise com o óleo de peixe OmegaPure[®] contendo 10% (m/m) de Tween (65, 80 e 85), catalisada por 10% (m/m) desta lipase, e sem surfactante (Controle) durante 48h.

Os resultados obtidos apresentaram uma relação inversa entre o nível de oxidação e a estabilidade da enzima. O meio reacional que apresentou maior nível de oxidação ($7,94 \pm 0,25$ mEq O₂ ativo/kg amostra) foi o que continha o Tween 80 e esta mesma reação foi a responsável em afetar mais a atividade específica residual da lipase ($0,55 \pm 0,03$ U/mg-catalisador), reduzindo-a para 67,31% em relação à sua atividade específica original ($1,682 \pm 0,002$ U/mg-catalisador, Tabela 5). Enquanto isto, dentre os Tween avaliados, a reação contendo o Tween 65 foi a que obteve menor índice de peróxido ($2,72 \pm 0,85$ mEq O₂ ativo/kg amostra) e maior estabilidade da lipase, visto que sua atividade específica residual diminuiu para 19,75% ($1,35 \pm 0,02$ U/mg-catalisador).

Holm e Cowan (2008) verificaram que os componentes de oxidação determinados por índice de peróxido podem afetar negativamente a estabilidade da enzima. Além disso, observou-se que os altos índices de peróxido estão associados com a redução do tempo médio de vida da enzima. Interligado a isso está o pH do meio, que implicitamente subentende-se que está ácido quando o nível de oxidação já está elevado, devido à formação de ácidos graxos livres, dentre outros compostos. Portanto, alega-se que, geralmente, a melhor forma de assegurar uma boa atividade da enzima em uma reação envolvendo óleo, é mediante a utilização deste óleo, como matéria-prima, com qualidade apropriada, contendo baixos índices de oxidação (< 2 mEq O₂ ativo/kg óleo) e ácidos residuais.

Em relação a influência negativa do Tween 80 sobre a atividade enzimática, Gao et al. (2000) verificaram comportamento similar ao incubar uma lipase (isolada da cepa *Pseudomonas sp.*) diluída com 0,1% (m/v) de Tween 80 em solução tampão de glicina 0,05 M (pH 9,0) a 30 °C por 90 min. Ao final deste tempo, verificou-se que a lipase não possuía mais atividade enzimática, sendo que, no tempo de 0 min, possuía 5% da atividade, em relação à reação controle.

A reação com Tween 85 provocou a segunda maior desestabilidade sobre a lipase, supõe-se que isto foi decorrente dos três ácidos oléicos (C18:1) esterificados nos polioxietilenos de sorbitana (Figura 8c). O ácido oléico é monoinsaturado, o que faz com que a lipase atue preferencialmente sobre elementos contendo tais ácidos graxos, liberando-os. O mesmo foi observado por Feltes et al. (2010) ao adicionar o mesmo tipo de Tween nas reações de glicerólise de óleo de peixe sobre condições iguais, porém, utilizando Novozym[®] 435 de *Candida antarctica*.

Para a reação com o Tween 65, a atividade enzimática específica residual foi a que se destacou superior dentre todas as reações. É provável que os ácidos esteáricos de cadeia saturada esterificados na cadeia de polioxietileno de sorbitana do Tween 65 (Figura 8^a) não os torna um substrato tão atrativo para a lipase. Por conseguinte, menos formação de ácidos graxos livres. Isto pode ser uma provável justificativa a umas das conclusões de Feltes et al. (2010 e 2011b) em relação à este surfactante, isto é, em condições reacionais semelhantes ao presente estudo, o meio contendo o Tween 65 em reação catalisada pela lipase Novozym[®] 435 foi o mais favorável à obtenção de diacilgliceróis.

A reação controle apresentou o menor índice de peroxidação (1,60 mEq O₂ ativo/kg óleo) e causou a queda da atividade enzimática

de 39% (1,03 U/mg-catalisador) em relação a sua atividade original . Sabe-se que os surfactantes têm a função de garantir a estabilidade oxidativa das gotículas de óleo (FOMUSO et al., 2001), e que a carga das gotículas nos alimentos, determinada pelos componentes ativos da superfície, influencia no nível de oxidação lipídica em uma emulsão O/A (MANCUSO et al., 1999; MEI et al., 1998; MEI et al., 1999). Contudo, para tal condição, a ausência de surfactantes na reação evitou a adição de ácidos graxos livres provenientes tanto da própria composição do Tween como através de suas possíveis modificações, devido à sua maior exposição à lipase, tendo em vista que a reação teve duração de 48 h. Logo, isto pode ter permitido uma menor oxidação do meio reacional.

É interessante ressaltar que o sistema reacional utilizado no presente estudo não possuía um mecanismo de isolamento com gás inerte (N_2), o que aumenta o nível de importância sobre o monitoramento do índice de peróxido após a reação. Outros estudos sugeriram ambiente inerte durante a reação para uma menor oxidação dos meios reacionais, em especial quando se utilizam acilgliceróis com cadeias de ácidos graxos insaturados (NUNES et al., 2009; MUÑÍO et al., 2008).

5.5.2 Velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis, produtividade em diacilgliceróis e conversão de triacilgliceróis

O óleo de peixe é uma mistura muito complexa de ácidos graxos. Segundo Feltes et al. (2010), o óleo de peixe em estudo, proveniente do peixe Savelha, é constituído de cinco ácidos graxos majoritários, os quais são: palmítico (18,48%), EPA (13,34%), DHA (13,34%), palmitoléico (11,47%) e oléico (10,15%). Por esta razão, existe uma dificuldade em analisar os componentes mono-, di- e triacilgliceróis, e ácidos graxos livres constitutivos e derivados deste óleo.

Para análises quantitativas destes acilgliceróis, como a cromatografia em fase gasosa, o ideal é que se apliquem os respectivos padrões externos. No entanto, para este trabalho, isto não foi possível, devido à indisponibilidade destes padrões no Brasil. Por outro lado, observou-se que as condições cromatográficas em fase gasosa para quantificar os acilgliceróis derivados de azeite de oliva (fonte rica em ácido oléico), com base na Norma DIN EN nº 14105 (conforme o descrito no item 4.2.7), permitiram identificar, nos cromatogramas, a região de eluição dos di- e triacilgliceróis presentes nos produtos das reações de glicerólise avaliadas. Esta conclusão foi possível ao observar

o cromatograma do próprio óleo, constituído, predominantemente, de triacilgliceróis e, em quantidades pouco relevantes, os diacilgliceróis.

A título de ilustração, a Figura 33 apresenta os cromatogramas, sobrepostos, do óleo de peixe e das amostras no tempo inicial e após 30 min, as quais correspondem à reação de glicerólise de óleo de peixe, sem surfactante de grau alimentício (reação controle).

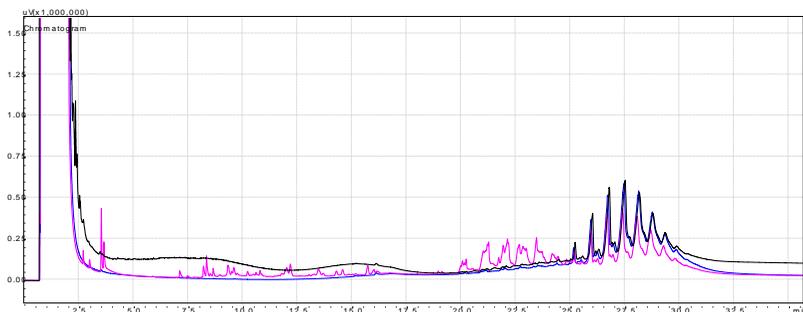


Figura 33 Cromatogramas sobrepostos do óleo de peixe (Savelha) OmegaPure[®] (contorno preto) e das amostras no tempo inicial (contorno azul) e após 30 min (contorno rosa) referentes à reação de glicerólise de óleo de peixe, sem conter surfactante de grau alimentício (reação controle), a 55 °C e catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

Avaliando-se estes cromatogramas sobrepostos, apresentados na Figura 33, observa-se que os picos apresentados na região de 25 a 30 min correspondem à eluição dos triacilgliceróis, visto que são os picos evidenciados no cromatograma do óleo de peixe (contorno preto). O mesmo é observado para a amostra referente ao tempo zero da reação controle, enquanto que, após 30 min, percebe-se que houve a conversão de triacilgliceróis a outros acilgliceróis (ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis).

De acordo com as condições cromatográficas definidas para esta análise, a ordem de eluição dos componentes presentes nestas amostras é seguida pelo glicerol, os ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis. Por conseguinte, nota-se que os picos presentes em torno de 19 a 25 min, correspondem a eluição dos diacilgliceróis. Na região de 7 a 16 min, aproximadamente, percebe-se que os picos referentes aos ácidos graxos livres e aos monoacilgliceróis apresentam-se aglomerados, o que dificulta a quantificação de cada uma destas frações

lipídicas.

As regiões de eluição observadas para cada acilglicerol, presente nestas amostras, corresponderam às mesmas regiões apresentadas pelos acilgliceróis constitutivos das demais amostras analisadas. Diante disto, concluiu-se que os cromatogramas obtidos por esta análise só permitem quantificar a conversão de triacilgliceróis à fração lipídica de diacilgliceróis.

Em contrapartida, esta limitação analítica não inviabilizou o estudo, considerando-se a importância da ingestão humana de diacilgliceróis. Já é sabido que os diacilgliceróis, além de serem agentes emulsificantes com certificação *GRAS*, podem favorecer a redução dos níveis de triacilgliceróis no sangue, após as refeições, e inibir o acúmulo de triacilgliceróis na gordura do corpo e no fígado. Esta ação benéfica à dieta do ser humano é, especialmente, causada pela forma isomérica *sn*-1,3-diacilglicerol (isômeros α e α'), uma vez que, este isômero é metabolizado por um caminho metabólico diferente do triacilglicerol e 1,2-diacilglicerol, isto é, consome-se totalmente como energia (MENG et al., 2004).

Aliado a isto, existe a possibilidade de que a Lipozyme[®] RM IM, uma lipase 1,3-regiosseletiva (NOVOZYMES, 2000), promova produtos com altos rendimentos de 1,3-diacilgliceróis, conforme Kristensen et al. (2005) e Watanabe et al. (2003) obtiveram.

Percebeu-se, então, a importância de se obter a dinâmica do teor de di- e triacilgliceróis durante as reações de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo ou não surfactante de grau alimentício, utilizando-se das condições analíticas disponíveis, apresentadas no item 4.2.7. Desta forma, verificou-se de que forma a presença dos Tween 65, 80 e 85, nestas condições reacionais de glicerólise, influencia na produção de diacilgliceróis.

A partir das Figuras 34, 35, 36 e 37 é possível observar o comportamento cinético das porcentagens de di- e triacilgliceróis, em relação à massa total da amostra, correspondentes à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem a presença de surfactantes de grau alimentício (reação controle) e com a presença dos Tween 65, 80 e 85, respectivamente, conforme abordado no item 4.2.6.

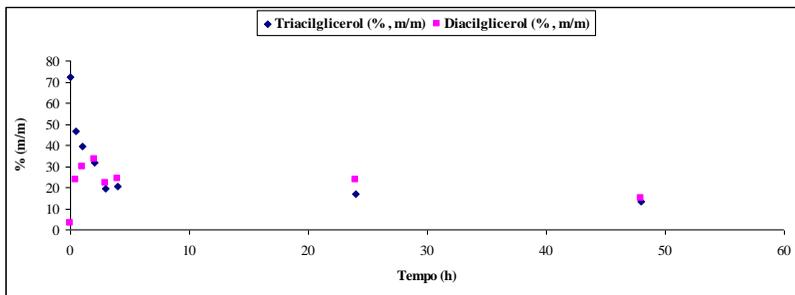


Figura 34 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem a presença de surfactante de grau alimentício (reação controle) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

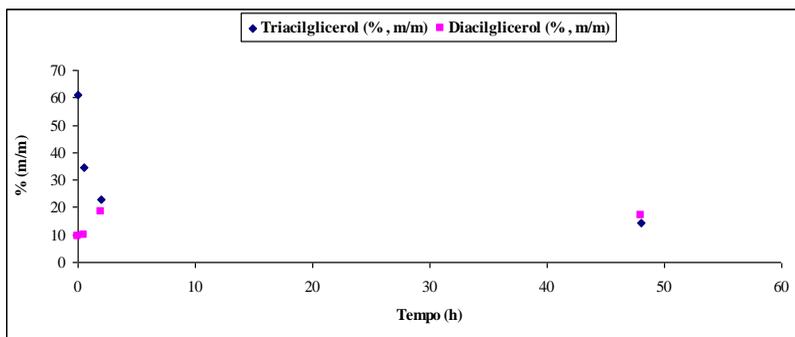


Figura 35 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 65 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

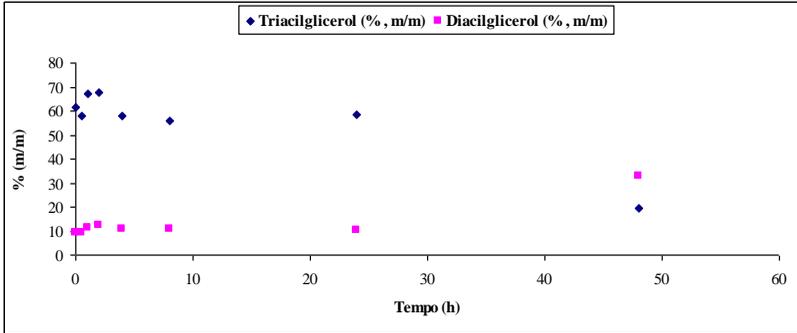


Figura 36 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 80 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

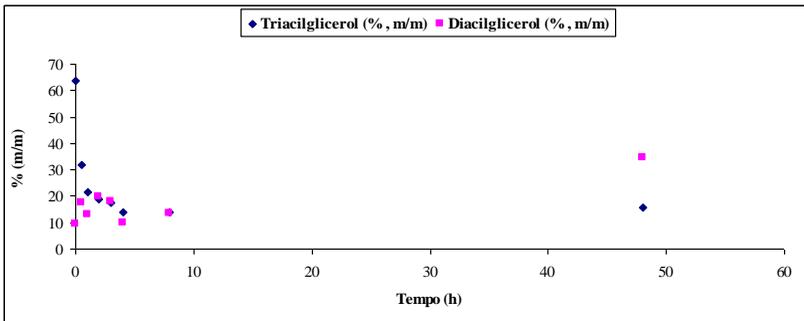


Figura 37 Cinética da fração mássica de di- e triacilgliceróis na reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

A partir das cinéticas da reação controle (Figura 33) e das reações em meio contendo os Tween 65 e 85 (Figuras 35 e 37, respectivamente), pode-se observar que os triacilgliceróis são rapidamente consumidos e, concomitantemente, os diacilgliceróis são formados. Nas reações controle e em meio contendo os Tween 65 e 85, o equilíbrio em relação à concentração de triacilgliceróis destas reações foi atingido em 3, 2 e 4 h, respectivamente. Entretanto, ao final da reação (48 h), para as reações controle e contendo o Tween 65, ocorreram reduções de ambos acilgliceróis. Enquanto que, para a reação que utilizou o Tween 85,

indica-se que, no ponto final, houve uma maior formação de diacilgliceróis.

Além disso, para as primeiras horas de reação, percebe-se que quase todas as reações, exceto a reação contendo o Tween 80, obtiveram a maior conversão para diacilgliceróis em 2 h de reação. Considerando-se este período, dentre estas três reações, a reação controle foi a reação que promoveu maior formação de diacilgliceróis. Em relação às reações em meio contendo os Tween 65 e 85, a reação controle apresentou 44,46 e 40,75% (m/m) maiores formações de diacilgliceróis, respectivamente.

A cinética da reação em meio contendo o Tween 80, apresentada na Figura 36, indica um comportamento distinto das demais reações. Pode-se supor que, até 24 h de reação, praticamente não houve conversão significativa de triacilgliceróis para diacilgliceróis. Iniciou-se, a partir de 1 h de reação, um equilíbrio entre estas frações lipídicas. Porém, em 48 h de reação, ocorre uma considerável conversão de triacilgliceróis (68,13%, mol/mol) e formação de diacilgliceróis (32,76%, m/m), respectivamente.

A Figura 38 indica que, apesar da ausência de alguns resultados referentes aos tempos estabelecidos para este estudo cinético, conforme descrito no item 4.2.6, é possível comparar o desenvolvimento das frações molares de diacilgliceróis entre as quatro reações estudadas.

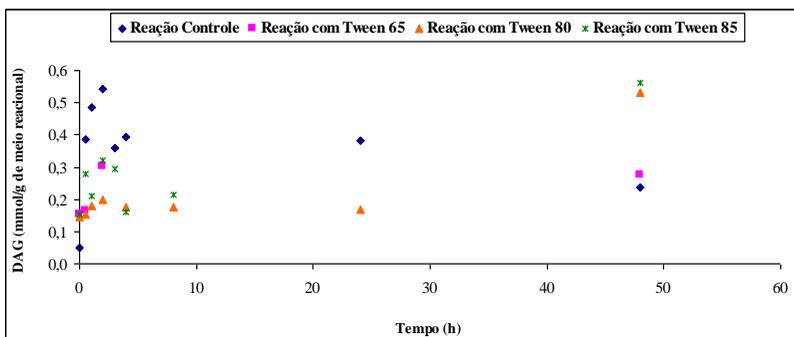


Figura 38 Cinética das frações molares de diacilgliceróis correspondentes à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem surfactante de grau alimentício (reação controle) e contendo os Tween 65, 80 e 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

Através da Figura 38, pode-se verificar que, nas primeiras horas de reação, para todas as reações o aumento da formação de diacilgliceróis é rápido e acentuado até 2 horas de reação e, em seguida, somente para as reações controle e com o Tween 65, esta formação tende a cair até o final da reação. Para as demais reações, em 48 h, há um aumento significativo.

Contudo, percebe-se que, em até 2 h, a reação controle destaca-se pela maior formação de diacilgliceróis (0,54 mmoles/g de meio reacional) e, em ordem decrescente, as reações contendo os Tween 85 (0,32 mmoles/g de meio reacional), 65 (0,30 mmoles/g de meio reacional) e 80 (0,20 mmoles/g de meio reacional).

O comportamento observado para as reações envolvendo os Tween 80 e 85, isto é, o indicativo de concentrações de diacilgliceróis mais elevadas ao final da reação, pode ser explicado pela tendência de a enzima agir sobre estes surfactantes, uma vez que são constituídos de ácido oléico, conforme se observa nas Figuras 8b e c. Estudos relataram que a lipase de *R. miehei* pode apresentar uma alta especificidade frente a ácidos graxos insaturados, em vez de saturados (SELLAPAN e AKOH, 2000; CARRÍN e CRAPISTEL, 2008). A Lipozyme IM60 (*sn*-1,3 lipase de *R. miehei*) mostrou uma maior reatividade e/ou seletividade para o ácido oléico do que para o ácido láurico, em acidólise de triestarina com ácido láurico e ácido oléico para a produção de lipídeos estruturados, em meio contendo *n*-hexano (SELLAPAN e AKOH, 2000). Em vista disso, supõe-se que a exposição maior da enzima a estes surfactantes de grau alimentício tenha permitido as suas modificações, o que impede ou retarda a formação do produto de interesse.

Aliado a isto, a cinética da reação com o Tween 80 (Figura 36) indica que a concentração de diacilgliceróis é elevada apenas ao atingir 48 h de reação, possivelmente, devido ao alto valor do balanço hidrofílico e lipofílico (BHL) deste Tween, igual a 15, dado obtido pela equação de Griffin (1949) apud OHBA (1962). Para a emulsão apresentada pelas reações estudadas, água/óleo, este valor de BHL não é adequado. Por conseguinte, neste meio reacional, observou-se que a lipase ficou parcialmente aglomerada nas extremidades do reator, impedindo-a de atuar uniformemente nos substratos da reação e não garantindo a estabilidade oxidativa das gotículas de óleo de peixe na reação. Supõe-se, também, que este surfactante pode ter acrescido ácidos graxos livres (oléico) ao meio reacional, o que pode ter favorecido ainda mais a oxidação ao final da reação.

O trabalho realizado por Dellamora-Ortiz et al. (1997) relata que

o Tween 80 atuou como agente emulsificante, favorecendo, assim, uma atividade duas vezes maior da Lipozyme[®] RM IM. Todavia, a concentração adicionada deste surfactante foi de 80 mM e em meio contendo *n*-hexano.

Já para a cinética da reação envolvendo o Tween 85 (Figura 37), subentende-se que os diacilgliceróis formados ao final da reação, mesmo com o teor de triacilgliceróis em equilíbrio, seja devido à maior concentração de ácido oléico no meio, proveniente do próprio Tween 85 (polioxietileno trioleato de sorbitana), tendo em vista que a lipase tende a atuar neste ácido graxo monoinsaturado. Em consequência disto, é provável que estes ácidos graxos livres foram esterificados em moléculas de monoacilgliceróis e/ou de glicerol. Neste processo, porém, a auto-oxidação não foi tão elevada quanto na reação com o Tween 80 (Figura 32 e Tabela 8), pois o seu valor de BHL calculado é 11 (GRIFFIN, 1949 apud OHBA, 1962), ou seja, um valor intermediário ao que é exigido para a emulsão água/óleo da reação estudada.

A Tabela 8, apresentada a seguir, permite avaliar melhor qual a condição reacional, dentre estas quatro reações, que atende às características desejáveis por uma produção via enzimática, como produtividade alta e rápida, aliada à obtenção de produtos de qualidade, bem como, à preservação da estabilidade da enzima.

Na Tabela 8 é possível observar que, para as reações controle e em meio com os Tween 80 e 85, os teores de triacilgliceróis alcançaram o equilíbrio após 1 e 2 h do instante em que se iniciou a queda do teor de diacilgliceróis. Isto é um indicativo de que, à medida que os triacilgliceróis são convertidos a diacilgliceróis, e estes são transformados a monoacilgliceróis.

Tabela 8 Variáveis de interesse, em função da reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem a presença de surfactante de grau alimentício (reação controle) e com a presença (Tween 65, 80 e 85), em 10% (m/m), a 55 °C e catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

Reação	Variável							
	t _{eq.} TAG ^a (h)	TAG ^b (%)	t _{DAG} ^c (h)	DAG ^d (mmol/ g meio reacio- nal)	v _i ^e (mmol _{DAG} /(g meio reacional. h))	P ^e (mmol _{DAG} /(g meio reacional. h))	I.P. ^f (mEq O ₂ ativo/kg a mostra)	Redução da A.E. resi dual ^g (%)
Controle	3	73,09	2	0,54	0,44	0,25	1,60 ± 0,46	38,77
Tween 65	2	62,50	2	0,30	0,08	0,07	2,72 ± 0,85	19,75
Tween 80	4	5,85	2	0,20	0,03	0,05	7,94 ± 0,25	67,31
Tween 85	4	78,36	2	0,32	0,07	0,08	3,05 ± 0,51	35,21

^a O tempo de equilíbrio para o teor de triacilgliceróis. ^b A conversão molar de triacilgliceróis no instante em que o teor de triacilgliceróis alcança o equilíbrio. ^c O tempo inicial da reação que apresenta maior teor de diacilgliceróis. ^d Teor de diacilgliceróis máximo no instante inicial da reação. ^e Velocidade inicial específica da reação (v_i), expressa em teor molar de diacilgliceróis, a partir do coeficiente angular do comportamento linear do início da cinética, de acordo com as Figuras B1, 2, 3 e 4, apresentadas no Apêndice B, e a produtividade (P) em diacilgliceróis, no instante t_{DAG}, conforme descrito no item 4.2.8. ^f Valores de índice de peróxido (I.P.) do meio ao final da reação, vistos no item 5.5.1. ^g Atividade específica inicial da lipase: 1,682 ± 0,002 U/mg-catalisador, Tabela 5.

Nos cromatogramas apresentados nas Figuras 39a, b e c, correspondentes à reação controle e às reações contendo os Tween 80 e 85, respectivamente, percebe-se que, durante intervalos específicos de tempo, as concentrações de di- e triacilgliceróis foram reduzidas, bem como de monoacilgliceróis, supondo-se que os picos existentes entre 10 e 16 min referem-se à concentração de monoacilgliceróis. Além disso, nota-se que houve um aumento visível na concentração de glicerol, componente eluído entre 2,5 e 5 min, principalmente nas reações controle e com o Tween 80. Segundo Krüger (2010), caso tenha ocorrido uma presença suficiente de água no meio, reações paralelas de hidrólise ocorreram nestes acilgliceróis, resultando em ácidos graxos livres e em até glicerol.

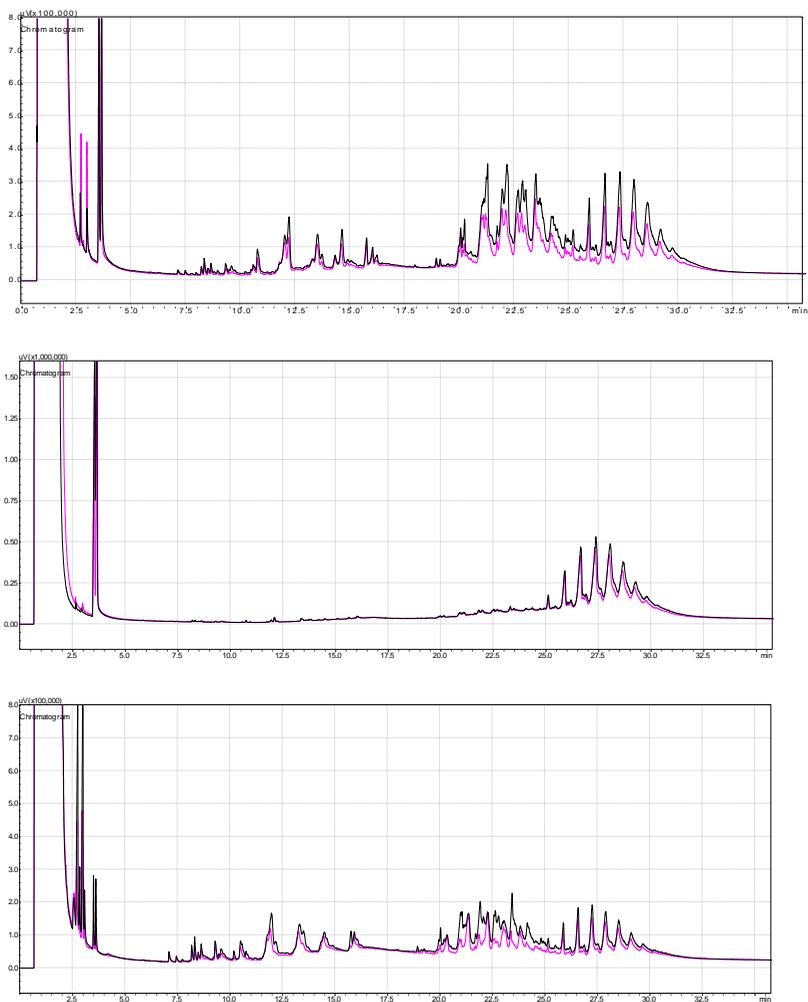


Figura 39 Cromatogramas correspondentes às amostras nos tempos: 2 e 3 h da reação sem surfactante – controle – (a); 1 e 4 h da reação em meio contendo Tween 80 (b); e 2 e 4 h da reação em meio contendo o Tween 85 (c). Condições reacionais: glicerólise de óleo de peixe a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m) e, quando adicionado, 10% (m/m) de surfactante de grau alimentício. Contorno preto refere-se às amostras no tempo anterior (1 e 2 h) e o contorno rosa ao tempo seguinte (3 e 4 h).

Através da Tabela 8, observa-se, também, que a reação sem o

surfactante de grau alimentício (controle) foi a reação que apresentou maior produtividade em diacilgliceróis (0,25 mmoles/(g meio reacional/h)), associada à maior velocidade inicial de formação de diacilgliceróis (0,44 mmoles/(g meio reacional.h)), e em apenas 2 h de reação. Em paralelo a isto, o índice de peróxido apresentado, ao final da reação, foi o menor. No entanto, a atividade da enzima foi a segunda mais prejudicada, reduzindo-a para 38,77%.

Para as demais reações, verifica-se que se repete a relação inversa entre o índice de peróxido e as características desejáveis para um processo enzimático. Embora a reação contendo o Tween 65 tenha obtido os resultados de teor de diacilgliceróis no instante de 2 h, velocidade inicial específica da reação e produtividade em diacilgliceróis próximos aos resultados obtidos pela reação envolvendo o Tween 85, a atividade específica residual da enzima (Figura 32) sugere ser esta condição reacional a mais viável ao processo industrial, dentre os casos estudados. Além disso, indicou o segundo menor índice de peróxido, provavelmente, por possuir três ácidos graxos saturados (ácido esteárico, C18:0) esterificados em sua cadeia de polioxietileno, não tão susceptíveis à ação desta lipase.

Por fim, a respeito da reação com o Tween 80, além do maior índice de peróxido e da redução mais acentuada da atividade residual da enzima, as demais variáveis avaliadas (Tabela 8) foram as menos interessantes à formação de diacilgliceróis.

Para a reação controle, em 2 h, obteve-se 33,36% (m/m) de diacilgliceróis para 56,23% de conversão molar de triacilgliceróis. De acordo com Eom et al. (2010), onde se aplicou a mesma lipase e em igual concentração, a glicerólise de óleo de Atum, com agitação magnética, proporção molar GLI:TAG igual a 3:1, a 35 °C e em 24 h de reação, promoveu cerca de 70% (m/m) de conversão em diacilgliceróis, compreendendo dentre os *sn*-1,3-diacilgliceróis obtidos, 17,32% ácidos graxos ômega-3, 3,08% de EPA e 12,54% de DHA.

Feltes et al. (2011a) realizaram estudos com as mesmas condições experimentais, mas, variando o tipo de agitação e utilizando a Novozym® 435, lipase não regioespecífica. Ao utilizar na reação agitação orbital (*shaker*) e sem adição de solvente e surfactante obteve-se, em 10 h de reação, 66% de conversão molar de triacilgliceróis e 0,713mmol/g de meio reacional de diacilgliceróis. Quando a reação foi conduzida a 70 °C e por agitação mecânica de 600rpm, com 5% de lipase (em massa, em relação ao total de substratos) e com a proporção molar de glicerol e óleo de 1:1, após 24 h, foi obtido 0,621mmol de diacilgliceróis por gramas de meio reacional (46%, mol/mol) e 59%

(mol/mol) dos triacilgliceróis foram convertidos a outras espécies lipídicas.

Já se aplicando as mesmas condições reacionais do presente estudo, Feltes et al. (2010) obtiveram $34,90 \pm 3,33\%$ (m/m) de diacilgliceróis, em 24 h, e, para a reação em meio contendo 10% de Tween 65 (em massa, em relação ao total de substratos), em 2 h, o rendimento foi de $19,41 \pm 0,68\%$ (m/m).

Diante do exposto, sugere-se que a Lipozyme[®] RM IM realmente favorece rapidamente um rendimento considerável de diacilgliceróis, e supõe-se que a forma isomérica *sn*-1,3 seja a predominante, mesmo em meio sem os Tween 65, 80 e 85, conforme EOM et al. (2010) observaram. Além disso, Eom et al. (2010) corroboram a ideia de que as reações de glicerólise de óleo de peixe, avaliadas neste trabalho, resultaram em *sn*-1,3-diacilgliceróis com EPA e DHA. Entretanto, deve-se confirmar esta suposição analisando-se adequadamente os produtos das reações avaliadas.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho indicou que a glicerólise enzimática do óleo de peixe (Savelha) comercial OmegaPure[®] a 55 °C, utilizando meio sem e com (10%, m/m, em relação ao total de substratos) surfactante de grau alimentício (Tween 65, 80 ou 85) e catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m, em relação ao total de substratos), pode favorecer a formação de diacilgliceróis, constituídos, provavelmente, de EPA e DHA.

Primeiramente, através dos índices de acidez e de peróxido, certificou-se que o óleo de peixe a ser estudado estava dentro dos limites estabelecidos, pelos órgãos regulamentadores, para o consumo humano, e, por conseguinte, com boa parte dos ácidos ômega-3 preservados. Durante o andamento deste estudo, pôde-se estabelecer a determinação de atividade enzimática para o monitoramento da atividade residual da enzima após ser utilizada em reações de glicerólise, nas condições já mencionadas. Além disso, observou-se, qualitativamente, que, em uma reação de glicerólise, a enzima, em 10% m/m (em relação ao total de substratos), parece não ter atuado sobre os surfactantes de grau alimentício Tween 65, 80 e 85. Verificou-se, entretanto, que a lipase modificou a lecitina de soja, após 24 h de reação.

O estudo cinético sobre a atuação da enzima em reação de esterificação de *n*-propanol com ácido láurico permitiu definir que, entre as condições testadas, a temperatura de 50°C foi a mais favorável à atividade e à estabilidade da enzima. Além disso, verificou-se que, para a determinação da atividade enzimática, recomenda-se a utilização de uma concentração de enzima inferior a 5% m/m (em relação ao total de substratos), quantidade esta aplicada na técnica original. Verificou-se que o condicionamento térmico prévio da enzima, a 40°C durante 1 h, não resultou em incremento na sua atividade.

A avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de peixe, utilizando meio com os Tween 65, 80 e 85 (10%, m/m, em relação ao total de substratos) durante 48 h, indicou que a Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m, em relação ao total de substratos) não favoreceu mais a produção de diacilgliceróis, nas condições pré-definidas com base na literatura (55°C, proporção molar de glicerol e óleo de 2:1 e agitação mecânica de 600 rpm). Isto foi observado, especialmente, nas reações envolvendo polioxiétilenos de sorbitana de ácidos graxos insaturados

(Tween 80 e 85), os quais, a depender de suas concentrações e da concentração da enzima no meio, além do tempo reacional, podem ser suscetíveis a modificações pela enzima. Adicionalmente, o Tween 80 apresenta um valor relativamente alto de BHL, sendo, portanto, inadequado para garantir a estabilidade oxidativa da emulsão água/óleo do meio reacional. Para o estudo envolvendo este aditivo, observou-se, conseqüentemente, um aumento na auto-oxidação do meio, afetando acentuadamente a atividade residual da enzima.

Por outro lado, a reação controle, em que não havia sido adicionado surfactante de grau alimentício, foi a que apresentou maior produtividade em diacilgliceróis (0,25 mmoles/(g meio reacional/h)), associada à maior velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis (44,0 mmoles/(g meio reacional.h)), em apenas 3 horas de incubação. Além disto, esta reação proporcionou menor oxidação do meio reacional. Entretanto, afetou mais a atividade residual da enzima do que a reação em que adicionou-se o Tween 65, sendo necessário o estudo do reuso da lipase devido ao custo elevado deste biocatalizador (600 €/kg).

Finalmente, conclui-se que a Lipozyme[®] RM IM, lipase *sn*-1,3 específica, em reações de glicerólise, favorece a formação de diacilgliceróis em poucas horas de reação, mesmo em meio livre de solvente e de surfactante.

6.1 Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é importante que se busque, em trabalhos futuros:

- Adequar uma determinação da atividade enzimática que utilize quantidades menores de enzima, evitando, assim, o rápido equilíbrio da reação, o qual foi em torno de 10 e 20 min no presente trabalho. Ressalta-se que o equilíbrio desta reação, quando atingido em tempos curtos, apresenta uma probabilidade maior de erros experimentais;
- Aplicar técnica analítica adequada para quantificar todas as frações lipídicas de interesse (ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis), utilizando-se padrões apropriados;
- Realizar o estudo cinético das reações de glicerólise, utilizando diversas concentrações dos Tween 65 e 85, quantificando todas as substâncias formadas durante a reação, mediante o emprego de

- técnicas analíticas adequadas, para confirmar se há modificação enzimática destes Tween;
- Otimizar a produção de diacilgliceróis através de planejamento experimental, avaliando os fatores da reação (temperatura do processo, proporção molar glicerol:óleo, concentração de enzima, concentração do surfactante), em meio com e sem surfactante de grau alimentício;
 - Quantificar o teor de EPA e DHA dos produtos de interesse formados (mono- e diacilgliceróis) a partir das reações de glicerólise avaliadas neste trabalho;
 - Avaliar o reuso da enzima nas reações de glicerólise, envolvendo especialmente o Tween 65, tendo em vista que a sua aplicação indicou menor prejuízo à atividade da lipase.

6.2 Agradecimentos

À CAPES pela bolsa concedida. À Novozymes Brasil pelas doações. À Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI (Erechim, RS), pelo auxílio na realização das análises para a finalização deste trabalho. Ao Prof. Willibaldo Schmidell Neto (EQA-UFSC), ao Químico Robson L. Schacer e ao Prof. Pedro A. Barbeta (INE-UFSC) pelos esclarecimentos teóricos. À Prof^ª. Maria da Graça Nascimento (Química-UFSC) e Prof^ª. Débora de Oliveira (Engenharia de Alimentos - URI) pelo auxílio técnico.

6.3 Publicações

I CICPG - Sul Brasil -I Congresso de Iniciação Científica e Pós-Graduação do Sul do Brasil – UDESC 2010: **Estudo de ativação das lipases lipozyme rm-im e tl-im e seus possíveis efeitos no surfactante Tween 85.** *Joanna Silva Santos**; *Soeli Francisca Mazzini Monte Blanco*; *Maria Manuela Camino Feltes*; *Felipe Di Bernardi S. Thiago*; *Agenor Furigo Júnior e Jorge L. Ninow.*

Cuarto Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones (IV EnReBB) 2010: **Estudo dos efeitos da lipase Lipozym[®] RM-IM nos surfactantes de grau alimentício em reação de glicerólise.** *Joanna Silva Santos*, *Soeli Francisca Monte Blanco*, *Maria Manuela Camino Feltes*, *Gisanara Dors*, *Agenor Furigo Júnior e Jorge Luiz Ninow.*

7 REFERÊNCIAS

AKOHL, C. C.; MIN, D. B. **Food Chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3ed. CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008.

ANP. **Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005**: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. 2005.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. Champaign: AOCS Press, 2003.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: Teoria e prática**. 3 ed. Ed. UFV, 2006.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ALMEIDA FELIPE, M. G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n.26, dez. 2006/jan. 2007.

Bailey's Fats and Oils. 4.ed, v.1, p. 252-253. New York: John Wiley & Sons, 1979.

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.

BERGER, M.; SCHNELDER, M. P. Enzymatic esterification of glycerol II. Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac-monoacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 961-965, 1992.

BESSLER, K. E.; NEDER, A. V. F. **Química em tubos de ensaios - uma abordagem para iniciantes**. Ed. Blucher, 218 p., 2004.

BOCKISCH, M. **Fats and oils handbook**. Champaign: AOCS Press, p. 77-78, 745 e 795, 1993.

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

BORNSCHEUER, U. T.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; YAMANE, T.; KOLISIS, F. N. A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides. **Biotechnology Letters**, v.16, n.7, p.697-702, 1994.

BOYLE, E. Monoglycerides in food systems: current e future uses. **Food Technology**, n. 51, n. 8, p. 52-59, 1997.

BRADEN, L. M.; CARROLL, K. K. Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats. **Lipids**, v. 21, p. 285–288, 1986.

BRASIL, LEIS, DECRETOS, ETC. Consulta Pública nº 85, de 13 de dezembro de 2004. Resolução n. 386 de 5 de agosto de 1999. Regulamento técnico para óleos e gorduras vegetais. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8994-1-0%5D.PDF>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Portaria n. 19 de 15 de março de 1995 revogada pela Resolução n. 253, de 19 de setembro de 2005. Norma técnica para complemento nutricional. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_95.htm>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

BRISSON, D; VOHL, M. C; ST-PIERRE, J; HUDSON, T. J; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process. In: **BioEssays**, v.23, p. 534-542, 2001.

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.

CARRÍN, M. E.; CRAPISTE, G. H. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 243-249, 2008.

CHANG, P. S.; RHEE, J. S.; KIM, J. Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized in liposome in reversed micelles. **Journal Biotechnology and Bioengineering.**, v. 38, p. 1159-1165, 1991.

CHATTIPAKORN, N.; SETTAKORN, J.; PETSOPHONSAKUL, P.; SUWANNAHOI, P.; MAHAKRANUKRAUH, P.; SRICHAIRATANAKOOL, S.; CHATTIPAKORN, S. C. Cardiac mortality is associated with low levels of omega-3 and omega-6 fatty acids in the heart of cadavers with a history of coronary heart disease. **Nutrition Research**, v. 29, p. 696-704, 2009.

CHEMICAL BOOK. Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB0751742.htm>. Acessado em: 27 de fevereiro de 2011.

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

CHEVALLET, M.; SABTONI, V.; POINAS, A.; ROUQUIÉ, D.; FUCHS, A.; KIEFFER, S.; ROSSIGNOL, M.; LUNARDI, J.; GARIN J.; RABILLOUD, T. New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 19, p. 1901-1909, 1998.

CHOJNACKA, A.; GŁADKOWSKI, W.; KIELBOWICZ, G.; WAWRZENCZYK, C. Enzymatic enrichment of egg-yolk phosphatidylcholine with α -linolenic acid. **Biotechnol Letters**, v. 31, p. 705-709, 2009.

CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. Scotland: Pergamon Press, 1982.

CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2411-2502, 2007.

COSTA NETO, P. R. Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química), UFSC, Florianópolis, 2002.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Atualidade em química - Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n.7, mai. 1998.

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.

DEMIRBAS, A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. **Energy Conversion and Management**, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U.; DODSON G. G.. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, p. 18–839, 1992.

DICKINSON, E. **Introduction to food colloids**. Oxford University Press, Oxford, 1992.

DICKINSON, E.; STAINSBY, G. Colloids in food. **Applied Science**, London, 1982.

DIMIAN, A. C.; OMOTA, F.; BLIEK, A. Entrainer-enhanced reactive distillation. International Conference on Distillation e Absortion – 634th E. F. C. E. Kongresshaus, Baden-Baden, Germany, 2002.

DRAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in *tert*-pentanol: Process Optimization by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 27-33, 2006.

EOM, T. K.; KONG, C. S.; BYUN, H. G.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Lipase catalytic synthesis of triacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 738-743, 2010.

FADNAVIS, N. W.; KOTESHWAR, K. Remote control of stereoselectivity: lipase catalyzed enantioselective esterification of racemic α -lipoic acid. **Tetrahedron: Asymmetry.**, v.8, p. 337-339, 1997.

FAO-WHO, C. A. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards, CODEX-STAN 19. 1981, revisão 1999. Disponível em: < http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp >. Acesso em: 16 de maio de 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. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), UFSC. 2011a.

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 (Aceito). **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 2011b.

FERREIRA DIAS, S.; FONSECA, M. M. R. Aerobiological pathogen detection by evanescent wave fibre optic sensor. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 7, p. 447-452, 1993.

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.**, v. 48, p. 708-712, 2009.

FOMUSO, L. B.; CORREDIG, M.; AKOH, C. C. A comparative study of mayonnaise and Italian dressings prepared with lipase-catalyzed transesterified olive oil and caprylic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 7, p. 771-774, 2001.

Food and Drug Administration - FDA. 62 FR 30756, 05 de junho de 1997, alterado em 70 FR 14531, 23 março, 2005. Code of Federal Regulations: 21 CFR 184 - Direct Food Substances affirmed as Generally Recognized as Safe. § 184.1472 Menhaden oil. Disponível em: <<http://law.justia.com/us/cfr/title21/21-3.0.1.1.14.2.1.128.html>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

FREGOLENTE, L. V.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL, R.; WOLF-MACIEL, M. R. Response surface methodology applied to optimization of distilled monoglycerides production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 673-678, 2005.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; PINTO, G. M. F.; BATISTELLA, B. C.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 165-172, 2008.

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. Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações. **Revisão. Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1514-1521, 2008.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 2: Importantes aspectos da alternativa biotecnológica. **CIÊNCIA E CULTURA - Revista Científica Multidisciplinar da Fundação Educacional de Barretos**, v. 1, n. 1, nov. 2006.

FUREBY, A. M.; TIAN, L.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, E. B. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 198-206, 1997.

GASKIN, D. J. H.; ROMOJARO, A., TURNER, N. A., JENKINS, J., VULFSON, E. N. Alteration of lipase chain length specificity in the hydrolysis of esters by random mutagenesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, p. 433-441, 2001.

GONÇALVES, V. L. C.; PINTO, B. P.; MUSGUEIRA, L. C.; SILVA, J. C.; MOTA, C. J. A. **Biogásolina: produção de éteres e ésteres da glicerina**. 2006

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; BOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12843-12847, 1993.

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

GUNSTONE, F.D. Review: Enzymes as Biocatalysts in the Modification of Natural Lipids, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1535–1549, 1999.

HALL, L. H.; KIER, L. B.; MURRAY, W. J. Molecular connectivity II: Relationship to water solubility and boiling point. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 1974-1977, 1975.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. Biotechnology applied to fats and oils. In: **Food Biotechnology** (Eds.: King, R. D.; Cheetham, P. S. J.). London, Elsevier Applied Science, p. 173-216, 1988.

HARALDSSON, G. G.; HÖSKULDSSON, P. A. The preparation of triglycerides highly enriched with ω -3 polyunsaturated fatty acids via lipase catalyzed interesterification. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 13, p. 1671-1674, 1989.

HOLM, H. C.; COWAN, D. Review article: The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 679-691, 2008.

HOLMBERG, K.; LASSEN, B.; STARK, M. B. Enzymatic glycerolysis of triglyceride in aqueous and nonaqueous microemulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, p. 1796-1800, 1989.

HOLMBERG, K.; OSTERBERG, E. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, p. 1544-1548, 1988.

HOSSEN, M.; HERNANDEZ, E. Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 730-736, 2005.

HUA YUAN. Site: http://www.jyhychem.com/pages/pro_en.htm. Acessado em 26 de dezembro de 2010.

HUGE-JENSEN, B; GALLUZZO, D. R.; JENSEN, R. G. Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 65, p. 905-910, 1988.

IFOS – International Fish Oil Standards. Oxidised fish oils on market may harm consumer, warns researcher - Better methods for stabilizing fish oils are needed to protect consumers from the toxic products produced when they go off, says a team of New Zealand researchers. 20 de outubro de 2005. Disponível em: <<http://www.ifosprogram.com/files/Oxidised%20fish%20oils%20on%20market%20may%20harm%20consumer.pdf>>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos/coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4 ed., . 1 ed. digital, P. 1020, cap. 16, p. 595, 2008.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF FATTY ACIDS AND LIPIDS (ISSFAL). Recommendations for intake of polyunsaturated fatty acids in healthy adults. 2004. Disponível em: <http://www.issfal.org.uk/index.php?option=com_content&task=view&id=23&Itemid=8>.

IUPAC. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/D01643.html>>. Acessado em: 17 de novembro de 2010.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 68-73, 2000.

JAMES, M. L.; CLELAND, L.G.. Dietary n-3 fatty acids and therapy for rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 27, n. 2, p. 85-97, 1997.

KARRA-CHAABOUNI, M.; PULVIN, S.; TOURAUD, D.; THOMAS, D. Parameters affecting the synthesis of geranyl butyrate by esterase 30,000 from *Mucor miehei*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 9, 1998.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases, in: **Biotechnology-Series** (REHM, H. J.; REED, G; PÜHLER, A; STADLER, P. J. W.; KELLY, D. R. eds.), v. 8A, 38. 1998.

KHASANSHIN, T. S. Thermodynamic properties of normal propyl alcohol at atmospheric pressure. **Journal of Engineering Physics and Thermophysics**, v. 45, n. 3, p. 1044-1049, 1983.

KHMELNITSKY, Y. L.; WELSH, S. H.; CLARK, D. S.; DORDICK, J. S. Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 2647-2648, 1994.

KIRK, O. **Enciclopédia de tecnologia química**. 1997.

KOBLITZ, M. G. B, PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase *Rhizopus sp.* Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 24, n. 2, p. 267-292, 2004.

KRISTENSEN, J. B.; XUB, X.; MUA, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, 2005.

KRÜGER, R. L. Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Alimentos), UFSC, 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, p. 921-927, 2010.

LANG, D.; HOFMANN, B.; HAALCK, L.; HECHT, H. J.; SPENER, F.; SCHMID, R. D.; SCHOMBURG, D. Crystal Structure of a Bacterial Lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 Refined at 1.6 Å Resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, p. 704-717, 1996.

LÉON, R.; FERNADES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media – Effect of gel hydrophobicity on diverse conversions of testosterone by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 483-500, 1998.

LÓPES, F. D.; REVILLA, J. L. G; MUNILLA, M. H. **Glicerol. In: Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, resíduos, energia.** Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, p. 393-397, 1999.

LORGERIL, M.; RENAUD, S.; MAMELLE, N.; SALEN, P.; MARTIN, J. L.; MONJAUD, I. Mediterranean alpha-linolenic acid rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. **The Lancet**, 343(8911):1454-9, 1994.

MAKI, K. C. MUSTAD, V.; DICKLIN, M. R.; GEOHAS, J. Postprandial metabolism with 1,3-diacylglycerol oil versus equivalent intakes of long-chain and medium-chain triacylglycerol oils. **Nutrition**, v.25, p. 627-633, jun. 2009.

MANCUSO, J. R.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4112-4116, 1999.

MARANGONI AG, ROUSSEAU D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 329-335, 1995

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, nov./dez. 2006.

MATTSSON, J. P.; SCHLESINGER, P. H.; KEELING, D. J.; TEITELBAUM, S. L.; STONE, D. K.; XIE, X. S. Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 24979-24982, 1994.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1270-1282, 2000.

McNEIL, G. P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, p. 779-783, 1990.

_____. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, p. 1-5, 1991.

McNEILL, G. P.; YAMANE, T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, p. 5-10, 1991.

MEI, L.; McCLEMENTS, D.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p., 2267-2273, 1999.

MEI, L.; McCLEMENTS, D. J.; WU, J.; DECKER, E. A. Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl. **Food Chemistry**, v. 6, p.307-312, 1998.

MENG, X. H.; ZOU, D.Y.; SHI, Z.P.; DUAN, Z.Y.; MAO, Z.G. Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. **Lipids**, v. 39, p. 37-41, 2004.

MIESIAC, I. Methods for utilization of the glycerine fraction, a rapeseed oil methanolysis by-product. **Przemysl Chemiczny**, v. 82, p. 1045-1047, 2003.

MILED, N.; BEISSON, F.; CARO, J. DE; CARO, A. DE; ARONDEL, V.; VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 165-171, 2001

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, p. 927-931, 1988.

MORRISON, LR. Glycerol. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, p. 921-932, 1994.

MONTGNOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4.ed. Editora Wiley. 704 p., 1996.

MUÑO, M. M.; ESTEBAN, L.; ROBLES, A.; HITTA, E.; JIMÉNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, P. A.; CAMACHO, B.; MOLINA, E. Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1033-1039, 2008.

NELSON, D. L.; COX. M. M. **LEHNINGER Principles of Biochemistry**; 3.ed., Worth Publishers; 1151 p., 2000.

NOVOZYMES. Product Sheet: Lipozyme[®] RM IM. Oils & Fats / 2000-10503-01.pdf

_____. Products & Solutions: Lipozyme[®] RM IM. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em: 15 de julho 2010.

NOVO NORDISK. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions, **Technical Report A-05948**. 1992.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Desempenho da lipase de *Aspergillus niger* na interesterificação da gordura de leite com óleo de soja. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**. Natal-RN, ag. 2009.

OHBA, N. Hydrophile-lipophile balance values for o/w emulsions stabilized by nonionic surfactants. I. Hydrophile-lipophile balance values of nonionic surfactants determined by emulsification. **Bulletin of the Chemical Society of Japan.**, v.35, n.6: p. 1016-1020, 1962.

OLIVEIRA, D.; FEHRMANN, 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.

PACHECO, S. G. A.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Encapsulated fish oil oxidative stability stored in different types of packing under ambient conditions. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 927-932, out.-dez. 2009.

PANGA, F.-M.; SENGA, C.-E.; TENGB, T.-T.; IBRAHIMB, M. H. Densities and viscosities of aqueous solutions of 1-propanol and 2-propanol at temperatures from 293.15 K to 333.15 K. **Journal of Molecular Liquids**, v.136, p. 71-78, nov. 2007.

PAWONGRAT, R; XU, X.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. **Food Chemistry**, v. 104, p. 251-258, 2007.

PEREIRA, R. S. Biological fermentation of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and its use in asymmetric synthesis. **Química Nova**, v. 18, p. 452-459, 1995

PETER, S. **Supercritical fractionation of lipids em supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry**. Editores: King, J. W. E List, G. R. AOCS Press, Champaign, Illinois, p. 83-91, 1996.

PETERS, G. H.; TOXVAERD, S.; ANDERSEN, K.V.; SVENDSEN, A. Analysis of the dynamics of *Rhizomucor miehei* lipase at different temperatures. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 16, p. 1003-1018, 1999.

PIGOTT, G. M.; TUCKER, B. W. Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. **Food Reviews International**, v. 3, p. 105-138, 1987.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R.D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 67-80, 1998.

PLOU, F. J.; BARANDIARAN, M.; CALVO, M. V.; MALLESTEROS, A.; PASTOR, E. High yield production of mono and diolelyglycerol by lipase catalyzed hydrolysis of triolein. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 18, p. 66-71, 1996.

PORTAL DO BIODIESEL. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 06 de maio de 2011.

PULEVA BIOTECH. GRAS notification for eupoly-epa and eupoly-dha derived from fish oils. Jan. 2006. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras/gras_notices/grn000193.pdf>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

REETZ, M. T: Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 145-150, 2002

REIS, M. F. T. Micelas reversas formadas por surfactante/solvente orgânico/água: estudo termodinâmico e aplicação para extração de proteínas da semente de jaca. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Processos de Alimentos), UESB, 2010.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Review: Lipase from *Rhizomucor miehei* as biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15-32, 2010a

_____. Review: Lipase from *Rhizomucor miehei* as industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 64, p. 1-22, 2010b.

ROSEN, M. J. **Surfactants and interfacial phenomena**. Wiley-Interscience, New York, 3 ed, 2004.

SARDA, I.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. **Biochimica et Biophysic Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SARTORELLI, D. S.; DAMIÃO, R.; CHAIM, R.; HIRAI, A.; GIMENO, S. G. A.; FERREIRA, S. R. G.; Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. Dietary ω -3 fatty acid and ω -3: ω -6 fatty acid ratio predict improvement in glucose disturbances in Japanese Brazilians. **Nutrition**, v. 26, 2, p. 184-191, fev. 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. v. 2, ed. São Paulo: Blucher, 2001.

S & J LIPIDS. Disponível em: <<http://www.sjlipids.com/c12.htm>>. Acessado em junho de 2010.

SELLAPAN, S.; AKOH, C. Enzymatic acidolysis of tristearin with lauric and oleic acids to produce coating lipids. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 77, p. 1127-1133, 2000.

SEONG-KOON, L.; CHIN-PING, T.; KAMARIAH, L.; MOHD, S. A. Y.; OI-MING, L. Diacylglycerol oil—properties, processes and products: A review. **Food Bioprocess Technology**, v.1, p. 223-233, 2007.

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.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHEKELLE, R. B.; MISSELL, L.; PAUL, O.; SHRYOCK, A. M.; STAMLER, J. Fish consumption and mortality from coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, 313:820. Letter. 1985.

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R. S.; SAWANT, S. B. Kinetics of esterification of lauric acid with fatty alcohols by lipase: effect of fatty alcohol. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 77, p. 1114-1121. 2002.

SIGUIRA, T.; KONDO, S.; SUKAGAWA, A. NAKANE, S. SHINODA, A.; ITOH, K.; YAMASHITA, A.; WAKU, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 215, p. 89-97, 1995.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 438-463, 1991.

SKAGERLIND, P.; FOLMER, B.; JHA, B. K. SVENSSON, M.; HOLMBERG, K. Lipase-surfactant interactions. **Progress in colloid & polymer science**, v. 108, p. 47-57, 1998.

SKAGERLIND, P.; JANSSON, M.; BERGENSTÅHL, B.; HULT, K. Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to interfaces and its interference with surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 4, p. 129-135, 1995.

SONNTAG, N. O. V. Glycerolysis of fats and methyl esters — Status, review and critique. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, n. 10, p. 795-802. 1982.

STAUFFER, C. E. Emulsifiers for the food industry em edible oil e fat products: products applications. v.4, **Barley's Industrial Oil e Fat Products**. Editor: Shahidi, F. Jonh Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 238-251. 2004.

SUGIURA, M.; SHIMIZU, M.; YAMADA, Y.; MINE, K.; MARUYAMA, E.; YAMADA, N. **Process for producing partial glyceride**. US Patent n. US 6337414. 2002.

WATANABE, T., SHIMIZU, M.; SUGIURA, M.; SATO, M.; KOHORI, JUN; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase lipozyme RM IM. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.80, n.12, 1201-1207. 2003.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied engineering in agriculture**. v. 22, p. 261-265, 2006.

TURNER, N. A.; DUCHATEAU, D. B.; VULFSON, E. N. Effect of hydration on thermostability of serine esterases. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 4, p. 371-376, 1995.

TURNER N. A., VULFSON, E. N. At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 108-113, 2000.

VALÉRIO, A. Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes *food grade* em sistemas livre de solvente. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos). URI, Erechim-RS, 2009.

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, 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.

VICENTE, M.; ARACIL, J.; MARTINEZ, M. Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters. BREW-Symposium 11 mai, 2005, Bioperspectives.

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

VULFSON, E. N. Industrial applications of lipases. **Lipases: their structure, biochemistry, and application**. Woolley, P. and Petersen, S. B. (eds.), p. 271-288, Cambridge University Press, New York, USA, 1994.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Biotechnological strategies for the modification of lipids. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 16, p. 141-175, 1999.

WILLIS, W.; LENCKI, R.W.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 639-674, 1998.

YANG, T.; FRUEKILDE, M. B.; XU, X. Applications of immobilized *Thermomyces anuginose* lipase in interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 9, 2003.

APÊNDICE A
CINÉTICA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA

Tabela A.1 Consumo de ácido láurico (esterificado com *n*-propanol) para quatro temperaturas diferentes (50, 55, 60 e 70 °C), catalisada pela Lipozyme[®] RM IM.

Tempe- ratura	Ácido láurico consumido (mmol)*					
	10 min	20 min	30 min	40 min	60 min	120 min
50 °C	66,57 ±	87,25 ±	87,69 ±	85,73 ±	93,86 ±	106,55 ±
	7,25	3,96	3,19	2,67	2,71	4,62
55 °C	62,47 ±	71,19 ±	76,83 ±	75,94 ±	77,98 ±	82,49 ±
	13,86	4,41	1,69	1,08	3,22	4,31
60 °C	60,36 ±	74,75 ±	77,00 ±	81,52 ±	84,14 ±	85,92 ±
	6,04	8,12	0,06	2,14	2,44	4,41
70 °C	69,87 ±	78,91 ±	74,78 ±	73,15 ±	74,89 ±	87,19 ±
	8,87	13,81	6,80	5,74	2,23	2,62

*Metodologia descrita no item 4.2.2.3.

APÊNDICE B

CINÉTICA DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE PARA A SELEÇÃO DO SURFACTANTE

Tabela B.1 Valores do índice de peróxido e da atividade enzimática específica residual da Lipozyme RM IM ao final da reação glicerólise com óleo de peixe OmegaPure[®] contendo 10% m/m (em relação ao total de substratos) de Tween (65, 80 e 85) e sem surfactante (reação controle), catalisada por 10% m/m (em relação ao total de substratos) desta lipase durante 48 h, conforme descrito no item 4.2.6.

Reação	Índice de peróxido (mEq O ₂ ativo)/kg amostra) ¹	Atividade enzimática residual (U/mg-catalisador)
Controle	1,60 ± 0,46	1,03 ± 0,05 ¹
Tween 65	2,72 ± 0,85	1,35 ± 0,01 ²
Tween 80	7,94 ± 0,25	0,55 ± 0,03 ¹
Tween 85	3,05 ± 0,51	1,09 ± 0,04 ²

¹ Análise em triplicata. ² Análise em duplicata.

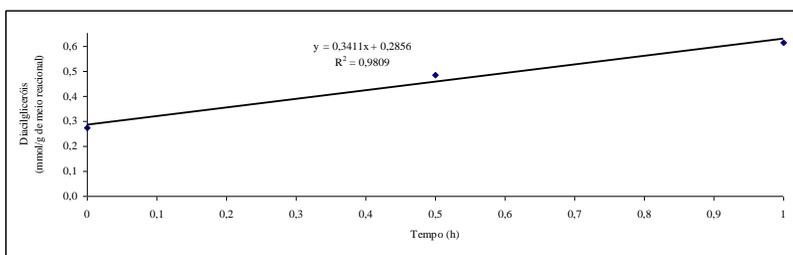


Figura B1 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio sem surfactante de grau alimentício (reação controle) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

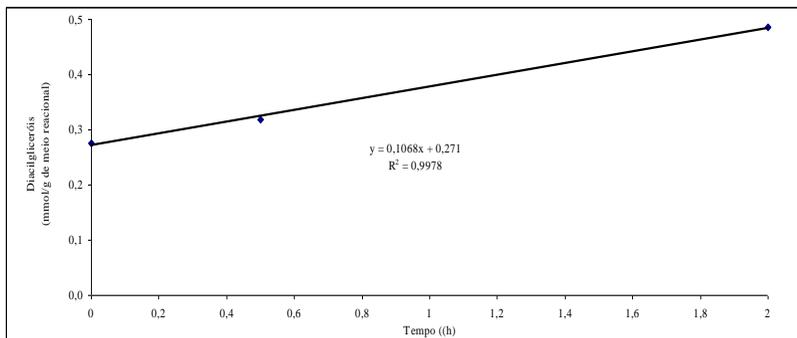


Figura B2 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 65 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

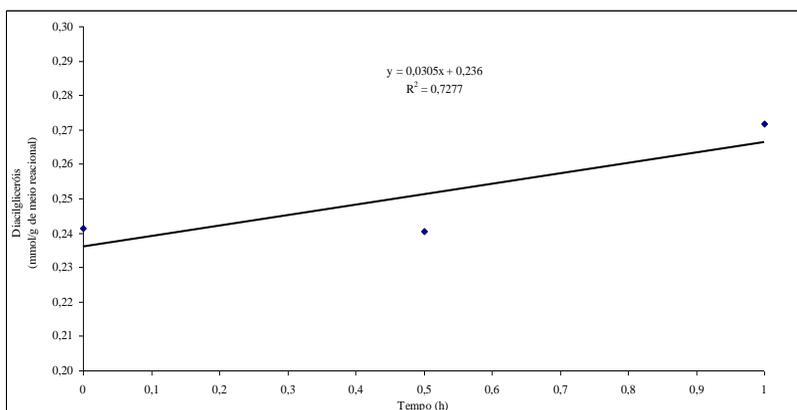


Figura B3 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 80 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).

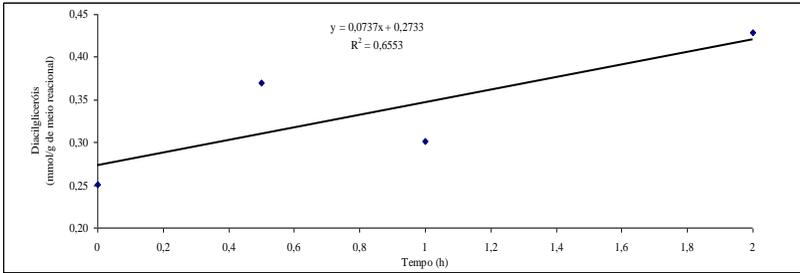


Figura B4 Velocidade inicial específica de diacilgliceróis correspondente à reação de glicerólise de óleo de peixe, em meio contendo o Tween 85 (10%, m/m) a 55 °C, catalisada pela Lipozyme[®] RM IM (10%, m/m).