

IVELIZE BABICZ

PRODUÇÃO DE DIACILGLICEROIS VIA HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE PALMA

EQ/UFRJ  
2009

PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS VIA HIDRÓLISE  
ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PALMA

Ivelize Babicz

EQ/UFRJ

M.Sc.

Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

Octávio Augusto Ceva Antunes, D.Sc.

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL

MAIO DE 2009

PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DE ÓLEO DE PALMA

Ivelize Babicz

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.

Aprovada por:

\_\_\_\_\_ Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Selma Gomes Ferreira Leite D.Sc.

\_\_\_\_\_ Orientador

Prof. Octávio Augusto Ceva Antunes, D. Sc

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Paula Adamis, D. Sc.

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Débora de Oliveira, D. Sc

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Andréa Medeiros Salgado, D. Sc

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL

MAIO DE 2009

## Ficha Catalográfica

Babicz, Ivelize.

PRODUÇÃO DE DIACILGLICEROIS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PALMA / IVELIZE BABICZ dos Santos. – Rio de Janeiro, 1988.

xi, 95 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química – EQ, 2009.

Orientador: Selma Gomes Ferreira Leite

1. Hidrólise enzimática. 2. Imobilização de enzimas

3. Bioquímica - Teses. I. Leite, Selma Gomes Ferreira (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química. III. Produção de diacilglicerol via hidrólise enzimática do óleo de palma.

## DEDICATÓRIA

“Aos meus pais Wilson e Clede e a minha  
irmã Aniassana pela compreensão e  
paciência nos momentos mais difíceis.”

E de repente olhamos para trás e nos perguntamos: Quantos passos foram dados até aqui? É quando percebemos que tudo não seria possível se não fosse pela existência de uma seqüência, nem sempre lógica, de acontecimentos e ações provocados por si ou outros, ou justificados pelo acaso.

A Deus.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe Cledes por lutar comigo, pelo estímulo na horas difíceis, pela paciência nos meus momentos de estresse e pelo imenso amor que é a fonte da minha força.

Ao meu pai Vilson, que sempre me deu todo seu apoio, suporte, e principalmente seu amor, a tudo que me destinei a fazer até então.

À minha irmã Aniassana pelo apoio, conselhos e carinho durante mais essa etapa.

Aos meus orientadores Selma e Octávio, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas sugestões, críticas, orientação e aprendizado neste trabalho de pesquisa. Pelo carinho, paciência, compreensão e conselhos dispensados neste período.

Ao Rodrigo e a Andrea por toda ajuda, apoio e orientação no desenvolvimento do trabalho.

Às meninas do grupo das enzimas Karen, Ingrid, Jane, Flávia e Aline pela amizade, companheirismo, discussões e experiências trocadas ao longo do trabalho.

A todas as minhas queridas amigas que mesmo de longe sempre me deram força.

As amigas Chaline, Samanta, Luana por toda ajuda, pela amizade, carinho e palavras de incentivo.

À funcionária Leonice do Departamento de Química Inorgânica do Instituto de Química de UFRJ pelas análises de Infravermelho.

Ao Professor Donato Aranda, por permitir que as análises cromatográficas fossem realizadas no laboratório GREENTEC, LADEQ 215, e em especial a Cristiane por fazer as análises.

A todos do Laboratório 641 do Instituto de Química da UFRJ pela agradável convivência e pelos bons momentos de descontração e alegria. Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A FINEP, FAPERJ, AGROPALMA, CAPES e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

## RESUMO

Resumo da dissertação apresentada à EQ/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

### PRODUÇÃO DE DIACILGLICERÓIS VIA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PALMA

Ivelize Babicz

Maio de 2009

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite

Octávio Augusto Ceva Antunes

Programa: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

O uso de diacilgliceróis na alimentação como substituto dos triacilgliceróis, presente em óleos e gorduras vegetais, começou na década de 80. Seu uso foi baseado em dois importantes benefícios à saúde: o primeiro refere-se à supressão da elevação pós-prandial dos triglicerídeos no soro e a segunda é a supressão do acúmulo de gordura corpórea. Sendo assim, o óleo de diacilglicerol pode ser classificado como um alimento nutracêutico. O principal objetivo deste trabalho foi investigar a produção de diacilgliceróis (DAG) por via enzimática utilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus*. As reações foram catalisadas pela lipase comercial imobilizada Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, realizadas com agitação magnética, mecânica, em reator de vidro acoplado a um banho termostático e em banho de ultra-som. As variáveis testadas foram temperatura (40, 50 e 60°C), agitação (1300, 1000, 700 e 400 rpm), tempo de reação (até 24 horas). Os resultados quantitativos foram determinados pela análise das amostras em CG/MS. Dentre as reações em banho termostático o melhor resultado para diacilgliceróis foi obtido em

temperatura de 60°C, 700 rpm, 2% (p/p) de enzima e 24 horas de reação, o qual ficou entre 26 e 30% de diacilgliceróis. Obteve-se um máximo 47,8% de rendimento de DAG na reação realizada em banho de ultra-som com temperatura controlada (30°C) e agitação de 150 rpm. Em busca de alternativas para aumentar o rendimento de DAG e diminuir custos, avaliou-se a imobilização por adsorção, da lipase Lipozyme TL100L em carvão ativado e em polianilina, sintetizada em laboratório. A imobilização que apresentou melhor atividade hidrolítica real foi em carvão ativado realizada em agitador, 146,38U<sub>H</sub>/g. As imobilizações realizadas em agitador orbital e com agitação magnética foram aplicadas nas reações de hidrólise em banho termostático e em banho de ultra-som. A reação que apresentou maior rendimento de DAG 17%, foi aquela em que a imobilização utilizada teve maior atividade hidrolítica.



## ABSTRACT

Abstract of Thesis presented to EQ/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

Ivelize Babicz

May of 2008

Advisors: Selma Gomes Ferreira Leite

Octávio Augusto Ceva Antunes

Department: Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

The use of diacylglycerol, in the feed, instead of triacylglycerol, present in oil and fatty vegetables begins in 1980. The use was established because of two important benefits to health: the reduction of both postprandial levels of triglyceride and fatty accumulation, making this diacylglycerol oil to be classified as food nutraceuticals. The main purpose of this work is to produce diacylglycerol (DAG) by enzymatic catalysis, using the lipase of *Thermomyces lanuginosus*. The reactions were carried on with catalytic amounts of the commercial lipase Lipozyme TL IM, under magnetic and mechanical stirring in a glass reactor coupled to a thermostated bath or under ultrasound irradiation. Several variables were tested: temperature, stirring, catalyst loading and reaction time. The best results for diacylglycerol production in thermostated bath were obtained at temperature of 60°C, 700 rpm, 2% of enzyme and 24 hours of reaction, which lead to a yield between 26 and 30% of diacylglycerol. At ultrasonic bath, with controlled temperature (30°C) and 500 rpm, a yield of 47,8% could be obtained. In search to an alternative system to increase the yield of DAG and decrease the cost of the process, we start to work with the absorption immobilization of Lipozyme TL100L in activated charcoal and

polianiline, synthesized in the laboratory. The immobilization which presented the best hydrolytic activity (146,38U<sub>H</sub>/g) was the one carried out on activated charcoal. The enzyme Lipozyme TL100L immobilized on activated charcoal and polianiline were used in the hydrolysis reaction in thermostatic bath and ultrasound irradiation. The results in thermostatic bath shows that the immobilized enzyme in activated charcoal gave better results than the immobilized enzyme in polianiline. The reaction carried under ultrasound irradiation didn't show significant results.

## LISTA DE SIGLAS

AA – Ácido Araquidônico

AG – Ácido graxo

AGL – Ácidos graxos livres

AGPI - Ácidos graxos poliinsaturados

AGPICL - Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa

AL - Ácido linoléico

ALA - Ácido alfa-linolênico

AOCS – American Oil Chemists Society

CA – Carvão Ativado

CMC – Concentração Crítica Micelar

DAG – Diacilgliceróis

DHA – Ácido Docosahexaenóico

DPA – Ácido Docosapentaenóico

EPA – Ácido Eicosapentaenóico

MAG – Monoglicerídeos

PANI – Polianilina

POS-PVA - Polissiloxano-álcool polivinílico

SFC – teor de sólidos

TAG – Triacilgliceróis

TIL – Lípase de *Thermomyces lanuginosus*

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE SIGLAS .....	xi
SUMÁRIO.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
LISTA DE CROMATOGRAMAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS .....	xvii
Introdução.....	2
1. Objetivos.....	4
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1 Óleos e Gorduras .....	5
2.1.1 Óleo de Palma .....	10
2.1.2 Diacilglicerol.....	12
2.2 Lipases.....	14
2.2.1 Características Gerais .....	14
2.2.2 Reações de hidrólise catalisada por lipases .....	17
2.2.3 Lipozyme <sup>®</sup> TL 100L e Lipozyme <sup>®</sup> TL IM .....	17
2.3 Imobilização de enzimas.....	18
2.3.1 Métodos de imobilização .....	19
2.3.2 Suportes .....	21
2.4 Ultrassom .....	25
2.4.1 Irradiação por ultrassom em reações orgânicas .....	25
2.4.2 Irradiação por ultrassom em reações enzimáticas .....	29
3. Materiais e Métodos .....	31
3.1 Materiais .....	31
3.1.1 Substratos.....	31
3.1.2 Enzimas .....	31
3.1.3 Suportes para imobilização.....	31

3.1.4 Outros materiais .....	32
3.2 Metodologias analíticas.....	32
3.2.1 Determinação da atividade hidrolítica .....	32
3.2.2 Determinação da concentração de proteínas.....	33
3.2.3 Análise de acidez em ácido palmítico .....	34
3.2.4 Análise Cromatográfica .....	34
3.2.5 Análise de Infravermelho de Transmissão .....	36
3.2.6 Método BET (Brunauer-Emmett-Teller) .....	37
3.3 Imobilizações da Lipozyme <sup>®</sup> TL 100L .....	37
3.3.1 Imobilização em carvão ativado .....	37
3.3.2 Imobilização em polianilina .....	38
3.3.3 Imobilização em carvão ativado e em polianilina no ultrassom ....	38
3.3.4 Parâmetros de imobilização .....	38
3.4 Hidrólise do óleo de palma com Lipozyme <sup>®</sup> TL IM e Lipozyme <sup>®</sup> TL 100 L imobilizada em carvão ativado e em polianilina .....	40
3.4.1 Reações de hidrólise em reator de vidro .....	40
3.4.2 Reações de hidrólise em banho de ultrassom .....	40
4. Resultados e Discussão .....	42
4.1 Testes preliminares .....	42
4.2 Reações de hidrólise com Lipozyme <sup>®</sup> TL IM .....	42
4.2.1 Banho Termostatizado .....	44
4.2.2 Banho de Ultrassom .....	51
4.3 Imobilizações da lipase Lipozyme <sup>®</sup> TL 100 L .....	54
4.4 Reações de hidrólise com Lipozyme <sup>®</sup> TL 100 L imobilizada neste trabalho .....	58
5. Conclusões .....	63
6. Referências .....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conversão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), ácido alfa-linoléico (ALA) e ácido linoléico (AL) em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI CL) do tipo ômega-3 e ômega-6.....	7
Figura 2: Estrutura química do ácido oléico, ácido linoléico e $\alpha$ -linolênico.....	8
Figura 3: Exemplo de ácidos graxos de ocorrência natural.....	8
Figura 4: Estrutura química do triacilglicerol.....	10
Figura 5: (1) 1,3-DAG; (2) 2,3-DAG e (3) 1,2-DAG.....	13
Figura 6: Reações químicas catalisadas por lipases.....	16
Figura 7: Classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas.(Kennedy, White e Mello, 1988).....	21
Figura 8: Principais grupos químicos na superfície do carvão ativado.....	23
Figura 9: Banho de ultrassom e transdutor Piezoelétrico.....	27
Figura 10: Esquema das reações de hidrólise em banho de ultra-som.....	41
Figura 11: Formação de produto em relação ao tempo da lipase Lipozyme <sup>®</sup> TL IM. ....	43
Figura 12: Perfil do acompanhamento da reação de hidrólise pela lipase Lipozyme <sup>®</sup> TL IM: rendimento de DAG em relação ao tempo.....	51
Figura 13: Espectro de infravermelho da polianilina.....	55

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Velocidade inicial da lipase imobilizada Lipozyme <sup>®</sup> TL IM. ....	44
Gráfico 2: Gráfico de velocidade inicial da reação de hidrólise com óleo de oliva usando-se a enzima livre Lipozyme <sup>®</sup> TL100L contendo 0,07 mg de proteínas. ....	56
Gráfico 3: Gráfico de velocidade inicial da reação de hidrólise com óleo de oliva, usando-se a enzima livre Lipozyme <sup>®</sup> TL100L contendo 4,36 mg de proteínas .....	56

## LISTA DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1: Cromatograma do óleo de palma refinado. ....	42
Cromatograma 2: Cromatograma da reação realizada a 60°C, 2% de enzima, 24 horas de tempo reacional e agitação de 700 rpm. ....	47
Cromatograma 3: Cromatograma da reação realizada a 50°C, 2% de enzima, 24 horas de reação e agitação de 400 rpm. ....	48
Cromatograma 4: Cromatograma da reação realizada a 40°C, 2% de enzima, 24 horas de reação e agitação de 1300 rpm. ....	49
Cromatograma 5: Cromatograma da reação com melhor rendimento, Experimento 2, Tabela 15. ....	53
Cromatograma 6: Cromatograma Experimento 3, Tabela 18 ....	61



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais ácidos graxos conhecidos na natureza.....	9
Tabela 2: Conteúdo de acilgliceróis em óleos comestíveis de várias origens. (Adaptado da fonte: Katsuragi, Y., et. al., “ <i>Diacylglycerol Oil</i> ”) .....	13
Tabela 3: Propriedades Físico – Químicas do óleo refinado, Agropalma. ....	31
Tabela 4: Volumes das soluções adicionadas para medir as concentrações. ....	36
Tabela 5: Concentrações obtidas para os padrões.....	36
Tabela 6: Resultados quantitativos das reações com agitação magnética.....	44
Tabela 7: Resultados obtidos das reações realizadas com 1% de enzima, agitação mecânica, 24 horas e 1300 rpm.....	45
Tabela 8: Resultados obtidos nas reações com 1% de enzima, 60°C, 24 horas e variação na agitação.....	46
Tabela 9: Resultados obtidos nas reações com 0,5% de enzima, 60°C, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação. ....	46
Tabela 10: Rendimento das reações realizadas à 60°C, 2% de enzima, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação. ....	47
Tabela 11: Rendimento das reações realizadas á 50°C, 2% de enzima, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação. ....	48
Tabela 12: Rendimento das reações realizadas à 40°C, 2% de enzima, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação. ....	49
Tabela 13: Resultados quantitativos do acompanhamento da reação de hidrólise.....	50
Tabela 14: Resultados das reações realizadas no ultrassom com 2% de enzima a 700 rpm e com variação do tempo reacional. ....	52
Tabela 15: Resultados das reações no ultrassom, 150 rpm e temperatura controlada (30°C). ....	53
Tabela 16: Resultados dos parâmetros avaliados nas imobilizações. ....	57
Tabela 17: Resultados da análise BET dos catalisadores.....	58
Tabela 18: Reações com Lipozyme <sup>®</sup> TL 100L imobilizada em carvão ativado em agitador.....	59
Tabela 19: Resultados quantitativos das reações em banho termostatzado, com suporte imobilizado em banho de ultrassom.....	59

Tabela 20: Resultados das reações de hidrólise realizadas em banho de ultrassom, com lipase imobilizada em carvão ativado em agitador orbital. ....	60
Tabela 21: Resultados das reações em banhos termostatizados com a lipase imobilizada em PANI com agitação magnética.....	61
Tabela 22: Resultados das reações de hidrólise realizadas em banho de ultrassom, com lipase imobilizada em PANI com agitação magnética.....	62

## Introdução

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, que são enzimas de interface que apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Entre os processos de maior interesse industrial estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga seletividade pelo substrato e, por isso, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (CASTRO et al., 2004).

As lipases verdadeiras (triacilglicerol acilidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG) fornecendo diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres. Estas enzimas apresentam uma capacidade única de agir apenas na interface óleo/água (CASTRO et al., 2004).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza em animais, vegetais e microorganismos. Apresentam peso molecular entre 40-50KDa com cerca de 300 resíduos de aminoácidos. São glicoproteínas nas quais a parte glicosilada hidrofóbica circunda o sítio ativo. As lipases provenientes de microorganismos são as mais utilizadas industrialmente porque além de apresentarem procedimentos mais simples de isolamento a partir do caldo fermentativo são, geralmente, mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes. São, em sua maioria, extracelulares, favorecendo sua extração, isolamento e purificação. O interesse em utilizar estes biocatalisadores na modificação estrutural de óleos e gorduras tem recebido bastante atenção devido, em especial, à sua especificidade em relação ao substrato (CASTRO et al., 2004).

Nos últimos anos têm aumentado o interesse dos consumidores por alimentos funcionais, aqueles que apresentam potencial de prevenir doenças, promover a saúde e reduzir os custos dos cuidados com a saúde.

De forma clássica, todos os alimentos podem ser considerados funcionais, visto que proporcionam sabor aroma ou valor nutritivo. Contudo, o termo funcional tem adotado uma conotação diferente, aquela de propiciar um efeito fisiológico benéfico além das necessidades nutricionais básicas (CASTRO et al., 2004).

Nas duas últimas décadas foi dada muita atenção aos efeitos negativos causados à saúde, associados com o consumo excessivo de certos óleos e gorduras. Recentemente, contudo, tem sido verificado que o consumo de determinados óleos e gorduras causa efeitos positivos à saúde, porque eles contêm compostos que são essenciais para o crescimento, manutenção da saúde e prevenção de doenças.

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

Devido à crescente necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias em química orgânica, que implicaram em reações em água, ou em ausência de solvente, surgiram novas e eficientes formas de transferência de energia.

No presente fez-se uso do ultrassom, onde efeitos físicos devem ser considerados como o aumento da temperatura local, a transferência de massa e a cavitação.

O uso de ultrassom em processos enzimáticos mostrou ser efetivo no aumento da atividade de enzimas. Este efeito parece ser específico para cada enzima e dependente das condições de sonicação usados. A aplicação de ultrassom pode produzir um efeito positivo na atividade enzimática, embora dependendo da intensidade, possa causar desnaturação (MARTINEZ et al., 2000).

---

\* Em todo o texto, o termo diacilglicerol refere-se a um óleo vegetal comestível de qualquer origem contendo um teor mínimo de 80% de diacilgliceróis.

## 1. Objetivos

Com base nos aspectos relacionados anteriormente, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver metodologias para produção de diacilglicerol via catálise enzimática do óleo de palma, utilizando Lipozyme<sup>®</sup> TL100L e Lipozyme<sup>®</sup> TL IM. Como objetivos específicos podem-se citar:

- comparar o rendimento de diacilglicerol em banho termostaticado e em banho de ultrassom utilizando a lipase comercial Lipozyme<sup>®</sup> TL IM como catalisador.

- comparar o rendimento de diacilglicerol em diferentes condições, variando temperatura, velocidade de agitação e quantidade de enzima adicionada ao meio reacional.

- desenvolver metodologia para imobilização da lipase livre Lipozyme<sup>®</sup> TL100L em dois suportes: carvão ativado e polianilina por adsorção;

- utilizar a lipase imobilizada anteriormente como catalisador na hidrólise de óleo de palma.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Óleos e Gorduras**

Cerca de dois terços da produção mundial de óleos e gorduras são destinados ao consumo humano e animal, sendo o restante usado em uma ampla variedade de aplicações industriais. Recentemente, tem surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso potencial na indústria farmacêutica, de alimentos, oleoquímica, entre outras (CASTRO et al., 2004).

Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal ou microbiana. Os lipídeos são uma classe abundante na natureza, sendo constituída por uma mistura de diversos compostos químicos, sendo os mais importantes os ácidos graxos livres e seus derivados, como triacilglicerídeos e fosfatídeos ( CARVALHO et al., 2003).

A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente na sua aparência física, sendo as gorduras sólidas ou pastosas e os óleos, líquidos na temperatura ambiente. Esta diferença deve-se principalmente ao fato de os óleos serem mais ricos em resíduos de ácidos graxos insaturados do que as gorduras (XU, 2000)

O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define a temperatura de 20° C como o limite inferior para o ponto de fusão das gorduras, classificando como óleo quando o ponto de fusão situa-se abaixo desta temperatura (RDC Nº. 270, de 22 de setembro de 2005). As gorduras animais tendem a ser gorduras saturadas, e são sólidas à temperatura ambiente. Manteiga, banha, sebo e a gordura da carne são gorduras saturadas. As gorduras insaturadas são líquidas à temperatura ambiente. Costumam ser de origem vegetal, embora os óleos de peixe também possam ter grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Os óleos vegetais (insaturados) podem ser endurecidos via hidrogenação. Normalmente os óleos hidrogenados são usados na fabricação de margarinas e gorduras vegetais.

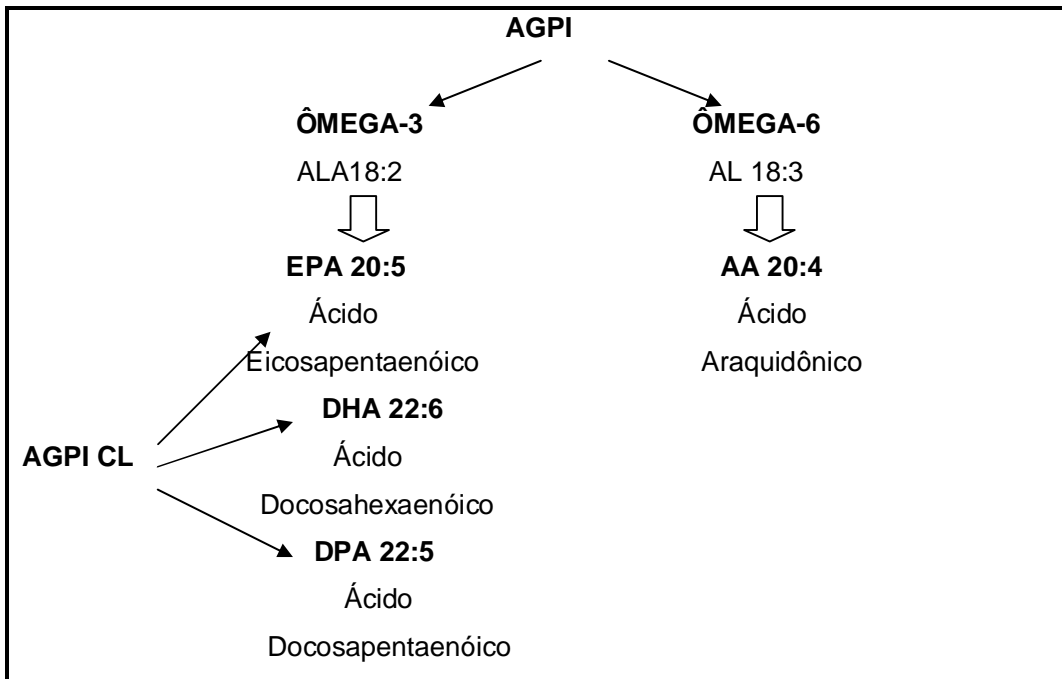
O esqueleto de óleos e gorduras é formado por cadeias de ácidos orgânicos lineares, denominados ácidos graxos, que diferem pelo número total de átomos de carbono na cadeia e também pela presença de insaturações (duplas ligações entre os átomos de carbono) em sua cadeia hidrofóbica. Os ácidos graxos que contêm apenas ligação simples entre carbonos são denominados ácidos graxos saturados. Os que possuem dupla ligação entre carbonos são chamados de ácidos graxos insaturados, sendo que os que apresentam mais de uma ligação dupla são conhecidos como poliinsaturados. Ácidos graxos insaturados e poliinsaturados podem diferir entre si pela posição da dupla ligação ao longo da cadeia carbônica. Estas duplas ainda podem gerar isômeros *cis* ou *trans*. Cabe destacar que na natureza dificilmente são encontrados ácidos graxos ou seus derivados em isomeria *trans*. Estes compostos largamente reconhecidos como prejudiciais à saúde são produzidos durante o processamento dos óleos, como por exemplo na hidrogenação de poliinsaturados para a fabricação de margarinas (NICHOLS et al, 2003).

Os ácidos graxos (AG) essenciais são o ácido  $\alpha$ -linolênico e o ácido linoleico. O uso do termo “essencial” refere-se ao fato de que estes AG desempenham importantes funções e não podem ser sintetizados pelo organismo por meio de precursores (HASLER, 2002). Pela falta de AG essenciais podem ocorrer sérias deficiências orgânicas, como problemas dermatológicos, neurológicos e visuais (RDC Nº. 270, de 22 de setembro de 2005).

Estes ácidos graxos  $\alpha$ -linolênico e linoleico devem ser obtidos a partir da dieta, pois são sintetizados apenas por vegetais.

A designação de ômega tem relação com a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo metil final da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos ômega-3 apresentam a primeira dupla ligação entre o terceiro e o quarto átomo de carbono, enquanto os ácidos graxos ômega-6 têm a primeira dupla ligação entre o sexto e o sétimo átomo de carbono. Os principais ácidos graxos ômega-3 são o ácido linolênico 18:3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) 20:5 e o ácido docosahexaenóico (DHA) 22:6, enquanto os principais n-6 são o ácido linoleico 18:2 e o ácido araquidônico 20:4 (NICHOLS et al, 2003 e MORETTO et al., 1989).

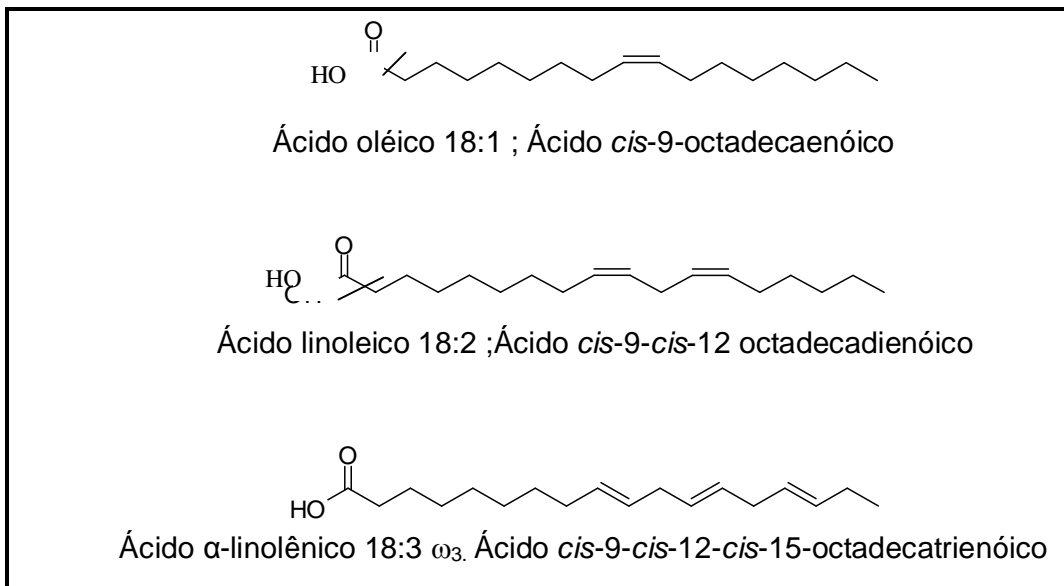
Os ácidos ômega-6 e ômega-3 representam cada um uma família dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), o ácido linoleico (C18:2, LA, família ômega-6) e o ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3, ALA, família ômega-3), que por sua vez, dão origem a outros ácidos essenciais de cadeias mais longas, chamados de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1:** Conversão de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), ácido  $\alpha$ -linoleico (ALA) e ácido linoleico (AL) em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI CL) do tipo ômega-3 e ômega-6.

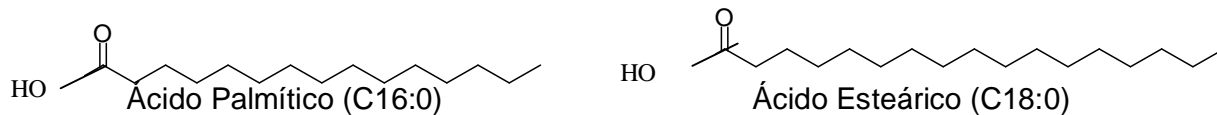
Os principais representantes desse grupo são o ômega-3 (ácido  $\alpha$ -linolênico), o ômega-6 (ácido linoleico e ácido araquidônico) e o ômega-9 (ácido oléico), representados na Figura 2 (COVINGTON, 2004).





**Figura 2:** Estrutura química do ácido oléico, ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico.

Existem diversos ácidos graxos de ocorrência natural, sendo alguns exemplificados na Figura 2 e Figura 3 e os mais importantes listados na Tabela 1.



**Figura 3:** Exemplos de ácidos graxos de ocorrência natural

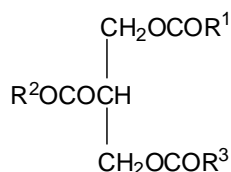
**Tabela 1:** Principais ácidos graxos conhecidos na natureza

<b>Ácido Graxo</b>	<b>Nome Sistemático</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Fórmula</b>
Butírico	Butanóico	C4 ou C4:0	<b>C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub></b>
Capróico	Hexanóico	C6 ou C6:0	<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub></b>
Caprílico	Octanóico	C8 ou C8:0	<b>C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub></b>
Cáprico	Decanóico	C10 ou C10:0	<b>C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub></b>
Otusalílico	<i>cis</i> -4-decenóico	C10:1(n4)	<b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub></b>
Caproleico	<i>cis</i> -9-decenóico	C10:2(n9)	<b>C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub></b>
Láurico	Dodecanóico	C12 ou C12:0	<b>C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub></b>
Lauroleico	<i>cis</i> -5-lauroleico	C12:1(n5)	<b>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub></b>
Lindérico	<i>cis</i> -4-dodecenóico	C12:1(n4)	<b>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub></b>
Mirístico	Tetradecanóico	C14 ou C14:0	<b>C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub></b>
Miristoleico	<i>cis</i> -9-tetradecenóico	C14:1(n9)	<b>C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub></b>
Tsuzuico	<i>cis</i> -4-tetradecenóico	C14:1(n4)	<b>C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub></b>
Palmitico	Hexadecanóico	C16 ou C16:0	<b>C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>
Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenóico	C16:1(n9)	<b>C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></b>
Esteárico	Octadecanóico	C18 ou C18:0	<b>C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub></b>
Petroselinico	<i>cis</i> -6-octadecenóico	C18:1(n6)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></b>
Oléico	<i>cis</i> -9-octadecenóico	C18:1(n9)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></b>
Eládico	<i>trans</i> -9-octadecenóico	C18:1(n9)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></b>
Vaccênico	<i>cis</i> -11-octadecenóico	C18:1(n11)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub></b>
Linoleico	<i>cis,cis</i> -9 -12- octadecadienóico	C18:2(n9,12)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>
Linolênico	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15- octadecatrienóico	C18:3(n9,12,15)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub></b>
Ricinoleico	12-hidroxi- <i>cis</i> -9- octadecenóico	C18:1(n9):OH(n12)	<b>C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>3</sub></b>
Araquídico	Eicosanóico	C20 ou C20:0	<b>C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub></b>
Gadoleico	<i>cis</i> -9-eicosenóico	C20:1(n9)	<b>C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub></b>
Gadóico	<i>cis</i> -11-eicosenóico	C20:1(n11)	<b>C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub></b>
Araquidônico	<i>cis,cis,cis,cis</i> -6,9,12,15- eicostetraenóico	C20:4(n6,9,12,15)	<b>C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub></b>
Behênico	Docosanóico	C22 ou C22:0	<b>C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub></b>
Cetoleico	<i>cis</i> -11-docosenóico	C22:1(n11)	<b>C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub></b>
Erúico	<i>cis</i> -13-docosenóico	C22:1(n13)	<b>C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub></b>
Lignocérico	Tetracosanóico	C24 ou C24:0	<b>C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub></b>
Nervônico	<i>Cis</i> -15-tetracosenóico	C24:1(n15)	<b>C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub></b>

Ácidos graxos são encontrados na natureza na forma não associada, sendo assim conhecidos como ácidos graxos livres, ou associados formando outras classes de compostos químicos como fosfatídeos e glicerídeos.

Os triacilgliceróis (Figura 4) consistem em uma forma altamente eficiente de armazenamento de energia metabólica, pois são menos oxidados que os carboidratos e as proteínas e também não absorvem muita água, por sua condição apolar. Desta forma, ocupam um volume menor no organismo, diferente do glicogênio, outra fonte de energia importante, que se liga à água em uma quantidade quase duas vezes o seu peso (RDC N°. 270, de 22 de setembro de 2005).

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por glicerídeos de ácidos graxos vegetais e podem conter fosfolipídeos, ácidos graxos livres e constituintes insaponificáveis. Suas características físicas variam com a estrutura e distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis presentes.



**R1, R2 e R3** = resíduos de ácidos graxos.

**Figura 4:** Estrutura química do triacilglicerol.

Os óleos têm um papel fundamental na alimentação, pois são importantes fontes de ácidos graxos essenciais, veículo para as vitaminas lipossolúveis, e participam da síntese de muitas substâncias endógenas, entre outras. Contudo, seu consumo excessivo está diretamente relacionado a doenças cardiovasculares, obesidade e resistência à insulina.

### 2.1.1 Óleo de Palma

A palma pertence ao gênero *Elaeis*, é um cultivo perene, o qual começa a produzir frutos a partir de 3 anos depois de semeada. Tem uma vida econômica entre 20 a 30 anos. O gênero *Elaeis* compreende duas espécies *E. guineensis* e *E. oleifera* (SUDRAM).

O óleo de palma é o segundo óleo vegetal mais importante do mundo. A origem do óleo, freqüentemente, dá uma indicação de identidade e características. Atualmente, a maior produção do mundo do óleo de palma vem do Sudeste da Ásia, em particular Malásia e Indonésia (POMPÉIA, 2002).

As áreas produtoras no Brasil são encontradas no Pará, Amazonas, Amapá e Bahia, sendo o Pará o maior produtor de óleo de palma do Brasil e onde se concentra mais de 80% da área plantada.

Este cultivo é o único que produz dois tipos de óleos. Da polpa do mesocarpo produz o óleo de palma que tem finalidade principalmente alimentícia, e a semente produz óleo da semente de palma (o palmiste), o qual tem larga aplicação na indústria oleoquímica (KINSELLA, 1990).

Sendo semi-sólido, o óleo de palma apresenta propriedades físicas necessárias para múltiplos usos em alimentos. Sua consistência favorece seu emprego na formulação de produtos gordurosos sólidos. O óleo de palma, a oleína e a estearina são amplamente utilizados na fabricação de gordura vegetais, shortenings (Ghotra, Dyal & Narine, 2002), margarinas e vanaspati (produto gorduroso alternativo à manteiga animal usado em países asiáticos), e também na indústria de frituras em todo o mundo. Uma vez que este óleo não contém poliinsaturados, seu uso em margarinas e shortenings não requer um processo prévio de hidrogenação, o que o faz economicamente atrativo. Além disso, evita-se a formação de ácidos graxos trans, formados durante a hidrogenação parcial. Como outros óleos vegetais, apresenta baixos níveis de colesterol, sendo facilmente digerível, assimilável e utilizável como fonte energética. Seu alto conteúdo em antioxidantes naturais (tocoferol) e sua estabilidade a temperaturas elevadas o convertem em um meio adequado para frituras, conferindo aos produtos uma vida de prateleira mais longa, além de ressaltar o sabor natural dos alimentos (SUDRAM).

Como em todos os óleos, os triacilglicerídeos (TAGs) são os maiores constituintes do óleo de palma. Cerca de 95% do óleo de palma consiste de uma mistura de TAGs, isto é, moléculas de glicerol, cada uma ligada com três ácidos graxos. Durante a extração do óleo do mesocarpo, a hidrofobicidade dos TAGs atraem outros componentes celulares solúveis. Os

componentes minoritários do óleo de palma são fosfatídeos, esteróis, pigmentos, tocoferol e traços de metal. Outros componentes no óleo de palma são os metabólitos da biossíntese de TAGs e produtos da atividade lipolítica. Estes incluem os monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) e ácidos graxos livres (AGL) (SIMOPOULOS, 2001).

Por seu alto teor de triglicerídeos saturados de alto ponto de fusão este produto é sólido a temperatura ambiente. Devido as suas características físicas peculiares o óleo de palma substitui com vantagens diversas gorduras hidrogenadas na indústria de alimentos (MATAIX, 2002).

Os óleos de palma e de palmiste, este extraído da amêndoa do fruto da palmeira, são livres de grandes quantidades de ácidos graxos altamente insaturados como o linolênico, e, portanto, têm poucos problemas de reversão de flavor. O óleo contém aproximadamente iguais quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados: insaturados incluem 39% de ácido oleico e 10% de ácido linoleico; saturados incluem 44,3% de ácido palmítico, 38,7% de ácido oléico, 10,5% de ácido linoleico, 4,6% de ácido esteárico, 1,0% de ácido mirístico, 0,1% de ácido láurico e 0,1% de ácido palmitoléico (SANTOS et al., 1998).

A composição química deste óleo é importante, pois dos ácidos graxos que o formam são determinadas às propriedades físicas essenciais, como viscosidade, ponto de fusão, estabilidade térmica, índice de cetano, permitindo prever o comportamento, a susceptibilidade à decomposição e o melhor método de manuseio (SUDRAM).

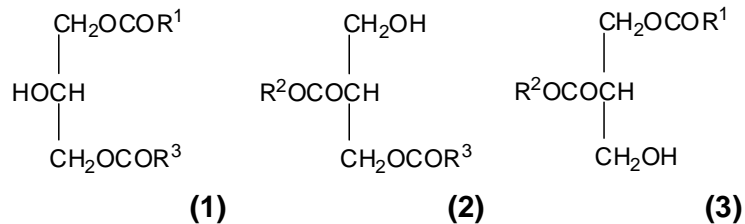
### **2.1.2 Diacilglicerol**

O uso de diacilglicerol ao invés de triacilglicerol, presente em óleos e gorduras vegetais, começou na década de 80. Seu uso foi baseado em dois importantes benefícios à saúde: o primeiro refere-se à supressão da elevação pós-prandial dos triglicerídeos no soro e a segunda é a supressão do acúmulo de gordura corpórea (SUDRAM)

Diacilgliceróis (Figura 5) são ésteres de glicerol que possuem dois grupos hidroxila esterificados por ácidos graxos, podendo existir em duas formas estereoquímicas conhecidas como *sn*-1,2-DAG (ou 2,3) e *sn*-1,3-DAG cuja relação isomérica natural é de 3:7 em função da migração do

grupo acil durante o processo de refino do óleo (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000).

A isoforma 1,2-DAG é considerada como um intermediário metabólico que é formado após a ingestão de triacilglicerol. A 1,3-DAG é responsável pelo efeito benéfico, pois é metabolizado por uma via diferente do TAG e do 1,2-DAG.



**Figura 5:** (1) 1,3-DAG; (2) 2,3-DAG e (3) 1,2-DAG.

O Diacilglicerol é um componente natural em vários óleos e gorduras, em torno de 10%, como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Conteúdo de acilgliceróis em óleos comestíveis de várias origens.

(Adaptado da fonte: Katsuragi, et. al., "Diacylglycerol Oil")

Óleo	DAG					MAG	Outros
	TAG	Total DAG	1,2-DAG	1,3-DAG			
	(g/100g)						
Soja	97.9	1.0	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	0.0	1.1	
Palma	93.1	5.8	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	<LD <sup>2</sup>	1.1	
Algodão	87.0	9.5	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	0.2	3.3	
Milho	95.8	2.8	1.5	2.9	<LD <sup>2</sup>	1.4	
Açafrão	96.0	2.1	1.2	2.7	<LD <sup>2</sup>	1.9	
Oliva	93.3	5.5	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	0.2	2.3	
Canola	97.1	2.9	1.0	1.9	<LD <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	
Gergelim	95.2	4.1	1.2	2.9	0.8	ND <sup>1</sup>	
Arroz	92.4	7.6	2.4	5.2	<LD <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	
Uva	94.2	5.8	2.1	3.7	<LD <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	
DAG comercial	17.3	81.4	28.4	53.0	1.2	ND <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> Não detectado  
<sup>2</sup> Abaixo do Limite de Detecção

O diacilglicerol é muito usado como emulsificante e estabilizante nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Também tem sido utilizado no Japão e nos Estados Unidos como óleo para cozinhar, em função de suas propriedades, recentemente descobertas, de reduzir os níveis de lipídeos, peso e de acúmulo de gordura (AGROPALMA, 2008).

O óleo comercial foi introduzido no Japão em 1999 com nome comercial de "Econa™". Nos Estados Unidos, foi registrado como "Enova oil™" após 15 anos de pesquisas, estudos clínicos e experimentos realizados pela Kao Corporation (KASAMATSU, 2005).

"Enova" contém aproximadamente 20% de triacilgliceróis e 80% de diacilgliceróis, sendo 56% na isoforma *sn*-1,3-DAG. Suas aplicações incluem o uso como óleo de cozinha para o preparo de molhos e temperos e para produtos a base de óleos e gorduras.

Segundo estudos clínicos nos Estados Unidos e Japão, o peso e a massa gorda podem ser reduzidos com a substituição de 10 a 20 gramas dos óleos convencionais da dieta por diacilglicerol (YASUKAWA et al., 2004).

O DAG é produzido por glicerólise, hidrólise ou esterificação química de óleos e gorduras. Esses processos normalmente usam altas temperaturas e/ou catalisadores tóxicos. Tais condições implicam em baixas seletividades e alto gasto energético, o que aumenta o custo do processo (GIESE, 1996) e leva a alterações no sabor e na coloração do óleo.

Técnicas por via enzimática apresentam inúmeras vantagens em relação a processos químicos, dentre eles o aumento da seletividade, o aumento da pureza do produto, a utilização de temperaturas mais brandas e a geração de efluentes mais facilmente tratáveis. Para estes fins, o uso de lipases vem sendo amplamente estudado (YASUKAWA et al., 2004 e CHENGELIS et al., 2006).

## **2.2 Lipases**

### **2.2.1 Características Gerais**

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C. 3.1.1.3), que são capazes de catalisar reações de hidrólise e síntese de grupos ésteres de diversos compostos. As lipases são amplamente encontradas na natureza. Podem ser obtidas a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificados e também a partir de fontes animais e vegetais. A principal forma de produção de lipases tem sido através de culturas de microrganismos, pois estes processos apresentam maior facilidade de controle, maior capacidade produtiva e custo de obtenção reduzido (MONTEIRO et al., 2001 e YASUKAWA et al., 2004).

As áreas nas quais a aplicação das lipases vêm tendo maior destaque são: (KASAMATSU, 2005, CHENGELIS et al., 2006 e BALCÃO et al., 1996).

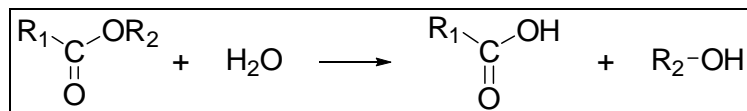
- Farmacêutica – síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo);
- Alimentos – síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex. aspartame);
- Detergentes – remoção de manchas de gorduras dos tecidos;
- Agroquímica – síntese de inseticidas e pesticidas;



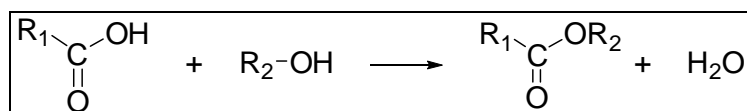
- Tratamento de efluentes – redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios;
- Oleoquímica – hidrólise e interesterificação de óleos e gorduras.

Lipases catalisam reações de substratos insolúveis em água (PANDEY et al., 1999) e a hidrólise de acilgliceróis para ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol ( LEAL et al., 2002). Sob certas condições, elas também catalisam reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoólise), aminólise e tiotransesterificações em solventes orgânicos, sistemas bifásicos e em suspensões micelares. O deslocamento do equilíbrio na reação, no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese), é controlado pela quantidade de água presente na mistura reacional. A Figura 6 ilustra as principais reações catalisadas por lipases (PANDEY et al., 1999).

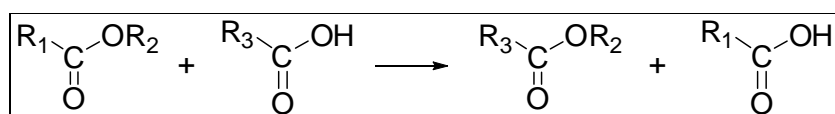
### HIDRÓLISE



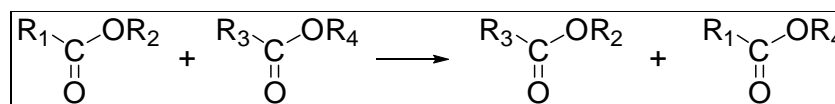
### SÍNTESE DE ÉSTER



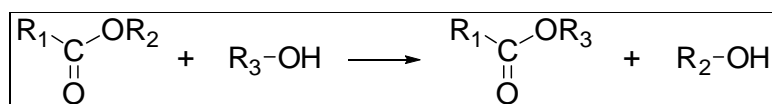
### ACIDÓLISE



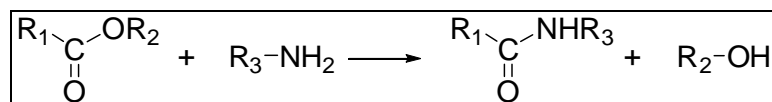
### INTERESTERIFICAÇÃO



### ALCOÓLISE



### AMINÓLISE



**Figura 6:** Reações químicas catalisadas por lipases.

Os principais substratos das lipases são os triglicerídeos de cadeia longa (com mais de 10 átomos de carbono), no entanto, estas enzimas atuam sobre uma gama de substratos não-naturais (ésteres não-lipídicos) de diversos tamanhos. Essa versatilidade das lipases sugere que sua espinha dorsal polipeptídica seja flexível e que possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e a previsão de interações estereoquímicas entre enzima e substrato (BARON, 2003).

Em geral, a maior atividade catalítica de lipases ocorre na interface água/lipídeo, através do fenômeno chamado de ativação interfacial e tanto a qualidade quanto a área interfacial têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (WAKABAYASHI, 2004 e BALCÃO et al., 1996). A ocorrência da ativação interfacial juntamente com a existência de uma tampa polipeptídica (parte da proteína que recobre o sítio ativo) já foi utilizada como parâmetro de distinção entre lipases “verdadeiras” e esterases.

O fenômeno da ativação interfacial foi proposto por Sarda e Desnuelle (1958) após verificar diferença no comportamento das cinéticas entre enzimas. Os autores verificaram que a atividade de esterases era função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis e Menten, no qual a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. Já a atividade das lipases, se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançada, e aumentando a partir desse ponto. A este fenômeno de aumento de atividade enzimática quando há formação de interfaces, denominou-se “ativação interfacial” (DALLA-VECCHIA, 2004).

### **2.2.2 Reações de hidrólise catalisada por lipases**

A palavra hidrólise significa decomposição pela água, mas são raros os casos em que sob condições ambientes pode-se realizar uma hidrólise completa. Para isto é necessário operar a temperaturas e pressões elevadas. Para que a reação seja rápida e completa é sempre indispensável a presença de catalisadores químicos, em geral ácidos ou bases, ou enzimas (ALVAREZ-MACARIE et al., 1999).

As enzimas, catalisadores orgânicos, são de grande importância em processos vitais, animais e vegetais, especialmente na digestão de alimentos, sendo que muitas das reações catalisadas por enzimas são hidrolíticas (MAHADIK et al., 2002).

### **2.2.3 Lipozyme® TL 100L e Lipozyme® TL IM**

As lipases utilizadas neste trabalho, Lipozyme®TL100L livre e Lipozyme®TL IM, esta última imobilizada em sílica, são lipases do fungo

*Thermomyces lanuginosus* (TIL) produzidas em fermentação submersa de um microrganismo *Aspergillus oryzae*, contendo que codifica a síntese enzima-lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TIL)

Lipozyme<sup>®</sup> TL100 L é uma preparação líquida da lipase microbiana (EC 3.1.1.3) de *Thermomyces lanuginosus*. Destinada para a hidrólise de gorduras, modificação de triglicerídeos e produção de mono e diacilgliceróis. É mais ativa na faixa de temperatura entre 20-50°C e na faixa de pH entre 6 - 11 (COSTA et al., 1999).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica, também chamada de Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, é uma lipase 1,3-específica. Essa lipase vem ganhando atenção na indústria de alimentos, principalmente em pesquisas com lipídeos (SARDA et al., 1958). Apresenta uma estrutura tridimensional estabilizada por três ligações dissulfeto e contém quatro triptofanos, um dos quais localizado na tampa, e tem se mostrado importante para a hidrólise eficiente. TIL tem uma preferência por hidrolisar triglicerídeos de cadeias médias (C10-C12) e tem uma alta estabilidade térmica. Devido a estas características, tem encontrado importantes aplicações na indústria como um detergente de lavar roupas em pó facilitador na remoção de manchas de gordura (DARIO, 2006).

### **2.3 Imobilização de enzimas**

Enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram confinadas ou localizadas em uma região definida do espaço com retenção de sua capacidade catalítica, e que podem ser utilizadas repetidas ou continuamente (BARCZA, 2008).

O objetivo principal da imobilização de enzimas para a indústria é o reuso destas para muitos ciclos de reações, além de melhorar as características das mesmas, através de protocolos simples de imobilização (NOVOZYMES).

Devido às propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade) as enzimas podem catalisar desde processos químicos mais complexos até experimentos sob circunstâncias mais suaves (COSTA et al., 1999).

A implementação em larga escala de enzimas na catálise industrial exige a utilização multidisciplinar de muitas técnicas diferentes: (1) a seleção de enzimas com propriedades adequadas; (2) a melhoria de propriedades das enzimas através de técnicas de biologia molecular; (3) a melhoria das propriedades das enzimas através das técnicas de imobilização; (4) e a melhoria das propriedades das enzimas através das reações e da engenharia dos reatores. Uma melhoria bem-sucedida das propriedades das enzimas é uma das soluções para o desenvolvimento de uma indústria química mais sustentável que possa sintetizar compostos mais complexos e úteis com um melhor custo-benefício (COSTA et al, 1999).

A tecnologia de imobilização de enzimas teve início nos anos 50, quando foram pela primeira vez produzidas preparações enzimáticas imobilizadas por inclusão em matrizes poliméricas e por ligação em suportes (YANG et al., 2003). Desde então numerosos métodos de imobilização em diferentes materiais foram desenvolvidos.

### **2.3.1 Métodos de imobilização**

A imobilização de enzimas consiste no confinamento das mesmas em um determinado material. Este processo pode ocorrer de diferentes maneiras. No caso de lipases, numerosos métodos de imobilização são viáveis, cada um envolvendo diferentes graus de complexidade e eficiência. Os vários métodos usados podem ser subdivididos em duas categorias principais: método químico quando ligações covalentes são formadas com a enzima, e o método físico, quando interações não-covalentes, geralmente mais fracas, ou retenções mecânicas são formadas. No método químico, a lipase é fixada no suporte por ligação covalente e há a formação de ligação cruzada quando é usado um agente de ligação em que uma enzima se liga a outra, induzindo a auto-reticulação das enzimas. No método físico a lipase pode ficar retida ou micro-encapsulada no interior de um gel insolúvel, fibras porosas ou materiais adsorventes (MAHADIK et al., 2002, PANDEY et al., 1999 e MOGENSEN et al., 2004).

Uma forma de classificar as enzimas imobilizadas é: (a) enzimas modificadas a forma insolúvel em água por técnicas convenientes, (b) enzimas solúveis usadas em reatores equipados com membranas de

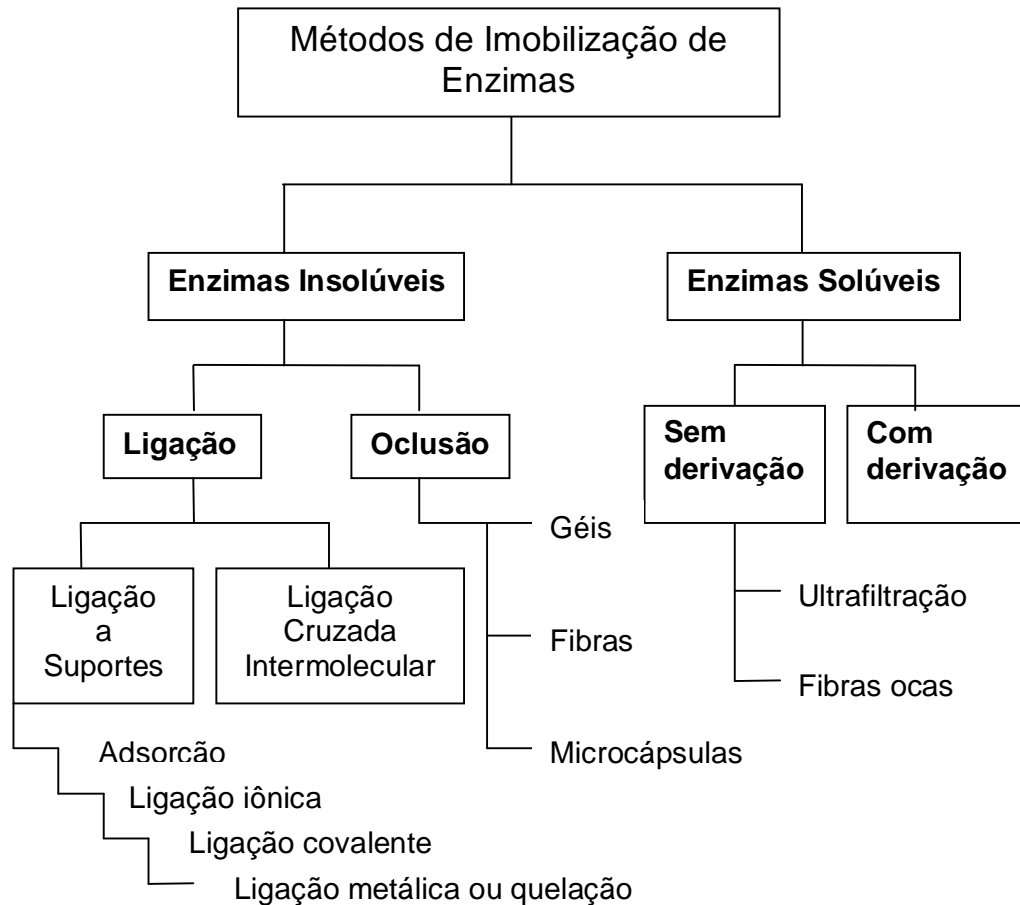
ultrafiltração não permanente que retém as enzimas dentro do reator e (c) enzimas com mobilidade restrita por ligação à outra macromolécula.

A forma como elas estarão imobilizadas depende da técnica a ser aplicada (Figura 7) (KRISHNA et al., 2002).

Neste trabalho iremos focar na técnica de imobilização por adsorção, pois esta é mais simples e envolve interações físicas enzima-suporte menos específicas, o que leva, geralmente, a preparações enzimáticas com atividades catalíticas elevadas e rendimentos de imobilizações também elevados. A principal desvantagem da imobilização por adsorção se deve a possíveis perdas de enzima, que poderão ocorrer durante a utilização da preparação enzimática no meio reacional, (GUISAN, 2006) o que pode ocasionar perda de atividade no reciclo.

A lipase livre Lipozyme<sup>®</sup>TL 100 L já foi imobilizada em partículas de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) por Freitas et al (2007), no qual a atividade hidrolítica foi de 730 U/g. Esta mesma lipase, de *Thermomyces lanuginosus*, foi adsorvida em polipropileno poroso (Accurel EP-100) por SALIS et al (2003) e a atividade hidrolítica encontrada para esta imobilização foi de  $2780 \times 10^3$  U/g.<sup>i</sup>

CHRISTENSEN et al (2003) observaram a imobilização da lipase *Thermomyces lanuginosus* em materiais como sílica e celulose com diferentes granulometrias. Segundo os autores, o uso industrial de lipases imobilizadas exige diferentes qualidades e características do biocatalisador em função da sua aplicação específica.



**Figura 7:** Classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas (KENNEDY et al., 1988).

### 2.3.2 Suportes

Os suportes utilizados para a imobilização podem ser constituídos de vários tipos de materiais. Uma forma de classificá-los é como suportes orgânicos e suportes inorgânicos. Os suportes orgânicos podem ser naturais (celulose, agar, quitina, amido, colágeno, etc) ou sintéticos (polistirenos, poliacrilatos, polivinílicos, nylon, etc). Os inorgânicos por sua vez dividem-se em minerais (areia, bentonita, argilas, etc) e fabricados (vidro, cerâmica e sílica de porosidade controlada, óxido de ferro, óxido de níquel, etc).<sup>ii</sup> (KENNEDY et al., 1988).

A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende essencialmente de dois fatores, das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada. Dada a variabilidade desses

fatores, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização e nem um suporte que possa ser considerado de aplicação universal (KENNEDY et al., 1988).

Para este trabalho dois suportes foram utilizados para imobilização por adsorção da lipase: carvão ativado e polianilina.

### Carvão ativado

Os carvões microporosos pertencem a uma classe de materiais importantes, conhecido como carvão ativado (CA) sendo de larga aplicação através de sua reconhecida produção mundial de aproximadamente 400.000 ton/ano (SAAD, 2005). O carvão ativado é utilizado como adsorvente, catalisador ou suporte de catalisador. Na área de tratamento de efluentes é usado na adsorção em fase líquida, por exemplo, na adsorção de moléculas orgânicas que causam sabor, odor e toxicidade.

Os carvões ativados são materiais porosos que apresentam uma forma microcristalina, não grafítica, que sofreram um processamento para aumentar a porosidade interna. Uma vez ativado o carvão apresenta uma porosidade interna comparável a uma rede de túneis que se bifurcam em canais menores e assim sucessivamente. Esta porosidade diferenciada é classificada segundo o tamanho em macro-, meso- e microporosidades (FREITAS et al., 2007).

A característica incomparável do carvão é a grande superfície interna localizada dentro da rede de poros estreitos, onde a maior parte do processo de adsorção toma lugar e cujo tamanho e forma dos poros também influenciam na seletividade da adsorção através do efeito de peneira molecular (RODRIGUEZ – REINOSO et al., 1998).

O carvão ativado é comercializado em forma de pó ou granulado. As propriedades texturais dos carvões ativados se fundamentam em duas características importantes que são: tamanho de poro e a área superficial

A interação adsorvato/adsorvente na adsorção física é uma função da polaridade da superfície do sólido e da adsorvidade. O caráter não polar da superfície no carvão ativado é fator preponderante na adsorção de moléculas não polares por um mecanismo não específico, podendo ser incrementada

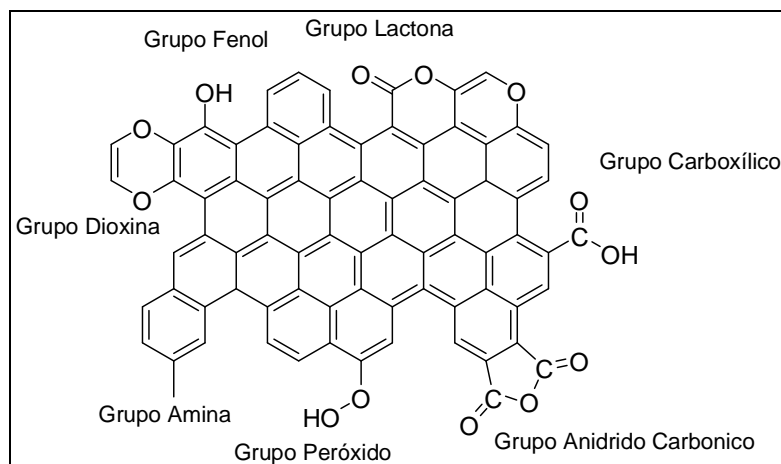


pela adequada modificação da natureza química da superfície do carvão (por exemplo: oxidação), desde que este produza um incremento na interação superfície-adsorvato (GONÇALVES, 1996).

As propriedades do carvão ativado dependem das estruturas porosas e dos grupos químicos presentes em sua superfície. As propriedades físicas da superfície são descritas pela área superficial específica e porosidade, enquanto que as propriedades químicas dependem da presença ou ausência de grupos ácidos ou básicos sobre sua superfície (SALIS et al., 2003).

De acordo com a temperatura na qual o carvão é exposto ao oxigênio, são formadas superfícies ácidas e básicas (CHRISTENSEN et al., 2003).

A superfície ácida é formada quando uma solução oxidante é colocada em contato com o carvão em temperaturas em torno de 300 a 400°C; esta superfície caracteriza o carvão-L. As superfícies ácidas são caracterizadas pela presença de grupos funcionais como: grupos carboxílicos, grupo fenol, grupo carbonilo, grupo anidrido carboxílico, grupo ciclo peróxido. Por outro lado, a superfície básica é formada em atmosfera inerte em temperaturas acima de 700°C; esta superfície caracteriza o carvão-H.<sup>iii</sup> A superfície básica é caracterizada pela presença de grupos funcionais pirano, e a função ácida por fenóis, por exemplo, conforme ilustrado na Figura 8.

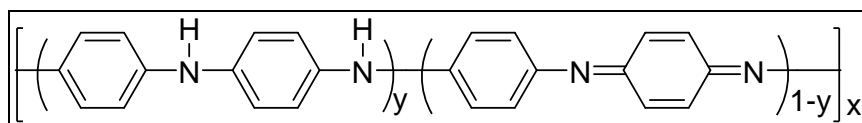


**Figura 8:** Principais grupos químicos na superfície do carvão ativado.<sup>iv</sup>

Polianilina

A polianilina e polímeros derivados da anilina têm recebido grande atenção nos últimos anos pela sua estabilidade química em condições ambientais, processabilidade, facilidade de polimerização e dopagem, baixo custo e suas propriedades únicas. Estas vantagens viabilizam várias aplicações tecnológicas que já vêm sendo desenvolvidas inclusive industrialmente (VALENCIA, 2007).

As polianilinas representam uma classe de polímeros, cuja composição química na forma de base (não dopada) é dada por uma fórmula geral do tipo:



Composta por  $y$  e por  $(1-y)$  unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas respectivamente. O valor de  $y$  pode variar continuamente entre 1 para o polímero completamente reduzido (contendo somente nitrogênios amina) e zero, no caso do polímero completamente oxidado (contendo somente nitrogênios imina).

A polianilina (PANI) pode ser sintetizada na forma de pó utilizando-se um oxidante químico apropriado, ou na forma de filmes finos pela oxidação eletroquímica de monômeros sobre eletrodos de diferentes materiais inertes. O baixo custo do monômero aliado à facilidade de síntese e de dopagem da PANI faz com que esse polímero seja economicamente viável, já sendo inclusive comercializado por algumas indústrias, para aplicações especiais num primeiro estágio.

A síntese química convencional da PANI tem a grande vantagem de produzir um polímero de alto peso molecular e de elevada pureza, que pode ser obtido diretamente no estado dopado, em grandes quantidades, na forma de um pó verde.

Por outro lado a síntese eletroquímica da PANI leva a algumas vantagens sobre a síntese química: não necessita de agente oxidante e catalisador, facilidade de caracterização “in situ” por técnicas espectroscópicas; e o polímero é obtido diretamente na forma de filmes finos. No entanto, para o estudo das propriedades físicas e aplicações

tecnológicas a síntese química tem sido mais utilizada (BRENNAN et al., 2001).

Na polimerização química vários ácidos protônicos, tais como ácido clorídrico, sulfúrico, tolueno sulfônico, entre outros, têm sido usados em combinação com diversos agentes oxidantes, como o dicromato de potássio, peróxido de hidrogênio e persulfato de amônio (MORENO – CASTILLA et al., 2004). A síntese eletroquímica se dá pela oxidação eletroquímica da anilina em meio ácido, sob a aplicação de uma certa corrente ou potencial elétrico. Polianilinas com substituições no anel ou no átomo de nitrogênio amina podem ser facilmente sintetizadas e dopadas em uma grande variedade de níveis, com conseqüente variação nas suas propriedades elétricas e físico-químicas (MUSSATTO et al., 2004).

Tal versatilidade tem despertado enorme atração na comunidade científica, uma vez que as polianilinas detêm características únicas, como a simplicidade no processo de dopagem, sua excelente reciclabilidade redox e suas propriedades ópticas, elétricas e eletroquímicas. Além disso, a alta estabilidade ambiental e facilidade na preparação candidatam fortemente as polianilinas a aplicações na área da engenharia bioquímica, como um suporte potencialmente atrativo para imobilização de enzimas, visto que apresentam propriedades semelhantes aquelas esperadas do suporte ideal (GUILARDUCI et al., 2006).

Adicione-se a tais características o fato de que as polianilinas são polímeros de síntese extremamente barata e com excepcional rendimento. No entanto, o uso de polianilinas quimicamente sintetizadas, visando explorar suas propriedades como suporte, em função de suas características de estabilidade ambiental e reatividade nos processos de ativação, tem sido restrito, surgindo a necessidade de um estudo sistemático sobre as características e propriedades das polianilinas quimicamente sintetizadas, bem como a sua aplicação como suporte para imobilização de enzimas (BRENNAN et al., 2001).

## **2.4 Ultrassom**

A utilização de ultrassom em reações de hidrólise pode ser uma ferramenta simples e importante no controle de agregação e/ou dispersão de partículas. A utilização do ultrassom tem se tornado cada vez mais comum em laboratórios químicos de pesquisa e de produção para limpeza de materiais, homogeneização de emulsões e suspensões e reações químicas entre outras. Quando esses materiais ou substâncias são submetidos ao banho de ultrassom, possíveis reações químicas podem ser iniciadas acarretando em transformações do sistema. Em reações enzimáticas o ultrassom é uma boa ferramenta a ser utilizada, podendo perturbar ligações fracas e induzir a mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (MATTOSO, 1996).

#### **2.4.1 Irradiação por ultrassom em reações orgânicas**

As ondas sonoras são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como ar, metais, isolantes, água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo.

O ultrassom só foi descoberto em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezoeletrico e 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação.

Entretanto, somente em 1912 quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation And Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (MAIA et al., 2000).

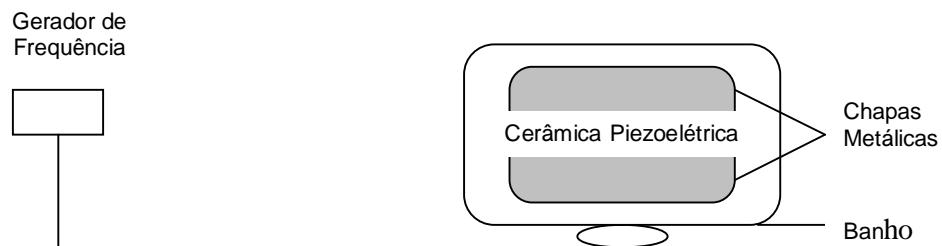
A partir de então, diversas pesquisas começaram a ser desenvolvidas e o estudo da influência das ondas ultrassônicas sobre sistemas químicos passou a ser chamado de sonoquímica e a aplicação de sonicação passou a ser diversificada.

A região do ultrassom pode ser dividida em duas principais áreas: alta potência e baixa potência. As ondas sonoras de alta potência (1-10 MHz)

causam permanente mudança física e química porque produzem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. A aplicação das ondas sonoras de alta potência se dá nas áreas da Biologia (homogeneização, rompimento de células), Engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), Geologia (localização do mineral, depósito de óleo), Industrial (filtração, desgaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc), Medicina (esterilização, fisioterapia, inalações), Física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som) e Polímeros (polimerização, despolimerização, degradação do peso molecular) (MARTINEZ et al., 2000).

As ondas sonoras de baixa potência, com frequência maior que 20KHz são usadas em campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos. Estas ondas ultrassônicas são empregadas em exames de feto, inspeções de solda, medidas de espessuras. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco. Cabe destacar que a sensibilidade do ouvido humano encontra-se na faixa de 16 Hz a 16KHz (BARBOSA et al., 1992).

Existem dois tipos, basicamente, de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas: o banho e a sonda. Onde a fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico, (Figura 9).



**Figura 9:** Banho de ultrassom e transdutor

O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas

amplificam estes sinais; o transdutor transmite os impulsos ultra-sonoros ao meio reacional.

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassonora é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassonora, e conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais (SINISTERRA, 1992).

A propagação das ondas ultrassônicas é um fenômeno físico e ocorre por meio de um corpo vibrando que transmite seu movimento às moléculas adjacentes e estas transmitem às outras ao seu redor antes de retornarem à sua posição de equilíbrio. Desta forma, mantendo este movimento, ocorre a criação de ciclos de compressão e expansão (SINISTERRA, 1992).

Quando em meios líquidos, este ciclo gera cavidades que aumentam durante a expansão, pois os gases adsorvidos no líquido e os próximos à cavidade evaporam promovendo aumento de tamanho. Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode-se liberando calor e pressão muito elevados em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido. Tal efeito é o conhecido fenômeno de cavitação (KORN et al. 2003).

É imprescindível destacar que, na cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis e as transitórias. As primeiras oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido, na fase de descompressão. Elas precisam de vários ciclos de expansão e compressão para atingirem o volume crítico e podem tornar-se transitórias, que são as bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo, então, responsáveis pela cavitação (SINISTERRA, 1992).

Em casos de partículas sólidas presentes no líquido, na etapa de compressão os gases são adsorvidos para o interior da partícula, de onde saem somente na etapa de expansão (BARBOSA et al., 1992).

Tendo em vista, o colapso cavitacional ocasionado pelas ondas ultrassonoras, proporcionando pressão e temperatura em regiões determinadas, muitos estudos começaram a ser desenvolvidos, iniciando-se uma nova área da química conhecida como sonoquímica. Esta consiste em estudar reações homogêneas e heterogêneas sob ação do ultrassom.

Estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada “ponto quente”, onde inicia-se a implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, é trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (SINISTERRA, 1992).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas.

Quando em sistemas com líquidos imiscíveis, este colapso das microbolhas pode promover uma eficiente agitação. Com o aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas, com aumento da superfície de contato e das forças coesivas podem ser formadas ainda micro-emulsões. Espécies reativas e a indução de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas também podem ocorrer (SINISTERRA, 1992).

#### **2.4.2 Irradiação por ultrassom em reações enzimáticas**

A irradiação por ultrassom é um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas.

O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional. Mas, suas frequências de irradiação podem promover a formação de radicais livres que alteram células e enzimas presentes no meio. No caso de proteínas globulares, frequências entre 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar a hidrólise. Já para proteínas lineares essa absorção depende do conteúdo de  $\alpha$ -hélice.

O fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente. Contudo, este não é de

todo um fator negativo já que a inativação térmica de enzimas é de muita importância em alguns processos biotecnológicos, sendo a pasteurização ultrassônica um deles.

É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas. Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase (SHAH et al., 2008).

Outro fator a ser considerado em reações com enzimas em ultrassom é o solvente que está sendo utilizado. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, pois ocorre aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona como um mecanismo de proteção porque as moléculas de água encontram-se em torno da enzima, desta forma não são facilmente movidas pelo ultrassom (MARTINEZ et al., 2000).

Outro fator que é influenciado pelo solvente é a transferência de massa. Sabendo-se que o ultrassom em baixas intensidades aumenta o movimento do meio, favorecendo o fluxo de reagentes para o sítio ativo da enzima, um solvente mais volátil aumenta o efeito cavitacional, podendo favorecer a reação. Entretanto, a intensidade e/ou o tempo de irradiação pode levar à inativação da enzima via colapso cavitacional.



### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Substratos

Óleo de palma refinado utilizado como substrato nas reações foi doado pela Agropalma.

A Tabela 3 apresenta as propriedades físico-químicas do óleo de palma refinado, utilizado neste trabalho.

**Tabela 3:** Propriedades Físico – Químicas do óleo refinado, Agropalma.

Propriedades Físico Químicas (AOCS)					
Atributos	Resultados	Limites	Atributos	Resultados	Limites
Acidez (%) Palmítico)	0,034	$\leq 0,05$	SFC à 10°C	48,97	$50 \pm 3$
Í. Peróxidos (mEq/Kg)	0	$\leq 1,0$	SFC à 20°C	20,12	$21 \pm 3$
Cor (Lovibond Red 5 <sup>1/4</sup> )	2,0	$\leq 4,0$	SFC à 25°C	13,09	$12,5 \pm 2$
Ponto de Fusão (°C)	35,0	$36 \pm 2$	SFC à 30°C	6,71	$8 \pm 2$
Índice de Iodo (wijjs)	52,67	51 – 55	SFC à 35°C	4,25	$5 \pm 2$
Sabor	9	$\geq 8$	SFC à 40°C	2,11	$2,5 \pm 2$
Temp. Embarque (°C)	-	-	SFC à 45°C	0	$< 1$

##### 3.1.2 Enzimas

As lipases imobilizadas e livres comerciais Lipozyme<sup>®</sup> TL IM e Lipozyme<sup>®</sup> TL 100 L foram cedidas por Novozymes (antiga Novo Nordisk, Dinamarca).

### 3.1.3 Suportes para imobilização

#### - Carvão ativado

#### - Polianilina (PANI)

A polianilina usada para a imobilização foi sintetizada adicionando-se volume a volume uma solução 0,61 mol L<sup>-1</sup> do agente oxidante persulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) a uma solução 0,44 mol L<sup>-1</sup> de anilina (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>), ambas preparadas em HCl 2,0 mol L<sup>-1</sup>, de forma a manter uma razão entre o agente oxidante e a anilina (z) igual a 0,9 calculada segundo a Equação 1

$$Z = \frac{2,5 \cdot n_{an}}{N_e \cdot n_{ox}} \quad (1)$$

$n_{an}$  = número de mol da anilina

$n_{ox}$  = número de mol de persulfato de amônio

$n_e$  = número de elétrons necessários para reduzir uma molécula do agente oxidante =2.

A reação de polimerização se processou pela adição gota-à-gota da solução de persulfato de amônio sobre a solução de anilina, com leve agitação, por um período mínimo de 2 h, mantendo-se as soluções numa faixa de temperatura que variava entre -5 e -10 °C. Finda a adição do agente oxidante, a mistura obtida permanecia sob agitação por 30 min, seguidos por 2 h de repouso de finalização da reação.

O precipitado foi separado da mistura por filtração a vácuo em funil de Büchner e então lavado exaustivamente com HCl 2,0 mol L<sup>-1</sup>. Finalmente, o polímero obtido foi seco sob vácuo contínuo, à temperatura ambiente, até se alcançar massa constante.

### 3.1.4 Outros materiais

Os outros materiais e reagentes empregados nesta pesquisa foram adquiridos da Vetec, Merck e Tedia, e usados sem qualquer tratamento prévio

## **3.2 Metodologias analítica**

### **3.2.1 Determinação da atividade hidrolítica**

Foi utilizado como substrato para a dosagem lipásica, azeite de oliva (5% p/v) emulsionado por três minutos com goma arábica (10% p/v) em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0. Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 19 mL desta emulsão e 0,1g da enzima, agitando-se em shaker por 5 minutos a 37°C e 150 rpm. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida extraindo-se os ácidos graxos com adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos foram então titulados com uma solução de NaOH (0,05 mol) até pH 11. Os brancos reacionais foram preparados com 19 mL de emulsão e após decorrido o tempo de agitação foram adicionados 20 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v) e 0,1g de enzima. Estes também foram titulados com a solução de NaOH (0,05 mol) até pH 11 (PINHEIRO, 2006).

Uma unidade de atividade de hidrólise ( $U_H$ ) é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, que pode ser determinada através da Equação 2 (LEAL, 2000).

(2)

$$A_H = \frac{(V_a - V_b) \cdot N \cdot 1000}{E \cdot t}$$

Onde :  $A_H$  é a atividade hidrolítica ( $\mu\text{mol}/\text{min.g}$  ou  $\mu\text{mol}/\text{min.mL}$ ); e  $V_a$  e  $V_b$  correspondem ao volume de solução de NaOH (mL) gasto na titulação da amostra e do branco, respectivamente;  $N$  é a normalidade da solução de NaOH (mEq/mL);  $E$  é a quantidade de enzima (g); e  $t$  é o tempo de reação (min).

### **3.2.2 Determinação da concentração de proteínas**

A dosagem de proteínas do extrato bruto e das águas residuais das imobilizações conduzidas ao longo desse processo foram feitas de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este método utiliza o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250 para a determinação de proteínas

totais. O BG-250 interage com proteínas que contenham aminoácidos com cadeias laterais aromáticas ou básicas no pH da reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 leva o corante para a forma aniônica, que absorve a 595 nm. As leituras dos valores de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro CARY 1E UV-visible, Spectrophotometer, VARIAN, e a concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA, Sigma).

### 3.2.3 Análise de acidez em ácido palmítico

A acidez foi determinada no óleo refinado de palma antes das reações e em cada amostra após as reações. Utilizou-se o peso molecular do ácido palmítico, devido a este ser o ácido que se apresenta em maior quantidade no óleo de palma. Pesou-se 0,5 gramas de amostra, que foi diluída com 50 ml de uma solução 1:1 de etanol:éter, adicionou-se 4 a 5 gotas de fenolftaleína. A titulação foi feita com uma solução de hidróxido de sódio 0,05 N, até uma coloração rósea. O índice de acidez foi calculado seguindo a Equação 3,

$$\text{Acidez em ácido palmítico\%} = \frac{V \cdot N \cdot f \cdot 0,2564 \cdot 100}{P} \quad (3)$$

Sendo que:

V = volume em ml da solução de NaOH gasto na titulação;

N = normalidade da solução de NaOH;

f = fator de correção da normalidade;

P = peso em gramas da amostra.

### 3.2.4 Análise Cromatográfica

A análise cromatográfica realizada no laboratório GREENTEC, LADEQ 215, foi feita para determinar a quantidade de MAG, DAG, TAG e AGL formados no meio reacional e o rendimento calculado a partir da

comparação com o padrão interno. O rendimento obtido foi corrigido através do índice de acidez da amostra.

O objetivo do experimento é a separação e quantificação de glicerol e glicerídeos em óleo, usando como base o método de referência \_ Draft: **prEN 14105**.

O princípio dessa análise consiste na transformação do glicerol, mono- e diacilgliceróis em compostos mais voláteis através da derivatização na presença de piridina e N-metil-N-trimetisililtrifloroacetamina (MSTFA), e usando como padrão interno 1,2,4 butanotriol (para determinação do glicerol) e 1,2,3, tricaproilglicerol (tricaprina) (para determinação dos glicerídeos). As substâncias de referência para a análise foram: glicerol, 1-monooleilglicerol (monoleína), 1,3-dioleilglicerol (dioleína) e 1,2,3-trioleilglicerol (trioleína).

A análise dos derivatizados foi feita através do cromatógrafo de gás com injetor *on-column*, forno com temperatura programável e detector de ionização por chama (FID) – CG2010 Shimadzu. Utilizou-se uma coluna capilar resistente a altas temperaturas (400°C) com: 100% dimetilpolisiloxano ou 95% dimetil-5 difenilpolisiloxano; 10 m, diâmetro interno: 0,32 mm, espessura do filme: 0,1mm

Gás Carreador: H<sub>2</sub>

Pressão = 35,5 KPa

Vazão = 4,23 mL/min

Velocidade linear = 80.03 cm/sec

Purga = 5,0 ml/min

Volume de injeção = 1 L

Temperatura do detetor = 380°C

Tempo de análise 42,14 min

Preparo da solução estoque N°1 - pesar 50 mg de 1,2,4 butanotriol em balão volumétrico de 50mL; avolumar com piridina.

Preparo da solução estoque N°2 - pesar 80 mg de 1,2,3 tricaproilglicerol em balão volumétrico de 10mL; avolumar com piridina.

Preparo da solução estoque N°3 - pesar 50 mg de 1,2,4 butanotriol e 400 mg de 1,2,3 tricaproilglicerol em balão volumétrico de 50mL; avolumar com piridina

Preparo da solução estoque de glicerol - pesar 50 mg de glicerol em balão volumétrico de 10mL; avolumar com piridina; transferir 1 mL dessa solução para balão de 10mL; avolumar com piridina.

Preparo da solução estoque de glicerídeos - pesar 50 mg cada glicerídeo de referência em balão volumétrico de 10mL; avolumar com piridina.

Soluções Padrão - em 4 vials numerados de 1 a 4, ou frascos de capacidade para 10mL, transferir com microseringa, os volumes de solução, conforme tabelas abaixo:

**Tabela 4:** Volumes das soluções adicionadas para medir as concentrações

Seringas	Solução glicerol μL	Solução monooleína μL	Solução dioleína μL	Solução trioleína μL	Solução Padrão Butanotriol μL	Solução Padrão Tricaprina μL
1	10	50	10	10	80	100
2	40	120	40	30	80	100
3	70	190	70	60	80	100
4	100	250	100	80	80	100

**Tabela 5:** Concentrações obtidas para os padrões.

	% glicerol (p/v)	% monooleína (p/v)	% dioleína (p/v)	% trioleína (p/v)	% Solução Padrão Butanotriol (p/v)	% solução Padrão Tricaprina (p/v)
1	0,019231	0,096154	0,019231	0,019231	0,153846	0,192308
2	0,04878	0,146341	0,04878	0,036585	0,097561	0,121951
3	0,061404	0,166667	0,061404	0,052632	0,070175	0,087719
4	0,070423	0,176056	0,070423	0,056338	0,056338	0,070423

Preparo da amostra – em frascos âmbar, pesou-se 0,1 g de óleo; adicionou-se 100 μL de solução estoque N° 3, 100 μL de MSTFA. Após repouso por 15 min, adicionou-se 8 mL de heptano; transferiu-se para *vial*. Deste *vial* a amostra foi coletada com seringa e injetada no GC.

### 3.2.5 Análise de Infravermelho de Transmissão

A análise foi feita em espectrofotômetro por transformada de Fourier Nicolet Magna-IR760, utilizando-se amostras de enzimas imobilizadas em PANI recém sintetizadas, na forma de pastilhas de KBr, na faixa de comprimento de onda que vai de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.6 Método BET (Brunauer-Emmett-Teller)

Este método prescreve a determinação da área superficial, volume de microporos e área de mesoporos. As amostras são, primeiramente, calcinadas a  $600 \pm 10^\circ\text{C}$  e, em seguida, degasadas a  $300^\circ\text{C}$  por 1 hora.

A isoterma de adsorção de nitrogênio é medida na faixa de pressões relativas ( $p/p_0$ ) entre 0,06 e 0,35. A área superficial multiponto-BET é calculada dos dados da isoterma na faixa de  $p/p_0 = 0,06 - 0,20$  o volume de microporos (MiPV) e área de mesoporos (MSA) são calculados na análise da curva  $t$  entre 3,3 e 5,4 ( $p/p_0 = 0,06 - 0,35$ ), onde  $t$  é a espessura da monocamada de nitrogênio gasoso adsorvido.

A aparelhagem utilizada para realizar estes testes consiste de:

- um analisador de área superficial – TriStar – Micromeritics;
- uma balança analítica com precisão de 0,1 mg, calibrada;
- um forno mufla à  $600 \pm 10^\circ\text{C}$  calibrado para pré-tratamento da amostra.

Os reagentes utilizados foram: Nitrogênio líquido; Nitrogênio gasoso A.P ou UP e Hélio gasoso, A.P ou UP.

As amostras de PANI e carvão ativado antes das imobilizações foram pesadas em cadinhos de porcelana e introduzidos na Mufla  $600^\circ\text{C}$ , onde foram calcinadas por 1 hora. Após a calcinação, as amostras foram transferidas para o dessecador. Após 15 minutos as amostras foram transferidas, para um tubo de vidro previamente tarado.

O tubo com as amostras foram transferidos para estação de tratamento e procedido o tratamento à  $300^\circ\text{C}$  sob vácuo.

### **3.3 Imobilizações da Lipozyme<sup>®</sup> TL 100 L**

#### **3.3.1 Imobilização em carvão ativado**

A imobilização em carvão ativado foi realizada colocando em contato com 1 g de carvão ativado pó (Limpatex), 30 mL de uma solução tampão fosfato pH 7,0 , 25mM contendo 0,225 ml\*\* da lipase Lipozyme TL 100 L. A mistura foi mantida em agitador orbital (150 rpm) a temperatura de 25°C por duas horas e meia (RODRIGUES, 2002).

Em seguida, separou-se o sobrenadante por filtração a vácuo. O derivado foi lavado com tampão fosfato e liofilizado por aproximadamente 1 hora.

A atividade de hidrólise foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima.

#### **3.3.2 Imobilização em Polianilina**

Em contato com 1 grama de suporte colocou-se 50 mL de tampão fosfato 0,1 mol, pH 6,0 com 0,225 ml de enzima.

A mistura foi colocada sob agitação (agitação magnética) leve por 2 horas a aproximadamente 4°C (banho de gelo). Após, a mistura foi filtrada a vácuo, o suporte foi lavado com tampão fosfato pH 6,0 e liofilizado por aproximadamente 1 hora (ANDRADE et al., 2008).

A atividade de hidrólise foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima.

#### **3.3.3 Imobilização em carvão ativado e em polianilina no ultrassom**

Nas imobilizações realizadas em banho de ultrassom, as quantidades de suporte, enzima, tempo de imobilização e temperatura foram idênticos aos realizados anteriormente, sendo a única diferença estarem sob ultrassom.

---

\* a quantidade de lipase adicionada foi calculada pela quantidade de proteína do extrato bruto (22,23 mg de proteína por ml). Assim, usou-se 5 mg de proteína para cada grama de suporte imobilizado.



### 3.3.4 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros carga de proteínas adsorvidas, atividade imobilizada teórica, atividade imobilizada real, retenção de atividade e eficiência de imobilização foram empregados para avaliar a imobilização de lipase comercial (Lipozyme® TL 100 L). A definição destes parâmetros, encontra-se a seguir (FREIRE et al., 1990).

#### *Carga de Proteínas adsorvidas*

Definida com sendo a diferença entre a quantidade de proteínas inicialmente colocadas em contato com o suporte e a quantidade de proteínas ao final da imobilização dividida pela massa de suporte empregado, Equação 4.

$$Carga_{ads} = \frac{[Ptn]_{t_0} \cdot V_{solução} - [Ptn]_{t_f} \cdot V_{solução}}{m_{sup\ porte}} \quad (4)$$

Onde:  $Carga_{ads}$  é a carga de proteínas adsorvida (mg/g);  $[Ptn]_{t_0}$  e  $[Ptn]_{t_f}$  correspondem à concentração de proteínas no início e ao fim do processo de imobilização, respectivamente (mg/mL);  $V$  é o volume da solução de enzimas (mL);  $m$  é a massa de suporte (g).

#### *Atividade imobilizada teórica*

A atividade hidrolítica imobilizada teórica foi definida como sendo a diferença entre a atividade da solução enzimática em contato com o suporte no início e ao término do processo de adsorção dividida pela quantidade de suporte empregada, equação 5.

$$A_{teórico} = \frac{A_H|_{t_0} - A_H|_{t_f}}{m_{sup\ porte}} \quad (5)$$

Onde :  $A_{\text{teórico}}$  é atividade imobilizada teórica (U<sub>H</sub>/g);  $A_H|_{t_0}$  e  $A_H|_{t_f}$  correspondem à atividade hidrolítica no início e ao fim do processo de imobilização, respectivamente (mg/mL);  $m_{\text{suporte}}$  é a massa de suporte (g).

#### *Atividade imobilizada real*

A atividade imobilizada real ( $A_{\text{real}}$ ) foi determinada utilizando o suporte imobilizado e a metodologia descrita no item 3.2.3.

#### *Retenção de atividade*

A retenção de atividade foi definida como a relação percentual entre as atividades hidrolíticas imobilizadas real e teórica, Equação 6.

$$R_{\text{ativ}} = \frac{A_{\text{real}}}{A_{\text{teórica}}} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:  $R_{\text{ativ}}$  é a retenção de atividade (%);  $A_{\text{teórica}}$  e  $A_{\text{real}}$  correspondem à atividade hidrolítica teórica e real, respectivamente (U<sub>H</sub>/g).

#### *Eficiência de imobilização*

A Eficiência de imobilização foi definida como sendo a relação percentual entre a concentração de proteínas do sobrenadante no início e ao final do processo de imobilização, Equação 7.

$$E_{\text{imob}} = \frac{[Ptn]_{t_0} - [Ptn]_{t_f}}{[Ptn]_{t_0}} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:  $E_{\text{imob}}$  é a Eficiência de imobilização (%);  $[PTN]_{t_0}$  e  $[PTN]_{t_f}$  correspondem à concentração de proteínas no início e ao fim do processo de imobilização, respectivamente (mg/mL)

### **3.4 Hidrólise do óleo de palma com Lipozyme<sup>®</sup> TL IM e Lipozyme<sup>®</sup> TL 100 L imobilizada em carvão ativado e em polianilina**

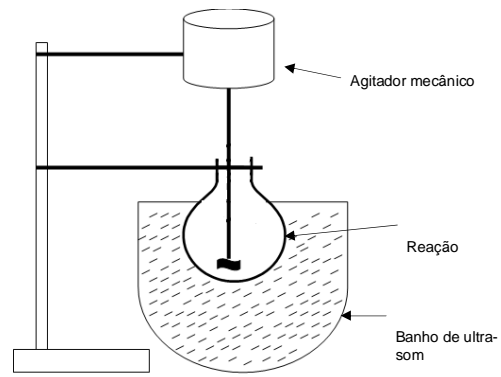
#### **3.4.1 Reações de hidrólise em reator de vidro**

As reações de hidrólise foram feitas adicionando-se a um reator de vidro encamisado 5g do óleo de palma. A quantidade de enzima utilizada variou entre 1, 2 e 3% em peso da enzima e 0,25 mL de água. Todas as reações foram deixadas sob agitação por um período de até 24 horas e mantidas a temperatura constante através de um banho termostatizado. Após este tempo, foi adicionado ao meio reacional 10 mL de n-hexano e a solução lavada sucessivamente com água e solução saturada de Cloreto de Amônio. A fase orgânica foi concentrada em um evaporador rotatório. O amostra obtido foi analisado por GC (CHEONG et al., 2007).

Reações preliminares foram realizadas com agitação magnética dentro dos reatores de vidro, utilizando a mesma metodologia.

#### **3.4.2 Reações de hidrólise em banho de ultrassom**

As reações de hidrólise foram feitas adicionando-se a um balão, 5g do óleo de palma. A quantidade de enzima utilizada variou entre 1, 2 e 3% em peso da enzima e 0,25 mL de água. Todas as reações foram deixadas sob agitação, com agitador mecânico, por um período de até 6 horas e mantidas a temperatura do banho de ultrassom (aproximadamente 58°C), Figura 10. Após este tempo, foi adicionado ao meio reacional 10 mL de n-hexano e a solução lavada sucessivamente com água e solução saturada de cloreto de amônio. A fase orgânica foi concentrada em um evaporador rotatório e a amostra obtida foi analisada por CG.



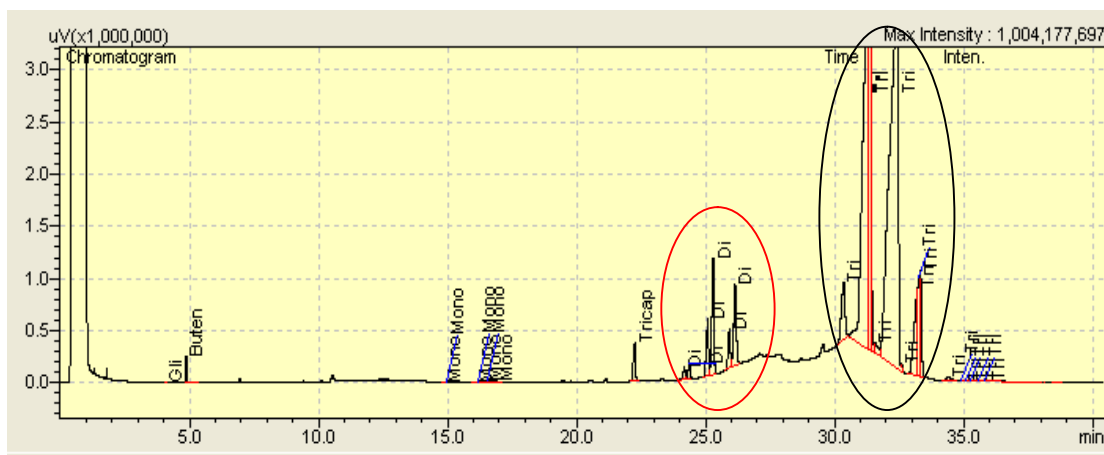
**Figura 10:** Esquema das reações de hidrólise em banho de ultrassom.

## 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na produção de diacilglicerol a partir da hidrólise enzimática de óleo de palma utilizando a lipase imobilizada comercial Lipozyme<sup>®</sup> TL IM e lipase livre Lipozyme<sup>®</sup> TL100L imobilizada por adsorção, em carvão ativado e em polianilina.

### 4.1 Testes Preliminares

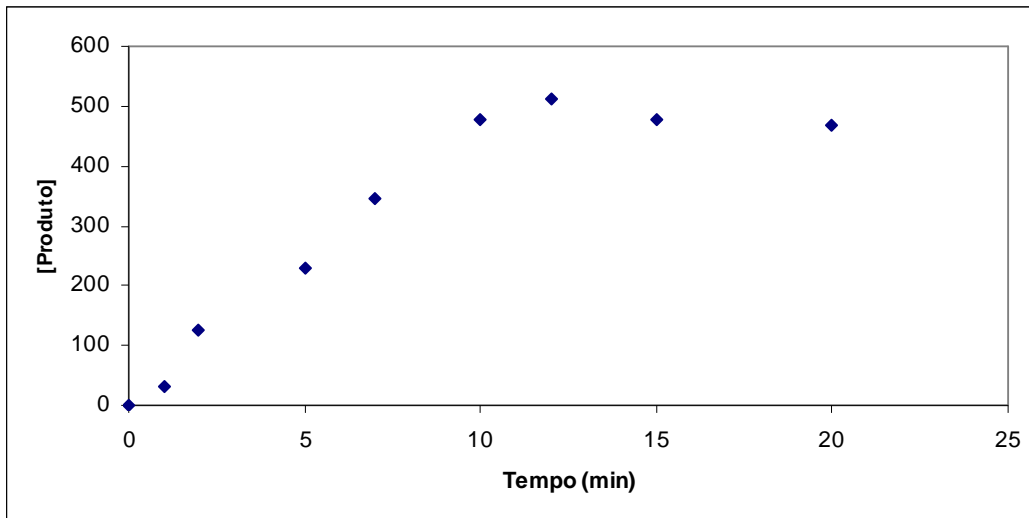
O óleo de palma refinado utilizado como substrato, foi analisado por CG/EM, o cromatograma obtido pode ser observado no Cromatograma 1.



**Cromatograma 1:** Cromatograma do óleo de palma refinado.

É possível observar, no Cromatograma 1, na área marcada, a presença de maior quantidade de triacilglicerol. Quantitativamente a análise revelou 94,05% de triacilglicerol, 5,74% de diacilglicerol e 0,17% de monoacilglicerol. A acidez encontrada para o óleo refinado foi de 0,034%, estando assim, de acordo com as especificações apresentadas pela indústria fornecedora do óleo, Tabela 3 (Item 3.1.3, pág 34).

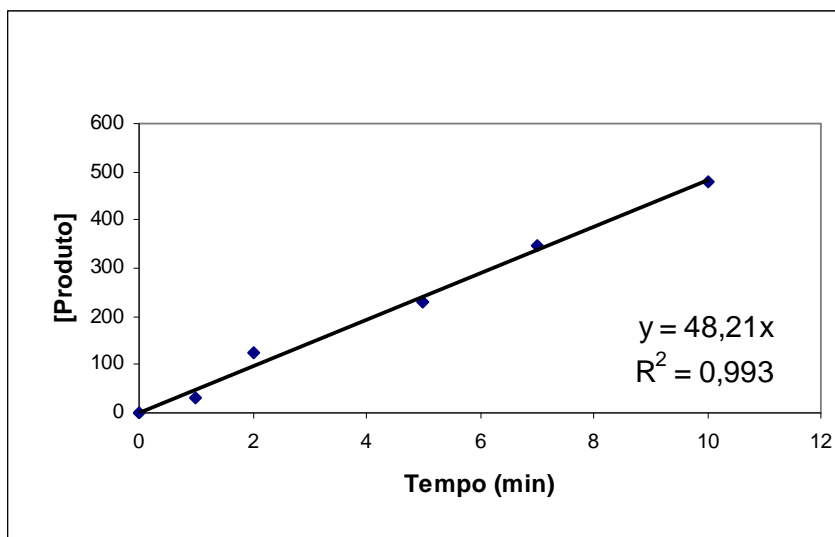
A cinética para a lipase comercial imobilizada Lipozyme<sup>®</sup> TL IM, na reação de hidrólise do óleo de oliva, conforme metodologia descrita no item 3.2.1 encontra-se a seguir na Figura 11. A formação de produtos que foi determinada nos tempos de 1 a 20 minutos, para cálculo da velocidade inicial da reação.



**Figura 11:** Formação de produto em relação ao tempo da lipase Lipozyme® TL IM.

Como a velocidade inicial da reação é determinada pela faixa linear da formação de produtos, é possível observar no Gráfico 1, que o perfil cinético da reação de hidrólise do óleo de oliva catalisada pela Lipozyme® TL IM imobilizada, revelou que até 10 minutos a reação ainda estava em condições de velocidade inicial, e que, portanto, a titulação da reação em 5 minutos era representativa da atividade hidrolítica. Assim a atividade hidrolítica encontrada para a lipase comercial imobilizada Lipozyme® TL IM em 5 minutos foi de 1192,78 U<sub>H</sub>/g.

A atividade hidrolítica da lipase manteve-se em torno deste valor, durante o seu uso nas reações de hidrólise.



**Gráfico 1:** Velocidade inicial da lipase imobilizada Lipozyme® TL IM.

## 4.2 Reações de hidrólise com Lipozyme® TL IM

### 4.2.1 Banho Termostatizado

Começamos então o estudo da reação de hidrólise do óleo de palma. Utilizando a lipase comercial imobilizada Lipozyme® TL IM em reações preliminares foram realizadas sob controle de temperatura de banhos termostatizados utilizando agitação magnética e variando a porcentagem de enzima. A Tabela 6 apresenta de forma quantitativa os resultados obtidos destas primeiras reações.

**Tabela 6:** Resultados quantitativos das reações com agitação magnética

Experimentos	Enzima (% p/v)	% Acidez	% MAG	% DAG	% TAG
1	2	24	1,5	25	48
2	3	26	1,2	26	46

É possível observar que utilizando a mesma temperatura e variando a quantidade de enzima adicionada na reação, não é observado uma grande variação no rendimento de DAG, pode-se dizer que quantitativamente os resultados apresentados na Tabela 6, estão próximos, levando em consideração possíveis pequenos erros de análise.

Tendo em vista que, numa escala maior a agitação magnética torna-se difícil de ser utilizada. Decidiu-se avaliar o comportamento do sistema reacional com agitação mecânica. As reações a seguir, apresentadas na Tabela 7, foram realizadas a 1300 rpm, utilizando 1% de enzima e variando somente a temperatura.

Como os resultados anteriores (Tabela 6) foram bons optou-se por diminuir a quantidade de enzima empregada, para observar se os resultados seriam satisfatórios. Passou-se a usar, então, nas reações a seguir, 1% de enzima em relação a quantidade de óleo.

**Tabela 7:** Resultados obtidos das reações realizadas com 1% de enzima, agitação mecânica, 24 horas e 1300 rpm.

<b>Experimentos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
<b><u>1</u></b>	<b><u>40°C</u></b>	<b><u>36</u></b>	<b><u>0,5</u></b>	<b><u>15</u></b>	<b><u>48</u></b>
2	50°C	5	0,3	7	88
3	55°C	15	1	16	68
4	60°C	25	0,6	14	61

A partir dos primeiros resultados obtidos com a agitação mecânica, é possível observar que ocorre formação de DAG com a utilização de 1 % de enzima (Experimentos 2 a 4, Tabela 7). A reação a 40°C é de difícil reprodução devido a alta viscosidade do óleo e deve ser desconsiderada. O aumento de temperatura leva a formação de DAG até aproximadamente 15% (Tabela 7).

Na busca de um resultado quantitativo de DAG, continuou-se a utilizar 1% de enzima nos próximos ensaios variando a agitação e mantendo a temperatura de 60°C e o tempo de reação de 24 horas constantes e os resultados quantitativos destas reações podem ser observados na Tabela 8. A temperatura de 60°C porque a partir desta temperatura o óleo de palma encontra-se totalmente na forma líquida.



**Tabela 8:** Resultados obtidos nas reações com 1% de enzima, 60°C, 24 horas e variação na agitação.

<b>Experimentos</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1300	25	0,6	14	61
2	1000	19	1	18	62
3	700	16	0,3	16	68
4	400	13	0,3	16	70

Baseado nos resultados da Tabela 8, observar que a agitação menos vigorosa influenciou em alguns aspectos das reações. Nota-se uma diminuição na acidez com uma agitação menos vigorosa, e um ligeiro aumento no rendimento de DAG.

Buscando ainda uma otimização da quantidade de enzima utilizada, foram realizadas reações com 0,5% de enzima à 60°C e tempo de reação de 24 horas, com variação na agitação (Tabela 9).

**Tabela 9:** Resultados obtidos nas reações com 0,5% de enzima, 60°C, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação.

<b>Experimentos</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1300	31	0,3	14	54
2	1000	20	1	19	59
3	700	17	0,7	17	65
4	400	13	0,5	15	72

Novamente pode-se observar que a agitação influenciou o índice de acidez, provocando uma diminuição do índice de acidez com a diminuição da agitação. Também observou-se como na reações anteriores (Tabela 8), um ligeiro aumento no rendimento de DAG com agitação em torno de 1000 rpm.

Após esta avaliação inicial, onde buscou-se observar o efeito da concentração relativa de enzima, da agitação e da temperatura do sistema reacional na reação de hidrólise do óleo de palma, optou-se por utilizar 2% de enzima (Experimentos 1, Tabela 6) para a realização dos experimentos já que . esta concentração leva, relativamente a rendimentos ligeiramente maiores.

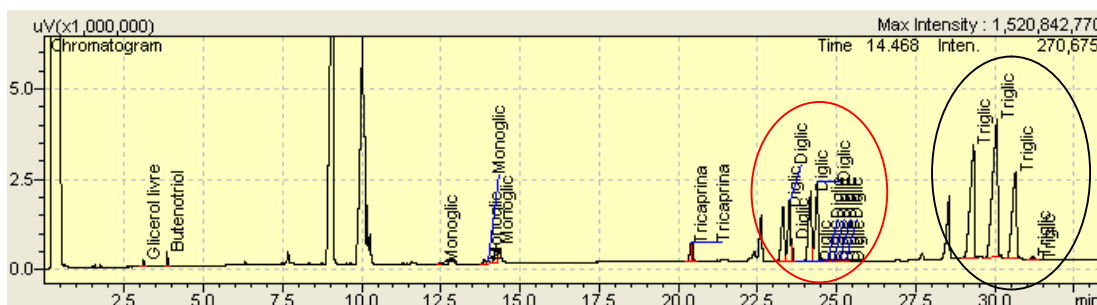


Os resultados apresentados a seguir (Tabela 11) são de reações realizadas em temperatura de 50°C, 2% de enzima, 24 horas de reação e variação na agitação.

**Tabela 11:** Rendimento das reações realizadas á 50°C, 2% de enzima, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação.

Experimentos	Agitação (rpm)	% Acidez	% MAG	% DAG	% TAG
1	1300	31	0,5	16	52
2	1000	30	0,5	15	53
3	700	22	0,4	16	62
4	400	36	0,7	15	47

Nas reações realizadas a 50°C, pode-se dizer que independente da agitação empregada ocorreu baixa variação no rendimento de DAG. Considerando o fato de que o óleo está parcialmente sólido, os rendimentos são razoáveis e situam-se em torno de 15%. Embora salientando que o Experimento 4 não deva ser muito reprodutível, sob uma menor agitação, 400 rpm, a quantidade de TAG foi a menor, 47%. O Cromatograma 3, apresenta o resultado do Experimento 4 da Tabela 11.



**Cromatograma 3:** Cromatograma da reação realizada a 50°C, 2% de enzima, 24 horas de reação e agitação de 400 rpm.

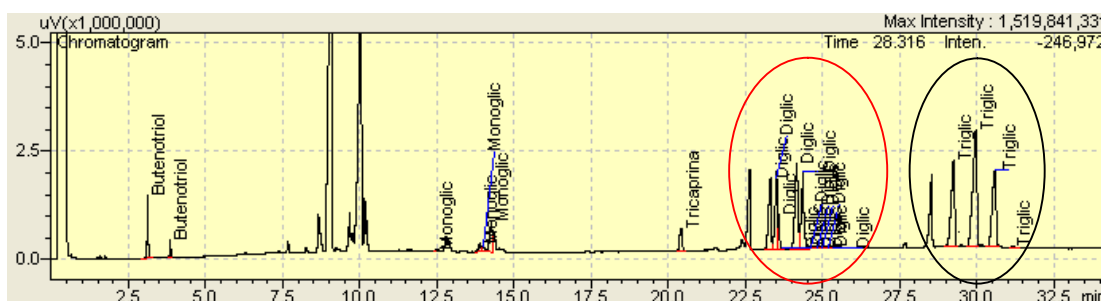
Este cromatograma nos apresenta picos bem menores de DAG, comparados aos apresentados pelo cromatograma da Figura 14, devido a este decréscimo no rendimento de DAG, observado entre o Experimento 3, Tabela 10, 26% e o Experimento 4, Tabela 11, 15%.

A temperatura de 40°C também foi testada, embora com reservas devido aos problemas resultantes da transferência de massa devido a alta viscosidade do substrato e presença de sólidos (Tabela 12).

**Tabela 12:** Rendimento das reações realizadas à 40°C, 2% de enzima, tempo de reação de 24 horas e variação na agitação.

Experimentos	Agitação (rpm)	% Acidez	% MAG	% DAG	% TAG
1	1300	27	1,5	23	48
2	1000	26	1	15	57
3	700	23,	0,7	15	61
4	400	24	0,8	16	59

Na Tabela 12 pode-se verificar uma tendência a estabilização do rendimento de DAG em torno de 15%. Sob maiores agitações é possível que tenha havido uma melhor transferência de massa (Experimento 1).



**Cromatograma 4:** Cromatograma da reação realizada a 40°C, 2% de enzima, 24 horas de reação e agitação de 1300 rpm.

Os resultados discutidos acima mostram que a condição que apresentou melhor rendimento de DAG foi o Experimento 3, Tabela 10, onde 26% foi obtido com uma agitação de 700 rpm e 60°C. Outras condições também apresentaram bons rendimentos como o Experimento 1 das Tabelas 10 e 12 e o Experimento 4 da Tabela 10.

O resultado obtido (Experimento 3, Tabela 10) foi então tomado como ponto de partida para as próximas etapas do trabalho.

Os resultados obtidos até o momento estão de acordo com trabalhos similares da literatura. Por exemplo, ZANGH *et al* (2001) utilizaram esta mesma lipase para a produção de gordura de margarina em sistemas livres

de solventes. Os autores obtiveram seus melhores resultados a 60°C e 700 rpm (ZHANG et al., 2001).

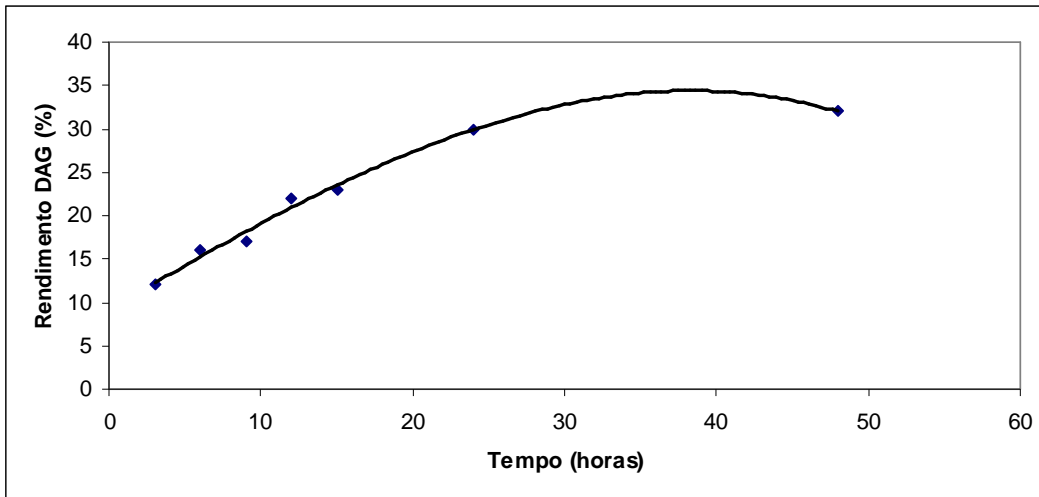
Visto que até o momento não havíamos modificado a variável tempo, realizamos o acompanhamento da reação, na qual reações de hidrólise com a lipase Lipozyme®TL IM, eram isoladas a cada três horas até o tempo máximo de 24 horas. As condições reacionais utilizadas foram agitação de 700 rpm e 60°C. Os resultados obtidos nestas reações podem ser observados na Tabela 13.

**Tabela 13:** Resultados quantitativos do acompanhamento da reação de hidrólise.

<b>Experimento</b>	<b>Tempo</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	3 h	22	0,8	12	66
2	6 h	20	0,6	16	63
3	9 h	19	0,6	17	63
4	12 h	14	2	22	62
5	15 h	19	2	22	57
6	18 h	17	0,8	20	62
7	21 h	19	0,6	16	63
8	24 h	19	2,6	30	48
9	48 h	19	2,5	32	47

Os resultados obtidos na Tabela 13 mostram que o rendimento em DAG aumenta com o tempo de reação. O tempo de reação de 24 horas (Experimento 8) pode ser considerado o de melhor rendimento de DAG. Apesar de o tempo de 48 horas apresentar um ligeiro acréscimo no rendimento de DAG, este aumento de não justifica o ligeiro incremento de rendimento obtido. Operacionalmente, a partir de 6 horas de reação observa-se pouca variação na quantidade de DAG. Entre 12 e 18 horas (Experimentos 4, 5 e 6) os rendimentos de DAG se mantiveram constantes, apresentando baixas variações.

O acompanhamento da reação de hidrólise com o tempo pode ser observado melhor na Figura 12.



**Figura 12:** Perfil do acompanhamento da reação de hidrólise pela lipase Lipozyme®TL IM: rendimento de DAG em relação ao tempo.

#### 4.2.2 Banho de ultrassom

O efeito do ultrassom em meio aquoso e bifásico aumenta o rendimento e a velocidade das reações (SILVA et al., 2005). Os efeitos físicos do ultrassom que devem ser considerados em processos biotecnológicos são o aumento da temperatura, a melhor transferência de massa, a cavitação estável e a transitória. A cavitação deve ser considerada como um tópico complexo e a questão de como a cavitação leva a alta energia química é de primordial importância para se obter o máximo proveito de sua aplicação. A cavitação transitória é indesejável em processos biotecnológicos, uma vez que causa um aumento da temperatura e pressão que certamente desintegraria as células ou desnaturaria as enzimas. A cavitação estável, na qual bolhas oscilam de um modo regular induzindo ao seu redor uma micro correnteza que afeta algumas partículas diminuindo o estresse, deve ser analisado visando sua aplicação em bioquímica e biotecnologia (SINISTERRA, 1992).

A literatura traz relatos de que a utilização do ultrassom em reações químicas possui algumas vantagens, entre elas: redução do tempo de reação; redução da quantidade de reagentes; aumento de rendimento;

seletividade; favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais (MARTINEZ et al., 2000).

Para avaliar o efeito do ultrassom nas reações de hidrólise do óleo de palma catalisada pela lipase Lipozyme<sup>®</sup>TL IM, alguns ensaios foram efetuados. Mantendo a agitação mecânica (700 rpm) dentro do frasco de vidro, e este dentro do ultrassom. A temperatura do banho foi fixada em 58°C.

Para avaliar o efeito da irradiação de ultrassom nas reações de hidrólise do óleo de palma catalisada pela enzima Lipozyme<sup>®</sup>TL IM, foram utilizadas as melhores condições encontradas anteriormente. Na Tabela 14 é possível observar os resultados quantitativos das reações realizadas sob ultrassom, utilizando 2% de enzima e variando-se o tempo de reação.

**Tabela 14:** Resultados das reações realizadas no ultrassom com 2% de enzima a 700 rpm e com variação do tempo reacional.

<b>Experimentos</b>	<b>Tempo</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1 h	14	3	35	47
2	1h 30 min	29	2	26	42
3	2 h	18	3	25	52
4	3 h	27	2	18	53
5	4h 30 min	27	1	16	55
6	6 h	19	1	14	66

Observa-se que o rendimento de DAG no ultrassom foi maior no tempo de 1h.

Os resultados obtidos aqui estão de acordo com avaliações similares da literatura como o trabalho de Liu *et al* (2008), onde os pesquisadores concluíram que na hidrólise do óleo de soja em sistema livre de solvente o rendimento das reações foram aumentados em 94% (1 h), 64% (2 h), 58% (3 h), 41% (4 h) e 34% (5 h) a mais do que nas condições de agitação em banho termostático, devido ao ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima (LIU et al., 2008).

O aumento do tempo da reação no ultrassom levou a uma diminuição no rendimento de DAG. Este resultado é de difícil interpretação. Provavelmente este sistema desnatura a enzima e sob as condições de ultrassom haja uma tendência ao equilíbrio químico. Porém, estes efeitos não foram explorados neste trabalho.

Ainda avaliando o efeito da irradiação de ultrassom, foram feitos testes controlando a temperatura do banho com a adição de gelo e mantendo-a aproximadamente à 30°C e diminuindo a agitação para 150 rpm, Tabela 15.

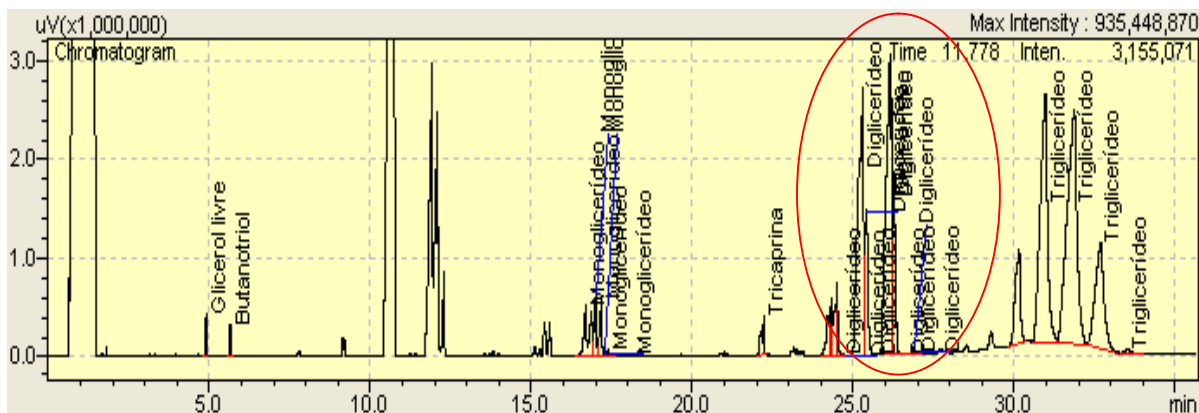
**Tabela 15:** Resultados das reações no ultrassom, 150 rpm e temperatura controlada (30°C).

<b>Experimentos</b>	<b>Tempo</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1 h	21	3	34	41
2	1h 30 min	33	9	48	9
3	2 h	23	3	44	29
4	3 h	28	1	22	49
5	4h 30 min	26	1	24	49
6	6 h	27	1	20	51

Novamente os melhores rendimentos em DAG foram obtidos em menores tempos de reação.

Abaixo esta apresentado o Cromatograma 5 da reação com melhor rendimento de DAG.





**Cromatograma 5:** Cromatograma da reação com melhor rendimento, Experimento 2, Tabela 15.

WEN et al (2006) usaram ultrassom para acelerar a esterificação do ácido palmítico com vitamina C na presença de ácido sulfúrico para obter palmitato de L-ascorbila e reduziram o tempo de reação de 36 horas para 2 horas aumentando o rendimento de 85% para 93%. Os autores concluíram que a aceleração da reação com o uso do ultrassom se deve ao fenômeno de cavitação, pois este acelera a transferência de massa e reforça o contato entre os reagentes. Ainda relata que a temperatura da reação é controlada pela água que circula em torno do reator, e a energia de cavitação é transferida para o reator através da água e que a temperatura entre 30 e 35°C seria a melhor para o máximo de cavitação em água (WEN et al., 2007).

Portanto, o melhor rendimento de DAG ter sido em banho de ultrassom com temperatura controlada, pode ser explicado pelo fato de a intensidade da cavitação, ser favorecida pelas temperaturas baixas. O aumento da temperatura reduz a intensidade do colapso, isto pode ser devido ao aumento da pressão de vapor e à difusão de vapor para o interior da bolha (INCE et al., 2001).

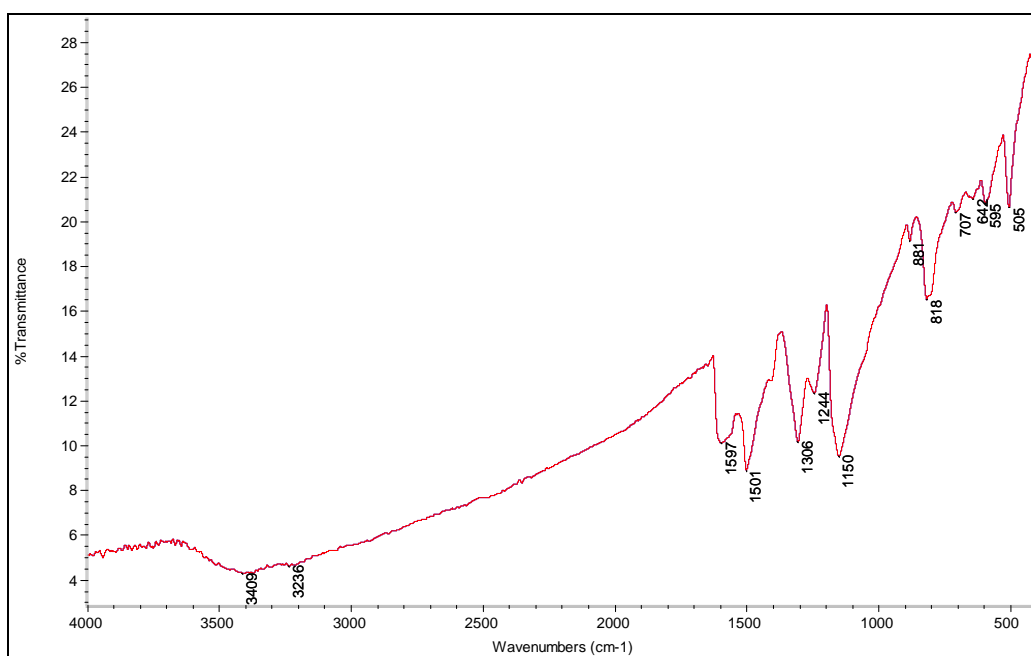
### **4.3 Imobilizações da lipase *Lipozyme*<sup>®</sup> TL 100 L**

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante para a obtenção de biocatalisadores com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo em comparação à sua forma livre. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande

disponibilidade e baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam cofatores e ampla especificidade para substratos (DALLA – VECCHIA, 2004).

Com o intuito de tornar o processo mais barato com o uso do biocatalisador, foram feitos testes com a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosa*, imobilizada no laboratório, nas reações de hidrólise do óleo de palma. Dois suportes foram utilizados na imobilização: carvão ativado e polianilina (sintetizada no laboratório).

Na Figura 13 é mostrado o espectro de infravermelho obtido para o polímero sintetizado. Hagiwara *et al* (1988) e Tang *et al* (1988) analisando espectros de infravermelho desses polímeros (polianilinas), destacam as bandas  $3444\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento N-H, a  $1588\text{ cm}^{-1}$  relacionada a estrutura quinóide,  $1544\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento de anel benzeno e a banda a  $1140\text{ cm}^{-1}$  relacionada ao grau de protonação (ZHANG *et al.*, 2001 e SILVA *et al.*, 2005).



**Figura 13:** Espectro de infravermelho da polianilina.

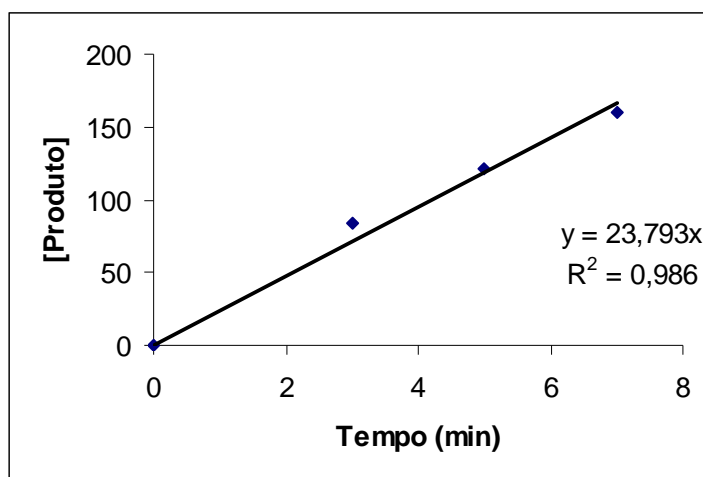
A PANI sintetizada para este trabalho encontra-se em estado de oxidação intermediário, apresentando todas as características do composto p-polifenilenoaminaimina, na sua forma de sal, amplamente conhecida como

cloridrato de poliesmeraldina. Este composto tem a unidade repetitiva 50% oxidada e 50% reduzida (WEN et al., 2007).

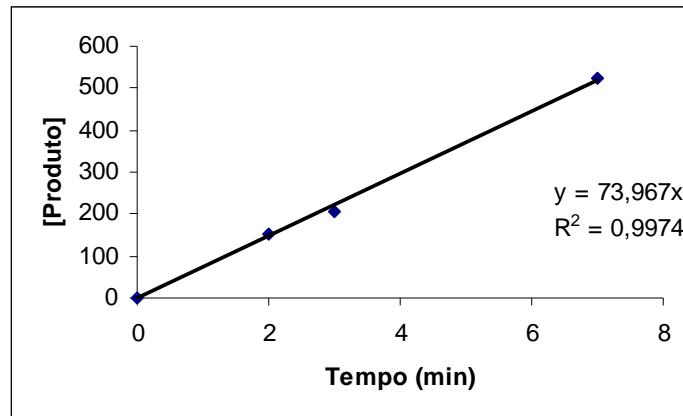
O carvão ativado utilizado para este trabalho encontrava-se na forma de pó.

A quantidade de proteína da preparação comercial da lipase livre de origem microbiana *Thermomyces lanuginosus* também foi determinada. A preparação continha 22,23 mg de proteína por mL.

Antes de partir para as imobilizações, determinou-se o perfil cinético da reação de hidrólise do óleo de oliva catalisada pela Lipozyme<sup>®</sup> TL 100L, com quantidades diferentes de proteínas (0,07 e 4,36 mg/ml) revelando que até cerca de 7 minutos a reação ainda estava em condição de velocidade inicial e que portanto a titulação da reação em 5 minutos era representativa da atividade enzimática, Gráficos 4 e 5.



**Gráfico 2:** Gráfico de velocidade inicial da reação de hidrólise com óleo de oliva usando-se a enzima livre Lipozyme<sup>®</sup> TL100L contendo 0,07 mg de proteínas.



**Gráfico 3:** Gráfico de velocidade inicial da reação de hidrólise com óleo de oliva, usando-se a enzima livre Lipozyme<sup>®</sup>TL100L contendo 4,36 mg de proteínas.

Partiu-se para as imobilizações por adsorção em carvão ativado e em polianilina. O procedimento de adsorção de proteínas é muito simples e um dos métodos mais utilizados. A enzima imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras (DALLA – VECCHIA, 2004).

A imobilização em carvão ativado foi realizada a temperatura de 25°C em agitador orbital e em banho de ultrassom, sendo que os tempos de contato entre a solução de enzima e o suporte foram os mesmos em ambos os casos, agitador e ultrassom. Assim, como a imobilização em polianilina foi realizada sob agitação magnética e em banho de ultrassom. Os resultados das imobilizações podem ser observados na Tabela 16.

**Tabela 16:** Resultados dos parâmetros avaliados nas imobilizações.

<b>Imobilizações</b>	<b>Carga adsorvida mg/g</b>	<b>Atividade imobilizada teórica U<sub>H</sub>/g</b>	<b>Retenção atividade real %</b>	<b>Eficiência imobilização PTN %</b>	<b>Atividade imobilizada real U<sub>H</sub>/g</b>
PANI *	5,51	118,12	92,54	99,29	<b>109,32</b>
PANI ultrassom	4,78	158	45,56	90,01	<b>72</b>
Carvão**	4,73	289,27	50,60	98,99	<b>146,38</b>
Carvão ultrassom	4,48	198,5	51,57	99,65	<b>102,38</b>

\* polianilina imobilizada sob agitação magnética

\*\* carvão imobilizado em agitador orbital.

A PANI imobilizada sob agitação magnética foi o suporte que apresentou melhor desempenho, observando a carga de proteína adsorvida e a retenção de atividade, pois a atividade hidrolítica real ficou bem próxima da atividade hidrolítica teórica. Porém, quando o suporte usado foi o carvão ativado imobilizado em agitador orbital, observa-se uma maior atividade hidrolítica do suporte, sendo possível dizer que nesta imobilização a lipase apresentou melhor atividade.

Considerando que na solução inicial de enzima havia em torno de 5 mg de ptn por grama de suporte utilizado na imobilização, observa-se que em todas as imobilizações houve uma adsorção de praticamente toda a proteína oferecida, por isso a eficiência da imobilização com relação as proteínas adsorvidas, mostrou-se muito boa neste sentido, ficando próxima de 100% em todos os casos.

Os catalisadores são materiais altamente complexos. Um problema básico em Catálise consiste em correlacionar o comportamento catalítico de um material e as suas propriedades.

Por isso neste trabalho determinou-se a área superficial, volume de microporos e área de mesoporos dos catalisadores utilizados (polianilina e carvão ativado), seguindo o método de BET, descrito no item 3.3.8.

Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 17.

**Tabela 17:** Resultados da análise BET dos catalisadores.

<b>Suporte</b>	<b>Área Superficial BET m<sup>2</sup>/g</b>	<b>Área do poro m<sup>2</sup>/g</b>	<b>Área superfície externa m<sup>2</sup>/g</b>	<b>Volume de poro cm<sup>3</sup>/g</b>
Polianilina	360.4821	264.0794	96.4027	0.123383
Carvão ativado	531.6092	354.7960	176.8132	0.169662

Observa-se que o carvão ativado apresenta uma área superficial bem maior do que a polianilina. Provavelmente, esta maior área está relacionada a uma maior eficiência de imobilização.

#### **4.4 Reações de hidrólise com Lipozyme<sup>®</sup> TL 100 L imobilizada neste trabalho**

Com as enzimas imobilizadas neste trabalho, foram realizados testes nas reações de hidrólise do óleo de palma.

Na Tabela 18, os resultados das reações de hidrólise com o suporte carvão ativado, podem ser observados. Os parâmetros para estas reações foram definidos a partir dos melhores resultados com a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup>TL IM, apresentados anteriormente. A quantidade de suporte imobilizado adicionado a reação variou entre 1, 2, 5 e 10% em relação a quantidade de óleo e foram utilizadas as agitações de 1300 e 700 rpm.

**Tabela 18:** Reações com Lipozyme<sup>®</sup> TL 100L imobilizada em carvão ativado em agitador.

<b>Experimentos</b>	<b>ESup* (p/V)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Agitação</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1	24 h	1300	8	0,41	10	81
2	1	24 h	700	10	0,7	16	73
3	2	24 h	700	13	0,5	17	69
4	5	24 h	700	4	0,5	20	77
5	10	24 h	700	5	0,3	20	74

\* quantidade de enzima suportada.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 18, observar que os índices de acidez nestas reações mostraram-se bem inferiores em relação às reações mostradas anteriormente com a lipase comercial imobilizada. A agitação de 1300 rpm (Experimento 1) não contribuiu de forma positiva no rendimento de DAG, quando comparada com a agitação de 700 rpm. Assim, como nas reações com a enzima comercial, a quantidade de 2% de enzima mostrou um aumento no rendimento de DAG. Testes com 5 e 10% de enzima em relação à quantidade de óleo também foram feitos, estes mostraram um aumento para 20% de DAG, o que demonstra o efeito do aumento da concentração real de enzima.

As reações com a enzima imobilizada em carvão ativado no banho de ultrassom foram testadas em reatores de vidro com banho termostaticado a 60°C, e somente com 1 e 2% (Tabela 19).

**Tabela 19:** Resultados quantitativos das reações em banho termostaticado, com suporte imobilizado em banho de ultrassom.

Experimentos	Enzima	Tempo	Agitação	%	%	%	%
				Acidez	MAG	DAG	TAG
1	1%	24 h	700	4	0,3	9	87
2	2%	24 h	700	5	0,4	12	82

Observa-se que os resultados para DAG foram maiores nas reações em que o suporte carvão ativado foi imobilizado em agitador orbital (Tabela 18).

Como para a enzima comercial Lipozyme<sup>®</sup>TL IM, os resultados das reações realizadas em banho de ultrassom foram superiores a aqueles obtidos nas reações sob aquecimento, aplicamos a melhor condição para reações de hidrólise com o suporte imobilizado carvão ativado em agitador orbital. As seguintes reações apresentadas na Tabela 20 foram feitas com base nas condições apresentadas na Tabela 15, Experimento 1.

**Tabela 20:** Resultados das reações de hidrólise realizadas em banho de ultrassom, com lipase imobilizada em carvão ativado em agitador orbital.

<b>Experimentos</b>	<b>Enzima (% p/v)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Agitação</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1	1 h 30 min	150 rpm	0,4	0,1	4	95
2	2	1 h 30 min	150 rpm	1,6	0,2	5	93
3	5	1 h 30 min	150 rpm	12	1,4	23	64
4	10	1 h 30 min	150 rpm	13	1,4	26	59

Pode observar que com cargas de 5 e 10% os rendimentos de DAG situam-se na faixa de 23 a 26%, o que é um excelente resultado considerando o baixo custo do suporte.

A avaliação da lipase imobilizada em PANI com agitação magnética. Nas reações de hidrólise, foram realizadas em reatores de vidro, acoplados a um banho termostatizado, utilizando a temperatura de 60°C.

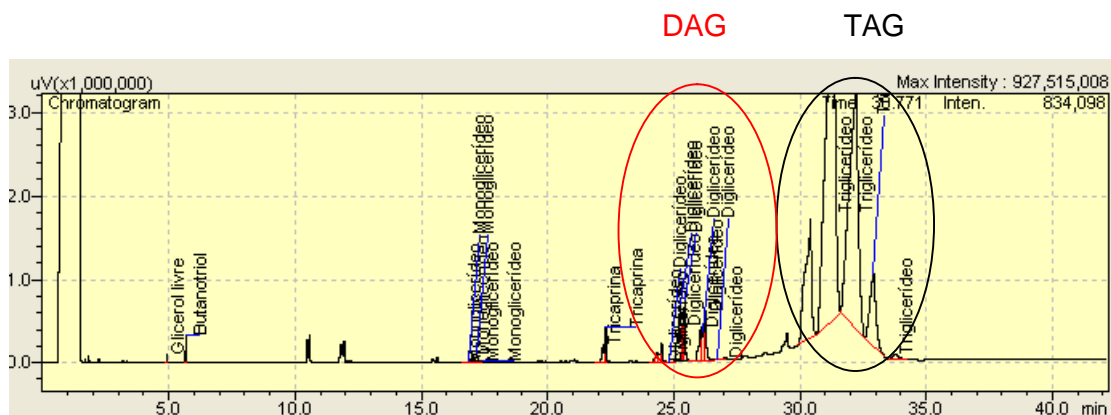
**Tabela 21:** Resultados das reações em banhos termostatizados com a lipase imobilizada em PANI com agitação magnética.

<b>Experimentos</b>	<b>Enzima (% p/v)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Agitação rpm</b>	<b>% Acidez</b>	<b>% MAG</b>	<b>% DAG</b>	<b>% TAG</b>
1	1	24 h	700	0,9	0,2	5,	94
2	1	6 h	700	0,7	0,2	5	94
3	2	24 h	700	1	0,3	5	93
4	2	6 h	700	2	0,4	4	94
5	5	24 h	700	-	0,3	8	92
6	10	24 h	700	2,5	0,3	8	90

A enzima imobilizada em PANI mostrou através dos resultados obtidos (Tabela 21) não ser eficiente na produção de DAG.



Observa-se que os rendimentos de DAG ficaram entre 3 e 8%, muito abaixo do que foi observado com carvão. Abaixo pode-se observar o Cromatograma 6, do Experimento 3, Tabela 21, como exemplo.



**Cromatograma 6:** Cromatograma Experimento 3, Tabela 18.

Também foi testada a enzima imobilizada sob agitação magnética em reações sob ultrassom, com temperatura controlada, para reproduzir o mesma condição utilizada na reação que se obteve melhor rendimento de DAG, Tabela 15, Experimento 1.

**Tabela 22:** Resultados das reações de hidrólise realizadas em banho de ultrassom, com lipase imobilizada em PANI com agitação magnética.

Experimentos	Enzima (% p/v)	Tempo	Agitação	% Acidez	% MAG	% DAG	% TAG
1	1	1h 30 min	700 rpm	4	0,3	7	89
2	2	1h 30 min	700 rpm	3	0,3	7	90
3	5	1h 30 min	700 rpm	-	0,2	7	93
4	10	1h 30 min	700 rpm	-	0,2	4	96

Embora ainda muito baixos, de acordo com os resultados obtidos na Tabela 22, e comparando-os com os resultados da Tabela 21, novamente as

reações realizadas em banho de ultrassom mostraram um rendimento superior aquelas realizadas em banho termostatizado. Neste caso, a concentração de enzima não causou uma variação nos resultados como pode ser observado, Experimento 1, 2 e 3, Tabela 22.

## 5. Conclusões

Tendo como perspectiva a utilização das lipases na modificação de óleos e gorduras um estudo preliminar das reações de hidrólise sob diferentes condições foi realizado. Como apresentado no capítulo anterior, este estudo permitiu a comparação da reação de hidrólise do óleo de palma com o uso de uma lipase comercial e de uma lipase imobilizada no laboratório.

De acordo com o estudo realizado neste trabalho algumas conclusões podem ser apresentadas:

- Para 2% de enzima Lipozyme TL IM 60°C, 700 rpm os melhores rendimentos em DAG, foram obtidos chegando a 29%.
- O uso do ultrassom mostrou ser eficiente, aumentando o rendimento de DAG e diminuindo o tempo de reação. Obteve-se 48% do rendimento em DAG em 1h e 30 min.
- Na imobilização da lipase livre Lipozyme TL100L os melhores resultados foram encontrados quando esta foi imobilizada em carvão ativo em agitador orbital, sendo que, neste caso, a atividade hidrolítica real do imobilizado foi de 146,38 U<sub>H</sub>/g, retenção de atividade real de 50,6%, eficiência da imobilização de 98,99% e proteínas adsorvidas 4,72 mg/g.
- Nas reações com as enzimas imobilizadas, a imobilização em carvão ativo apresentou os melhores resultados em rendimento de DAG (16%), sendo aquele que também apresentou maior atividade hidrolítica.

## 6. Referências

---

AGROPALMA, 2006,.Disponível em [www.agropalma.com.br](http://www.agropalma.com.br). Acesso em 19 de set de 2008.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V. BARATTI, J., **Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis***. Bioscience Biotechnology Biochemistry, v. 63, p. 63-70, 1999.

ANDRADE, M.A., ROSA, C.P., OESTREICHER, E.G., DARIVA, C. and ANTUNES, O.A.C. **Immobilization of D-hydantoinase in polyaniline**. Journal of Molecular Catalysis. B. Enzymatic, 2008.

BALCÃO,V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. **Biorreactors with immobilized lipases**, Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 392-416, 1996.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. **Ultrassom: Influência do ultrassom na química**. Química Nova, v.15, p. 302-316,1992.

BARCZA, M.V., **Processos Unitários Orgânicos**. Disponível em <[www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf](http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Hidrolise.pdf)>. Acesso em 19 de setembro de 2008.

BARON, A.M. **Biocatálise em ambientes aquo-restrictos:comparação de diferentes sistemas reacionais**. Tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BRADFORD, M.M. **A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v.72, p. 248-254, 1976.

- 
- BRENNAN, J.K.; BANDOSZ, T.J.; THOMSOM, K.T.; GUBBINS, K.E. **Water in porous carbons**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 187-188, p. 538-568, 2001.
- CHENGELIS C. P.; KIRKPATRICK J. B.; MARIT G. B.; MORITA O.; TAMAKI Y.; SUZUKI H. **A chronic dietary toxicity study of DAG (diacylglycerol) in Beagle dogs**. Food and Chemical Toxicology, v. 44, p. 81–97, 2006.
- 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**. Food Chemistry, v. 105, p. 1614-1622, 2007.
- CHRISTENSEN, M.W.; ANDERSEN, L.; HUSUM, T.L. KIRK, O. **Industrial lipase immobilization**. European Journal of Lipid Science and Technology. v. 105, p. 318-321, 2003.
- COSTA, V.E.U.; AMORIN, H.L. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente**. Química Nova, v. 22, nº 6, p. 863-873, 1999.
- COVINGTON, M. B. **Omega-3 fatty acids**. American Family Physician. v.70, nº 1, p.133-140, 2004.
- DALLA-VECCHIA, R. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, nº 4, p. 623-639, 2004.
- DARIO, M. **Recuperação da glicerina oriunda do processo de produção de biodiesel – Um processo Quimúrgico**. Monografia de graduação em Química-Bacharelado. UFMT. Brasil. 2006.

- 
- FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr., G.L. **Hydrolysis of starch with glucoamylase**. Applied Biochemistry Biotechnology, v. 26, pp. 23-33, 1990.
- GIESE J. **Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation**. Food Technology, v. 50, nº 11, p. 73-81, 1996.
- GONÇALVES, L.R.B. **Estudo do processo de obtenção do etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.
- GUILARDUCI, V.V.S; MESQUITA, J.P.; MARTELLI, P.B.; GORGULHO, H.F. **Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino**. Química Nova, v.29, nº6, p.1226- 1232, 2006.
- GUISAN, J.M. **Immobilization of enzymes and cells**, (Methods in biotechnology; 22), Human Press, Madrid – Spain, 2006.
- HAGIWARA, T.; YAMAURA, M.; IWATA, K. **Thermal Stability of Polyaniline**. Synthetic Metals, v. 25, p. 243-252, 1988.
- INCE, N.H.; TEZCANLI, G. **Reactive dyestuff degradation by combined sonolysis and ozonation**. Dyes and Pigments. v. 49, p. 145-153, 2001.
- KASAMATSU, T. et al. **Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG)oil**, Food and Chemical Toxicology, v.43, nº 2, p. 253-260, 2005.
- KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A.; MELLO, E.H.M. **The immobilization of enzymes and cells**. Chimica Oggi, p. 21-29, 1988.

- 
- KINSELLA, J.E. **Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms.** American Journal of Clinical Nutrition, nº 52, p. 1-28., 1990.
- KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.;BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom.** Revista Analytica, nº3, p. 34-39, fev 2003.
- KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. **Lipases and lipase-catalysed esterification reactions in nonaqueous media,** Catalysis Reviews, Vol. 44, nº 4, p. 499–591, 2002.
- LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. **Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters.** Brazilian Journal of Chemical Engineering , v. 19, nº 2, p. 175-180, 2002.
- LEAL, M.C.M.R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios.** 2000. Tese de Mestrado em Ciências, Engenharia Alimentos em Ciências, Engenharia Química, COPPE/UFRJ.
- LEITE, V.; SILVA, V.L.; AZEVEDO, W.M.; MELO, E.H.M. and LIMA, J.L.F. **Increasing Glucose Oxidase Determination Range by Flow Injection Analysis (FIA) Using Glucose Oxidase immobilized on Polyaniline.** Biotechnology Techniques., v. 8, p. 133-136, 1994.
- LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system.** Ultrasonics Sonochemistry, v.15, p. 402–407, 2008.
- MACDIARMID, A.G.; CHIANG, J.C.; HALPERN, M.; HUENG, W.S.; MU, S.L., SOMASIRI, N.L.D.; WU, W.; YANIGER, S.I.

- 
- Polyaniline:Interconversion of Metallic and Insulating Forms.**  
Molecular Crystals & Liquids Crystals, v. 121, p. 173-180, 1985.
- MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.S.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. **Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation.** Process Biochemistry, v. 38, p. 715-721, 2002.
- MAIA, D.J.;DEPAOLI, M.A.;ALVES, O.L, **Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras.** Química Nova, v.23, p. 204-215, 2000.
- MARTINEZ, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI M.J. **O efeito do ultrassom em reações químicas.** Química Nova, v. 23, p. 251-256, 2000.
- MASON, T. **Ultrasound in synthetic organic chemistry.** Chemical Society Reviews. v. 26, p. 443-451, 1997.
- MATAIX, J. "Lípidos alimentarios". *In*: MATAIX, J.; GIL, A. **Libro blanco de los Omega-3.** Instituto Omega-3: Madrid, p. 14-32, 2002.
- MOGENSEN, J.E.; SEHGAL, P.; OTZEN, D.E. **Activation, inhibition and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents.** Biochemistry,v.44, p. 1719-1730, 2004.
- MORENO-CASTILLA, C. et al. **Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials,** v. 42, p. 83-94, 2004.
- MONTEIRO J.B.R., ROSADO E.L. **Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta.** Revista de Nutrição, v. 14, nº 2, Campinas, Maio/Agosto 2001.



---

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. Rio de Janeiro; Varela, 1989.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. **Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para a produção de xilitol**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 24(1): 094-100, jan.-mar. 2004

NICHOLS, D.S.; SANDERSON, K. The Nomenclature, Structure, and Properties of Food Lipids. In: SIKORSKI, Z.E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Flórida, CRC Press, p. 38-68, 2003.

NOVOZYMES® Product Sheet Lipozyme® TL 100 L, Oils & Fats, 06951 – 03-2001.

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

PINHEIRO, T.L. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. Erechim, 2006. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. URI – Campus de Erechim.

POMPÉIA, C. Essencialidade dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, p. 27-32, 2002.

Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº. 270, de 22 de setembro de 2005

- 
- RODRIGUEZ-REINOSO, F; MOLINA-SABIO, M. **Textural and chemical characterization of microporous carbons**. Advances in Colloid and Interface Science, v. 76-77, p. 271-294, 1998.
- SAAD, E.B. **Etanolise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos**. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- SALIS, A.; SVENSSON, I.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. **The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosus***. Biochimica et Biophysica Acta, v.1646, p. 145-151, 2003.
- SAMBANTHAMURTHI, R; SUNDRAM, K.; TAN Y. **Chemistry and Biochemistry of palm oil**. Progress in Lipid Research, Malaysia, nº 39, p. 507-558, 2000.
- SANTOS, M.A.S.; D'ÁVILA, J.L. **O comportamento do Mercado do Óleo de Palma no Brasil e na Amazônia**. Estudos Setoriais 11, Belém – Pará, 1998.
- SARDA, L., DESNUELE, P. **Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion**. Biochimica et Biophysica Acta, v. 58, p. 513-521, 1958.
- SHAH, S.; GUPTA, M.N. **The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media**. Chemistry Central Journal, v. 2, 2008.
- SILVA, F.M.; LACERDA, P.S.B.; JONES, J.J. **Desenvolvimento Sustentável e Química Verde**, Química Nova, v. 28, nº 1, p. 103-110, 2005.

- 
- SILVA, K.F.F, **Imobilização de Horseradish Peroxidase em diferentes polianilinas: aplicações analíticas**. 2000, 140 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary Aspects of Diet. In MOSTOFSKY, D.I; YEHUDA, S.; SALEM, J. **Fatty Acids: Physiological and Behavioral Functions**. New Jersey, Humana Press, p. 3-22, 2001.
- SINISTERRA, J.V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview**. Ultrasonics, v.30, nº 3, p. 180-184, 1992.
- SUDRAM K. **Palm oil: Chemistry and Nutrition Updates**. Malaysian Palm Oil Board (MPOB), P.O. Box 10620, 50720 Kuala Lumpur, Malaysia.
- TANG, J.; JING, X.; WANG, B.; WANG, F. **Infrared Spectra of Soluble Polyaniline**. Synthetic Metals, v. 24, p. 231-238, 1988.
- TISCHER, W.; KASCHE, V. **Immobilized enzymes: crystal or carriers?**, Trends in Biotechnology, v. 17, p. 326-335, 1999.
- VALENCIA, C.A.V. **Aplicação da Adsorção em Carvão Ativado e outros Materiais Carbonosos no Tratamento de Águas Contaminadas por Pesticidas de Uso Agrícola**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Metalúrgica do Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2007.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. et. al. **Customizing Lipases or Biocatalysis: a Survey of Chemical**. Physical and Molecular Biological Approaches, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 9. nº 4, p. 113–148; 2000.

---

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

YASUKAWA, T.; KATSURAGI, Y. Diacylglycerols. In: KATSURAGI, Y.; YASUKAWA, T.; MATSUO, N.; FLICKINGER, B. D.; TOKIMITSU, I., MATLOCK, M. G. **Diacylglycerol Oil.** Eds.; AOCS Press: Champaign, Illinois, p. 1-15, 2004.

WAKABAYASHI, H, **Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors.** Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation, Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, München, 2004.

ZHANG, H.; XU, X.; NILSSON, J.; MU, H.; ADLER-NISSEN, J.;HOY, C-E. **Production of Margarine Fats by Enzymatic Interesterification with Silica-Granulated *Thermomyces lanuginosa* Lipase in a Large-Scale Study.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 78, p. 57-64, 2001.