



**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Dissertação de Mestrado**

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DO ÓLEO DE SOJA**

**TÂNIA BUENO**

**Lorena – SP - Brasil  
2005**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DO ÓLEO DE SOJA**

Dissertação de Mestrado apresentada  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Engenharia Química.

**Banca examinadora:**

Dr<sup>a</sup> . Heizir Ferreira de Castro (Presidente)  
Dr. Alfredo Eduardo Maiorano  
Dr. Pedro Carlos de Oliveira

**Estudante:**

Tânia Bueno

**Lorena – SP - Brasil**

**2005**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA  
DO ÓLEO DE SOJA**

Prof<sup>a</sup>. D<sup>ra</sup>. Heizir Ferreira de Castro  
Presidente da Banca

**Lorena – SP - Brasil  
2005**

## AGRADECIMENTOS

A amiga, professora e orientadora Heizir Ferreira de Castro meu agradecimento especial pela orientação dedicada, clara e objetiva.

Aos meus pais, Nelson e Cida pelo apoio e amizade.

A Thaís pela paciência e apoio nas horas difíceis.

Ao Rodolfo pelo carinho e dedicação.

A professora Jayne pela paciência e dedicação na realização das análises de RMN.

Ao nosso grupo de trabalho, formado pelas amigas e amigos, Larissa, Bia, Flávia, Luciana, Grazielle, Patrícia, Camilla, Michele, Daniele, Adriano, Fabrício e Caio o meu agradecimento pela ajuda, amizade e ótima convivência no laboratório.

Ao Dr. Victor H. Perez pelo apoio na realização das análises cromatográficas

Aos professores e funcionários de DEQUI que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Tânia Bueno. Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Heizir Ferreira de Castro (Departamento de Engenharia Química, FAENQUIL, CP 116, 12.600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca examinadora: Dr. Alfredo Eduardo Maiorano e Dr. Pedro Carlos de Oliveira. Agosto 2005.

## RESUMO

A aplicação da tecnologia enzimática em óleos e gorduras desempenha um importante papel na substituição dos processos químicos tradicionais. O presente trabalho teve como objetivo a utilização desta tecnologia, na produção de ácidos graxos especiais ( $\omega$  3 e  $\omega$  6) para fins industriais. A hidrólise enzimática de óleos e gorduras, ou lipólise é um processo ainda não bem elucidado e seu domínio tecnológico pode permitir a produção de ácidos graxos com alto valor agregado e baixo consumo energético.

No desenvolvimento deste trabalho foram testadas cinco preparações comerciais de lipase: duas microbianas (*Candida rugosa*, tipo VII), adquirida da Sigma Co (EUA) e *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase), adquirida da empresa Novozymes (Dinamarca) e três de origem de células animais (pâncreas de porco) adquiridas das empresas brasileiras Kin Master (RS) e Nuclear (SP) e da Sigma Co (EUA). Como substrato foi selecionado o óleo de soja devido a sua alta concentração em ácidos linoléico ( $\omega$  6 = 54,5%) e linolênico ( $\omega$  3 = 8,3%).

Para alcançar o objetivo proposto, o trabalho experimental foi dividido em quatro etapas. Na primeira etapa as preparações de lipase foram caracterizadas quanto suas propriedades bioquímicas e cinéticas. A partir dos resultados obtidos, foram efetuados testes de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando as diferentes preparações de lipase, visando selecionar aquelas que forneceria taxas de hidrólise mais elevadas, sendo selecionadas nesta etapa duas preparações de lipase, uma de origem microbiana (lipase de *Candida rugosa* LCR) e uma pancreática (LPP). Em termos de produção de ácidos graxos livres, a lipase microbiana foi mais efetiva para promover a hidrólise enzimática do óleo de soja (69,34 %) do que a lipase pancreática (23,82%). Essas preparações foram também eficientes na liberação dos ácidos ômega.

Na terceira etapa, foi efetuado um estudo do efeito das variáveis principais do processo, tendo como objetivo determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). Um planejamento fatorial de face centrada ( $2^2$ ) foi utilizado para melhor entendimento das variáveis concentrações de lipase e cloreto de sódio e de suas interações na porcentagem de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando lipase pancreática. Para lipase microbiana esse estudo não foi efetuado, em função da elevada taxa de hidrólise obtida.

Na última etapa foram realizados testes de hidrólise nas condições otimizadas visando selecionar a preparação mais adequada para obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. A lipase pancreática (LPP) foi a mais eficiente sendo capaz de enriquecer o meio hidrolisado tanto em termos de ácido linoleico (C18: 2) como ácido linolênico (C18:3), atingindo valores da ordem de 29,46 g/L e 4,55 g/L, respectivamente. A lipase de *Candida rugosa*, apesar de proporcionar maior grau de hidrólise em ácidos graxos totais apresentou um desempenho inferior atingindo os valores de 18,46 g/L para o ácido linoleico e 3,38 g/L para o ácido linolênico.

## ABSTRACT

The application of the enzymatic technology for oil and fat modifications can be considered a useful tool to replace the traditional chemical processes. The aim of this work was to apply such technology for the production of essential fatty acids ( $\omega$  3 and  $\omega$  6). The enzymatic hydrolysis of oils and fats, or lipolysis is not yet a well elucidated process and its better understating can allow producing fatty acids with high added value and low energy consumption.

For this purpose five commercial lipase preparations were tested: two from microbial sources (*Candida rugosa*, type VII, Sigma) and *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase, Novozymes) and three from animal cells (porcine pancreas lipase) obtained from the following companies Kin Master (RS), Nuclear (SP) and Sigma Co (USA). Soybean oil was used as raw material due to its high concentration in both essential fatty acids (linoleic  $\omega$  6= 54.5% and linolenic  $\omega$  3=8.3%).

The experimental work was developed in three steps. In the first, the lipase preparations were characterized in relation to their biochemical and kinetic properties. Following this, screening tests were performed in order to select the lipase preparations that supplied high enzymatic hydrolysis rates from soybean oil. At this stage, two lipase preparations, one from microbial source (*Candida rugosa* lipase - CRL) and the other from animal cells (porcine pancreas lipase - PPL) were found to be efficient to liberate the omega fatty acids. In terms of free fatty acids, the microbial lipase was more effective to promote the enzymatic hydrolysis of the soybean oil (69.34%) than the porcine pancreas lipase (23.82%).

In the third step, a detailed study was carried out to determine the best combination of the process variables to maximize the formation of free fatty acids (FFA). A factorial design ( $2^2$ ) was used to better understanding the influence of the variables lipase concentration and sodium chloride and its interaction in the percentage of enzymatic hydrolysis of the soybean oil using pancreatic lipase. For the microbial lipase this study was not carried out.

In the last step, hydrolysis tests were carried out under the optimized conditions seeking to select the most suitable lipase preparation to concentrate polyunsaturated fatty acids. The pancreatic lipase (PPL) was found to be the most efficient to enrich the hydrolyzed medium in terms of both fatty acids, i.e., linoleic (C18:2) and linolenic (C18: 3) acids, reaching values in the order of 29.46 g/L and 4.55 g/L, respectively. Lipase from *Candida rugosa*, despite providing higher hydrolysis degree in term of free fatty acids showed lower performance for omega acids, reaching values of 18.46 g/L and 3.38 g/L for linoleic and linolenic acids, respectively.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1. Fontes de Ácidos Graxos Poliinsaturados .....	3
2.2. Aspectos Nutracêuticos dos Ácidos Graxos Poliinsaturados .....	4
2.3. Óleos Vegetais como Fonte de Ácidos Poliinsaturados .....	7
2.4. Hidrólise de Óleos e Gorduras.....	8
2.4.1. Mecanismos das Reações de Hidrólise .....	10
2.5. Lipases .....	11
2.5.1. Fontes de Lipases .....	13
2.5.2. Especificidade das Lipases.....	14
2.5.3. Propriedades Bioquímicas.....	16
2.5.4. Propriedades Cinéticas .....	17
2.5.5. Reações Catalisadas por Lipases.....	23
2.6. Aplicações Potenciais das Lipases.....	25
2.7. Hidrólise Enzimática de Óleos e Gorduras.....	27
2.8. Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise Enzimática .....	31
2.9. Separação dos Produtos obtidos por Hidrólise.....	35
2.10. Planejamento de Experimentos .....	35
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1. Materiais .....	38
3.1.1. Enzimas .....	38
3.1.2. Substrato.....	38
3.1.3. Reagentes .....	38
3.2. Procedimentos Experimentais .....	38
3.2.1. Síntese Química dos Monoésteres de Ácidos Graxos.....	38
3.2.2. Caracterização das Propriedades do Óleo de Soja .....	40
3.2.3. Caracterização das Preparações de Lipase .....	40
3.3. Testes de Hidrólise .....	41
3.3.1. Testes de Seleção da Preparação de Lipase.....	41
3.4. Separação e Recuperação dos Produtos de Hidrólise.....	42
3.5. Métodos de Análises.....	44
3.5.1. Determinação da Concentração de Proteína.....	44
3.5.2. Determinação da Atividade Hidrolítica.....	44
3.5.3. Índice de Acidez.....	45
3.5.4. Índice de Saponificação .....	45
3.5.5. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres .....	46
3.5.6. Concentração de Glicerol.....	46
3.5.7. Análises Cromatográficas .....	47

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
4.1. Estabelecimento do Método de Quantificação dos Ácidos Graxos Livres.....	50
4.2. Propriedades do Óleo de Soja.....	51
4.3. Propriedades Bioquímicas e Cinéticas das Preparações de Lipase.....	52
4.3.1. Influência do pH na Atividade das Preparações de Lipases.....	53
4.3.2. Influência da Temperatura na Atividade das Lipases.....	54
4.3.3. Estabilidade Térmica das Preparações de Lipase.....	56
4.3.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	58
4.4. Seleção da Preparação de Lipase para Hidrólise do Óleo de Soja.....	61
4.5. Planejamento Experimental.....	65
4.6. Testes de Hidrólise do Óleo de Soja nas Condições Otimizadas empregando as Preparações de Lipase Seleccionadas .....	69
4.7. Monitoramento da Liberação de Ácidos Graxos Poliinsaturados na Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja.....	72
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>8. APÊNDICES .....</b>	<b>85</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.	Lista parcial de empresas que estão pesquisando, desenvolvendo, manufaturando ou comercializando produtos contendo ácidos graxos essenciais .....	6
Tabela 2.2.	Estrutura química e porcentagem de ácidos graxos presentes em diferentes óleos vegetais .....	7
Tabela 2.3.	Catalisadores químicos e inorgânicos .....	9
Tabela 2.4.	Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes .....	16
Tabela 2.5.	Parâmetros cinéticos da lipase microbiana de <i>Candida rugosa</i> em diferentes substratos .....	22
Tabela 2.6.	Aplicações potenciais de lipases .....	25
Tabela 2.7.	Exemplos de processos de hidrólise enzimática de lipídeos.....	28
Tabela 3.1.	Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do óleo de soja.....	41
Tabela 3.2.	Padrões cromatográficos utilizados e sua forma de aquisição.....	46
Tabela 4.1.	Disposição geral dos ensaios realizados .....	48
Tabela 4.2.	Condições de operação do cromatógrafo para dosagem dos ésteres metílicos por CG.....	49
Tabela 4.3.	Determinação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos.....	50
Tabela 4.4.	Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja.....	50
Tabela 4.5.	Propriedades físicas e químicas do óleo de soja .....	51
Tabela 4.6.	Atividade hidrolítica específica das preparações de lipase testadas .....	51
Tabela 4.7.	Valores ótimos de pH para as preparações de lipase testadas.....	53
Tabela 4.8.	Valores ótimos de temperatura para as preparações de lipase testadas .....	55
Tabela 4.9.	Constantes de inativação térmica e tempo de meia-vida das preparações de lipase, em diferentes temperaturas .....	56
Tabela 4.10.	Valores das constantes cinéticas para as preparações de lipase em emulsões preparadas com óleo de soja .....	59
Tabela 4.11.	Caracterização das preparações de lipase no substrato óleo de soja.....	60
Tabela 4.12.	Composição em ácidos graxos no substrato e hidrolisados obtidos empregando diferentes lipases .....	64

Tabela 4.13. Matriz de planejamento experimental e resultados obtidos com a lipase pancreática. ....	65
Tabela 4.14. Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student para a porcentagem de hidrólise, de acordo com o planejamento fatorial $2^2$ . ....	65
Tabela 4.15. Análise de Variância para o modelo fatorial proposto.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Metabolismo de ácidos graxos essenciais.....	6
Figura 2.2.	Esquema representativo da hidrólise de triglicerídeos.....	8
Figura 2.3.	Esquema representativo da hidrólise alcalina.....	10
Figura 2.4.	Esquema representativo da hidrólise ácida.....	10
Figura 2.5.	Esquema representativo da hidrólise enzimática.....	11
Figura 2.6.	Velocidade de reação de hidrólise (V) em função da concentração do substrato (S) parcialmente solúvel em água. Linhas verticais representam a solubilidade máxima ou concentração miscelar crítica do substrato (éster) usado. Esses perfis observados para diferentes lipases foram baseados em resultados publicados (RANSAC <i>et al.</i> , 1995).....	21
Figura 2.7.	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.....	24
Figura 3.1.	Fluxograma do procedimento experimental adotado nas sínteses dos padrões cromatográficos.....	39
Figura 3.2.	Processo operacional do fracionamento dos produtos da hidrólise.....	43
Figura 4.1.	Fluxo operacional do processo.....	48
Figura 4.3.	Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase LCR e Lipolase (A) e LPP, LKM e LNU (B) em emulsão preparada com óleo de soja.....	55
Figura 4.4.	Estabilidade térmica das enzimas LCR e Lipolase (A), LPP, LKM e LNU (B) em emulsão preparada com óleo de soja.....	57
Figura 4.5.	Atividade hidrolítica das lipases microbianas (A) <i>Candida rugosa</i> , (B) Lipolase em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo de soja /água (37 °C).....	58
Figura 4.6.	Atividade hidrolítica das lipases pancreáticas (A) LPP; (B) LKM; (C) LNU em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo de soja /água (37 °C).....	59
Figura 4.7.	Perfil de porcentagem de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando diferentes preparações de lipase: (a) LCR, (b) Lipolase, (c) LPP, (d) LKM. Ensaio efetuado com emulsão óleo: água na proporção (1:4), temperatura 37-40°C, agitação magnética (200 rpm).....	62
Figura 4.8.	Porcentagem de hidrólise enzimática alcançada em 24 h do óleo de soja empregando diferentes preparações de lipase.....	63

Figura 4.9.	Cromatogramas gerados nas análises dos hidrolisados de óleo de soja pela atuação de diferentes preparações de lipase (a) LCR; (b) Lipolase; (c) LPP; (d) LKM.....	64
Figura 4.10.	Perfil da porcentagem de hidrólise em função do tempo na reação de hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase pancreática (LPP) sob diferentes condições operacionais.....	67
Figura 4.11.	Perfil de porcentagem de hidrólise do óleo de soja em função do tempo pela atuação isolada (A, B) e combinada (C) das lipases LPP e LCR.....	70
Figura 4.12.	Cromatogramas gerados nas análises dos hidrolisados de óleo de soja pela atuação isolada (A, B) e combinada das lipases LPP e LCR.....	71
Figura 4.13.	Porcentagem de ácidos ômega obtidos na hidrólise enzimática do óleo de soja pela atuação isolada e combinada das lipases LPP e LCR .....	72
Figura 4.14.	Porcentagem de distribuição de ácidos graxos nas reações de hidrólise do óleo de soja pela atuação da LPP nas condições otimizadas. ....	73

**NOMENCLATURA**

<b>AE:</b>	Agente Emulsificante
<b>BSA:</b>	Albumina Bovina Cristalina
<b>AGL:</b>	Ácidos Graxos Livres
<b>AGPI:</b>	Ácidos Graxos Poliinsaturados
<b>DG:</b>	Diglicerídeo
<b>DHA:</b>	Ácido Docosaheptaenóico
<b>[E]:</b>	Enzima
<b>EPA:</b>	Ácido Eicosapentaenóico
<b>[ES]:</b>	Complexo Enzima-Substrato
<b>IA:</b>	Índice de Acidez
<b>IS:</b>	Índice de Saponificação
<b>MG:</b>	Monoglicerídeo
<b>LCR:</b>	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
<b>Lipolase:</b>	Lipase de <i>Thermonyces lanuginosa</i>
<b>LKM:</b>	Lipase Kin Master
<b>LNU:</b>	Lipase Nuclear
<b>LPP:</b>	Lipase Pâncreas de Porco (Sigma)
<b>TG:</b>	Triglicerídeo
<b>Ts;</b>	Estado de Transição
<b>(S):</b>	Substrato
<b>(P):</b>	Produto
<b><math>k_m</math>:</b>	Constante de Michaelis-Menten
<b><math>V_{max}</math>:</b>	Velocidade máxima da reação
<b>pNPP:</b>	p-nitrofenilpalmitato
<b>U:</b>	Atividade enzimática

## 1. INTRODUÇÃO

A produção mundial anual de óleos e gorduras em 2000 foi da ordem de 107 milhões de toneladas e para 2010 está prevista uma produção de 135 milhões de toneladas, um crescimento de 21%, o que torna essa classe de materiais importantíssima no contexto econômico internacional (KUEN SOON, 2001). Sua maior parte destina-se ao setor alimentício, no entanto, é crescente o interesse de obter produtos químicos de maior valor agregado a partir dessas matérias químicas (CASTRO *et al.*, 2004).

Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados químicos de óleos vegetais é a hidrólise, que conduz a glicerol, mono e diglicerídeos e uma mistura de ácidos graxos. As transformações de óleos e gorduras são predominantemente baseadas em processos químicos convencionais (ROONEY & WEATHERLEY, 2001). No caso da hidrólise, o processo mais utilizado é o Colgate-Emery, que opera sob temperaturas e pressões elevadas, ocasionando reações secundárias que exigem posteriores operações de separação e purificação (GUNSTONE, 1999; ROONEY & WEATHERLEY, 2001).

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras constitui-se numa alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos. Utilizando lipases e promovendo a reação em condições brandas de temperatura e pressão é possível obter produtos com baixo custo energético (GANDHI, 1997; GUNSTONE, 1999; CASTRO *et al.*, 2004). Adicionalmente, a utilização de lipases no processamento de óleos e gorduras ultrapassa os interesses da simples hidrólise, contemplando diversas transformações como esterificação e interesterificação (NASCIMENTO *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004). Esta habilidade catalítica tem sido explorada tanto para substituir processos existentes quanto para produzir uma série de produtos originalmente considerados como praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional (NASCIMENTO *et al.*, 2001).

O procedimento usual da hidrólise enzimática é realizado em reatores agitados, contendo gordura na fase líquida e solução aquosa da enzima. A duração global do processo é de aproximadamente 72 h, sendo alcançadas taxas de conversão variando entre 90-95% e concentrações finais de glicerol na fase aquosa entre 10-20%. A empresa japonesa Miyoshi Oil and Fat Co adota esse processo em escala industrial para produção de sabão, utilizando lipase de *Candida rugosa* (CASTRO *et al.*, 2004).

Do ponto de vista comercial, a reação de hidrólise de óleos e gorduras catalisada

por lipase, é aparentemente menos econômica que a técnica convencional. Entretanto, considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de alto valor agregado, como por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados dos tipos ômega-3 e ômega-6, a partir da hidrólise de óleos vegetais ou marinhos por lipases, este tipo de processo pode tornar-se viável economicamente (GUNSTONE, 1999; CASTRO *et al.*, 2004, WARD & SINGH, 2005).

Em vista deste grande potencial, pesquisas voltadas a esta área têm relatado a aplicação crescente de métodos enzimáticos visando a obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados, a partir de óleos de diferentes fontes.

O presente trabalho tem por objetivo estabelecer um processo enzimático que possibilite a produção de ácidos graxos de elevado valor agregado a partir de um substrato de fácil disponibilidade comercial. Para esta finalidade, foi utilizado como sistema modelo, a hidrólise do óleo de soja com lipases de diferentes fontes. Ressalta-se que a seleção do óleo de soja foi baseada na elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados ( $\omega 6 = 54\%$  e  $\omega 3 = 8,3\%$ ) presente nessa matéria-prima. Assim, buscando novos métodos para produção e purificação de ácidos graxos essenciais, os principais aspectos que foram abordados neste projeto de mestrado compreenderam: (i) Estabelecimento do método de quantificação de ácidos graxos livres por cromatografia de fase gasosa; (ii) Caracterização das propriedades bioquímicas e cinéticas das preparações de lipase empregando como substrato óleo de soja; (iii) Seleção da preparação de lipase para promover a hidrólise enzimática do óleo de soja; (iv) Otimização do processo da hidrólise enzimática, por meio de testes estatísticos e (v) Separação e quantificação dos produtos de hidrólise.

Este trabalho se insere na linha principal de atuação do Grupo de Biocatálise/FAENQUIL que vem desenvolvendo pesquisas referentes à aplicação da enzima lipase em processos de valorização de óleos vegetais para a produção, por exemplo, de ésteres aromatizantes, biocombustíveis e ácidos graxos poliinsaturados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados os principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido, iniciando-se pelo setor de óleos e gorduras, a importância dos ácidos graxos, a utilização de enzimas como catalisadores e mecanismos das reações de hidrólise enzimática.

### 2.1. Fontes de Ácidos Graxos Poliinsaturados

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (CLAUSS, 1996). Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um composto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras, tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (CASTRO *et al.*, 2004; WARD & SINGH, 2005).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos obtidos, geralmente, da hidrólise de óleos e gorduras. Estes são classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de duplas ligações na cadeia dos ácidos graxos (CARVALHO *et al.*, 2003).

Há dois grupos distintos de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa: a série ômega 3 (ou  $n-3$ ), na qual a primeira dupla ligação está localizada entre o terceiro e o quarto átomo de carbono na cadeia do ácido graxo e a série ômega 6 (ou  $n-6$ ), na qual a primeira dupla ligação é observada entre o sexto e o sétimo átomo de carbono na cadeia do ácido graxo.

Os ácidos graxos podem ser sintetizados no organismo do ser humano, com exceção dos ácidos linolênico (ômega 3) e linoleico (ômega 6). Entretanto, estes possuem funções indispensáveis ao metabolismo. A partir destes ácidos graxos são sintetizados outros ácidos graxos (poliinsaturados) de importância fundamental para o organismo: o ácido araquidônico (formado por dessaturação e alongamento da cadeia do ácido linoleico), o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) - ambos formados por dessaturação e alongamento da cadeia do ácido linolênico



(HORNSTRA *et al.*, 1995; BROADHURST *et al.*, 1998). O EPA é um precursor do DHA. Assim, estes ácidos graxos são considerados essenciais para o organismo e devem estar presentes na dieta.

As fontes dos ácidos graxos ômega 3 e 6 (BROADHURST *et al.*, 1998) são:

### **Ômega 3:**

- *ácido linolênico*: encontrado em folhas verdes e em sementes oleaginosas, como também na semente da linhaça, mostarda e óleo de soja.
- *ácido docosahexaenóico* (DHA) e *ácido eicosapentaenóico* (EPA): presentes principalmente em peixes de águas frias (como a cavala, o arenque e o salmão). Os peixes brancos magros (como o bacalhau e o linguado) contêm apenas pequenas quantidades de DHA e EPA (SCHMIDT & DYERBERG, 1994). O DHA apresenta 22 carbonos na cadeia com seis duplas ligações (22:6, ômega 3) e o EPA apresenta 20 carbonos, com cinco duplas ligações (20:5, ômega 3).

### **Ômega 6:**

- *ácido linoleico*: encontrado em sementes oleaginosas (por exemplo, nozes, pistaches, amendoins, sementes de abóbora) e óleos vegetais (por exemplo, algodão, milho, girassol, soja, canola). Devido a grande quantidade de alimentos a base de óleos vegetais, o ácido linoleico é muito mais prevalente nas dietas atuais que no passado.
- *ácido araquidônico*: os alimentos mais ricos são a gema do ovo, as vísceras e a carne de animais terrestres e também na carne dos peixes tropicais.

## **2.2. Aspectos Nutracêuticos dos Ácidos Graxos Poliinsaturados**

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 podem influenciar em uma ampla variedade de funções biológicas porque são incorporados às membranas celulares, onde são elementos lipídicos estruturais de importância vital para as membranas celulares, sendo fundamentais na formação de novos tecidos, além de serem essenciais para o crescimento e manutenção das funções fisiológicas do organismo.

Os dois tipos não são interconvertíveis e podem até antagonizar a ação um do outro. Por exemplo, como competem entre si por determinadas enzimas, a presença do ômega 6 pode inibir a produção de alguns metabólitos do ômega 3, incluindo os precursores dos eicosanóides (LANDS, 1986). Desta forma, alterações nas proporções desses ácidos na dieta podem levar a alterações profundas nos processos biológicos que

envolvem os eicosanóides (prostaglandinas e tromboxanos), incluindo a inflamação e a coagulação do sangue. Assim, os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 influenciam nas funções bio-regulatórias importantes do organismo, sendo essenciais para a saúde humana.

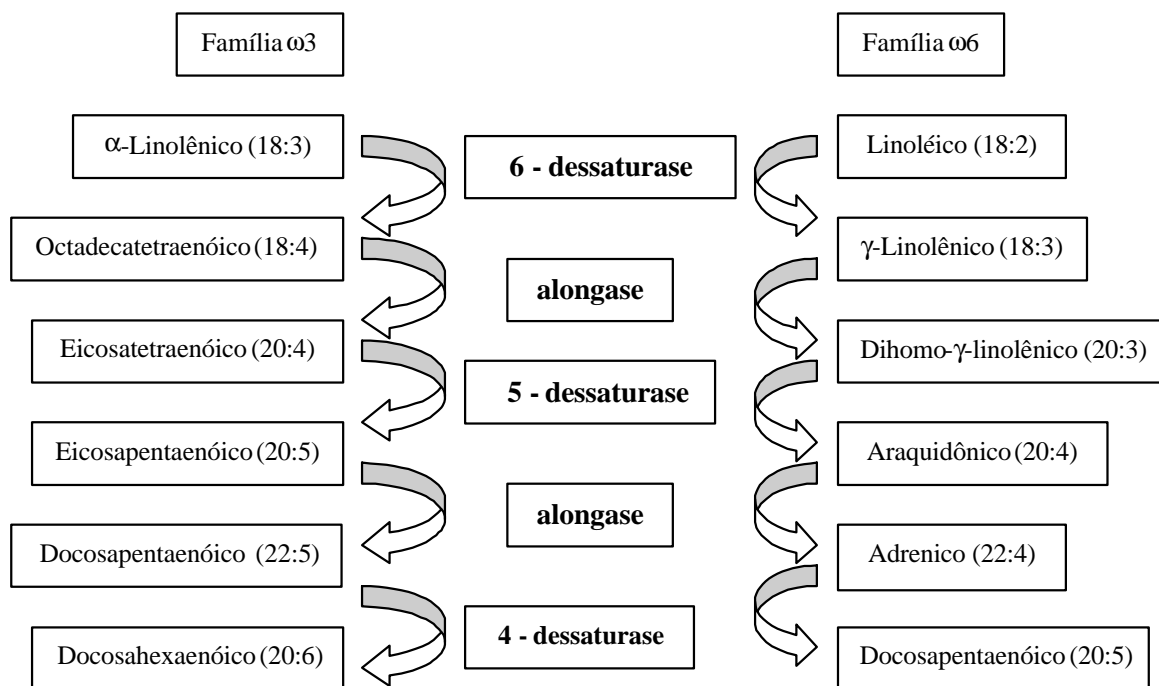
Os ácidos  $\omega$ -3 (ácido linolênico) e  $\omega$ -6 (ácido linoleico) são fundamentais na prevenção e no tratamento das doenças cardiovasculares além de outras atuações importantes na hipertensão arterial, diabetes, artrites e doenças autoimunes (CARVALHO *et al.*, 2003). Esses ácidos graxos são também empregados em terapia farmacológica, potencializando o efeito de certas drogas e no crescimento e no desenvolvimento de crianças (CARVALHO *et al.*, 2003).

Após a ingestão, os ácidos graxos, são absorvidos pelas células e tecidos e podem ser dessaturados ou alongados a outros ácidos poliinsaturados de cadeia longa. Os processos de alongação e dessaturação do ácido linoleico e linolênico ocorrem nos animais e, vagarosamente, nos homens originando diversos metabólitos, como representado na Figura 2.1 (CARVALHO *et al.*, 2003; ZAREVÚCKA *et al.*, 2003).

Embora os ácidos graxos poliinsaturados possam ser sintetizados no corpo a partir da biotransformação dos ácidos graxos essenciais por reações de alongação e dessaturação, a ingestão direta dos metabólitos ativos tem se mostrado eficiente, principalmente para gestantes, idosos, lactantes, crianças prematuras (INNIS, 2000) e para indivíduos que apresentem insuficiência da enzima  $\Delta$ 6-dessaturase, decorrente de carências nutricionais ou do próprio envelhecimento (CARVALHO *et al.*, 2003).

O mercado mundial apresenta uma gama bastante ampla de suplementos alimentares (encapsulados) de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 e de produtos, nos quais estes ácidos são incorporados, em leite e derivados, fórmulas lácteas infantis, pães, ovos, massas e sucos de frutas. A Tabela 2.1 apresenta uma lista parcial de empresas que estão pesquisando, desenvolvendo, manufaturando ou comercializando produtos contendo ácidos graxos essenciais (WARD & SINGH, 2005).

Em vista deste grande potencial, pesquisas voltadas a esta área têm relatado a aplicação de diferentes métodos físicos, químicos e enzimáticos visando à obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados, a partir de óleos vegetais e marinhos.



**Figura 2.1.** Metabolismo de ácidos graxos essenciais

**Tabela 2.1.** Lista parcial de empresas que estão pesquisando, desenvolvendo, manufaturando ou comercializando produtos contendo ácidos graxos essenciais

Aventis S.A.  
 BASF A.G.  
 Gist-brocades  
 Heinz-Wattie's  
 Hoffmann-LaRoche A.G.  
 Laboratorios Ordesa  
 Maarbarot  
 Martek Inc.  
 Mead Johnson Nutritionals  
 Nagase and Co.  
 Nestle S.A.  
 Novartis  
 Nutricia  
 Nutrinova Celanese A.G.  
 Pronova  
 Ross Products (Div of Abbott)  
 Suntory Ltd.

Fonte: WARD & SINGH (2005).

### 2.3. Óleos Vegetais como Fonte de Ácidos Poliinsaturados

O ácido linoleico ( $\omega$ -6) é o ácido graxo poliinsaturado mais abundante, presente em diversos óleos vegetais como de soja, girassol, canola e milho (Tabela 2.2). Entretanto, o ácido linolênico ( $\omega$ -3) só é encontrado em porcentagens superiores a 5% nos óleos de soja e canola. Os EPA (ácido eicosapentaenóico, C20:5) e DHA (ácido docosahexaenóico, C22:6) estão presentes tanto em óleos marinhos como os de atum, sardinha e baleia (CARVALHO *et al.*, 2003), como também em alguns óleos vegetais, em menores concentrações, sendo o óleo de soja o que apresenta a maior concentração (8,3%).

**Tabela 2.2.** Estrutura química e porcentagem de ácidos graxos presentes em diferentes óleos vegetais

Ácido Graxo			Óleo Vegetal			
Nome	Estrutura	Fórmula	Soja	Girassol	Canola	Milho
Mirístico	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	0,1	0	0	0
Palmítico	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	10,5	7,0	5,1	11,5
Estearico	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	3,2	3,3	2,2	2,2
Oléico	18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	22,3	14,3	57,7	26,6
Linoleico	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	54,5	75,4	22,5	58,7
Linolênico	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	8,3	0	6,9	0,8
Eicosanóico	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	0,2	0	0	0,2
Eicosenóico	20:1	C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	0,9	0	0	0

Fonte: SONNTAG (1979).

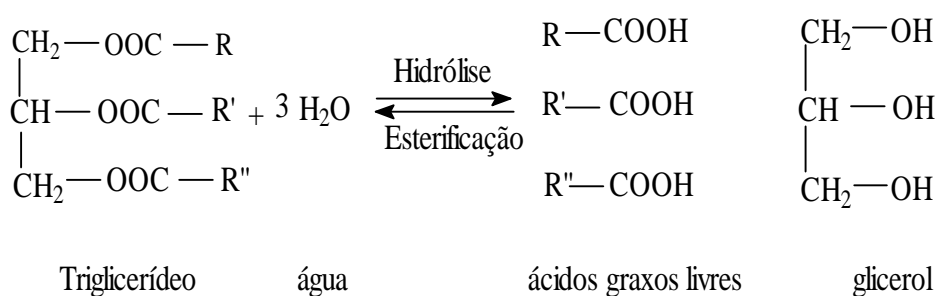
A soja é uma planta de origem oriental consumida em larga escala nos países asiáticos, sob as mais diversas formas. Nos Estados Unidos da América do Norte e no Brasil, é a principal fonte de matéria-prima para a extração de óleo vegetal comestível para uso na alimentação humana.

A cultura da soja no Brasil ocupa uma posição de destaque, com uma previsão de produção de mais de 62 milhões de toneladas de grãos na safra 2005/2006, o que representará em torno de 10,1 milhões de toneladas de óleo. A principal utilização da soja é a obtenção do óleo comestível e do farelo para ração animal. Seus grãos possuem em média, 40% de proteína, sendo uma alternativa à proteína de origem animal, pelo elevado teor nutritivo, baixo conteúdo de gorduras e não contêm colesterol nem lactose.

## 2.4. Hidrólise de Óleos e Gorduras

Triglicerídeos, em presença de água e catalisador, sofrem hidrólises reversíveis, liberando glicerol e ácidos graxos. Os catalisadores podem ser ácidos, bases ou enzimas lipolíticas e a esterificação é a reação inversa à hidrólise (DIECKELMANN & HEINZ, 1988).

Os catalisadores ácidos geralmente beneficiam as reações de esterificação, enquanto os catalisadores alcalinos formam sabões que se dissolvem rapidamente na fase glicerídeo incrementando a velocidade de reação, especialmente em altas temperaturas (DIECKELMANN & HEINZ, 1988). A hidrólise enzimática por lipases é também denominada de lipólise (FENNEMA, 1993) enquanto a hidrólise por catalisador químico é denominada hidrólise química, cisão ou desdobramento. A cisão ou hidrólise dos triglicerídeos pode ser representada, pela Figura 2.2 (MARKLEY, 1960).



**Figura 2.2.** Esquema representativo da hidrólise de triglicerídeos

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação, devido ao aumento da solubilidade da água nos glicerídeos (mono e di). Os principais fatores que afetam esta reação são temperatura, tipo de catalisador, teor de água no meio reacional e a concentração de glicerol liberado na fase aquosa (DIECKELMANN & HEINZ, 1988). A reação procede em estágios, que ocorrem simultaneamente em velocidades diferentes. Nas reações de hidrólise química ou enzimática, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos e monoglicerídeos e estes em glicerol e ácidos graxos. Todas essas reações são reversíveis.

Na indústria oleoquímica, geralmente são utilizados catalisadores químicos inorgânicos (Tabela 2.3), temperaturas (100 a 280 °C) e pressões elevadas (700 psi). O catalisador promove uma maior solubilização dos ácidos graxos em água e um maior contato entre os reagentes, em decurso da formação de emulsões na etapa inicial do processo de hidrólise de glicerídeos (RITTNER, 1996). Na hidrólise química uma menor quantidade de cisão ocorre pela ação da água dissolvida na fase glicerídeo.

**Tabela 2.3.** Catalisadores químicos e inorgânicos

<b>Catalisador</b>	<b>Índice de atividade</b>
Óxido de zinco	6,0
Óxido de magnésio	3,1
Óxido de cálcio	2,3
Hidróxido de lítio	2,0
Hidróxido de sódio	1,7
Hidróxido de potássio	1,4
Hidróxido de amônia	1,1

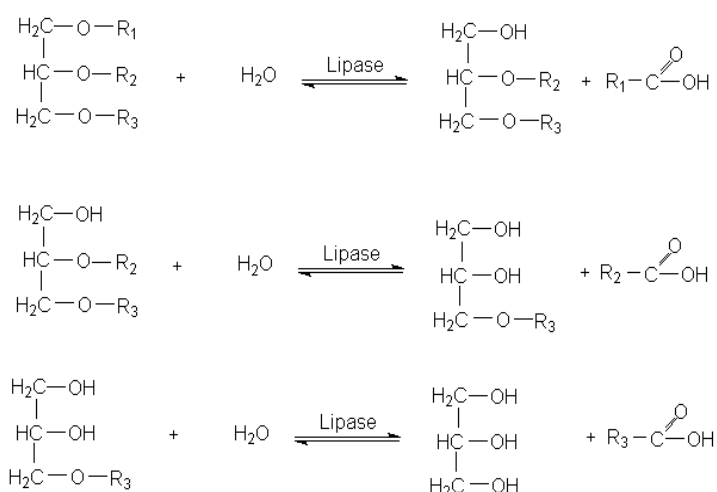
Normalmente o rendimento da hidrólise química é superior a 97% e a mistura final deve ser destilada para remover os subprodutos formados durante a reação (RITTNER, 1996). A hidrólise química de óleos e gorduras é de caráter homogêneo e se desenvolve mediante a dissolução de água nos glicerídeos presentes. A água é mais solúvel nos ácidos graxos do que nos glicerídeos e a solubilidade aumenta com o incremento da temperatura (RITTNER, 1996).

A hidrólise enzimática pode ser realizada em condições amenas (20 a 40 °C e pressão atmosférica), reduzindo o gasto energético em comparação aos processos físico-químicos. Nesta técnica, uma solução aquosa de lipase entra em contato com o óleo, formando uma dispersão líquido-líquido. A produção de ácidos graxos, por cisão enzimática compreende três etapas: preparo da enzima, formação da emulsão e separação do ácido graxo da água. A produção de ácidos graxos inicialmente é muito rápida devido a alta velocidade de formação  $d(RCOOH)/dt$  e diminui com a mudança cinética da reação. Os ácidos graxos obtidos apresentam cor clara e podem ser separados da fase aquosa com uma solução ácida (RITTNER, 1996).



Na hidrólise enzimática a reação é catalisada por lipases (EC 3.1.1.3), que compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster – carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes pobres em água (JAEGER & REETZ, 1998).

A hidrólise de ésteres de triglicerídeos ocorre por clivagem seqüencial dos grupos acila no triglicerídeo, de tal forma, que num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeos, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (GUSTONE, 1999; CASTRO *et al.*, 2004), conforme mostrado na Figura 2.5.



**Figura 2.5.** Esquema representativo da hidrólise enzimática

## 2.5. Lipases

A definição clássica de lipases descreve estas enzimas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3) que atuam sobre ligações ésteres presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol (JAEGER & REETZ, 1998), constituindo uma classe especial de esterases. As esterases (E.C. 3.1.1.1) são enzimas largamente distribuídas na natureza e sua atividade enzimática está restrita à hidrólise de ligações ésteres em substratos solúveis em água.

A diferenciação entre lipases e esterases, entretanto, ainda não está completamente definida. SARDA & DESNUELLE (1958) definiram as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos



insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/ água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água.

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG *et al.*, 1991) e da lipase pancreática humana (WINKLER *et al.*, 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas era recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, que ao interagir com a interface lipídeo/ água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases.

Mais recentemente, entretanto, observou-se que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B que apresentam a “tampa” em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER & REETZ, 1998). Por outro lado, as cutinases, enzimas consideradas lipases “verdadeiras”, não apresentam a “lid” e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica.

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, simplesmente como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como esterases (JAEGER & REETZ, 1998).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial dessas duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações ésteres únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (BROCKMAN, 1984). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases podem hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER & REETZ, 1998).

As lipases diferem grandemente com respeito à origem (microbiana, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Elas catalisam *in vitro* a hidrólise ou síntese de um

grande número de diferentes ésteres carboxílicos (YAHYA *et al.*, 1998). Entretanto, todas mostram maior atividade específica para substratos glicéricos (RASAC *et al.*, 1995). As lipases pertencem a um grupo de enzimas interessantes, não apenas pela capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, mas também pela capacidade de catalisarem diferentes reações, como as reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (CASTRO *et al.*, 2004). A diversidade de propriedades das lipases propicia a utilização destas enzimas em diferentes campos de aplicação (PANDEY *et al.*, 1999).

Um grande número de livros textos e artigos referentes à produção de lipases e suas aplicações estão disponíveis (GANDHI, 1997; FABER, 1997; KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998; PANDEY *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2004).

### 2.5.1. Fontes de Lipases

As lipases encontram-se largamente distribuídas na natureza, isto é, em animais, vegetais e microorganismos. Apresentam massa molecular entre 25-75 kDa 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 (BROCKMAN, 1984). As lipases microbianas podem ser produzidas por leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* (BENZONAN & ESPOSITO, 1971), pelos fungos filamentosos *Rhizopus*, *Geotrichum* (IWAI *et al.*, 1975) e *Humicola* (IBRAIM *et al.*, 1987) e pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* (SUGIURA *et al.*, 1977) e *Staphylococcus* (ALFORD *et al.*, 1964). De origem animal as mais utilizadas são as lipases de pâncreas de porco. As de origem vegetal são extraídas da soja, do centeio e do algodão (FABER, 1997).

Entre as lipases disponíveis comercialmente, selecionou-se para o desenvolvimento do presente trabalho, preparações indicadas na literatura para hidrólise de óleos e gorduras, incluindo lipases microbianas (*Candida rugosa* e *Thermomyces lanuginosa*) e lipases pancreáticas (pâncreas de porco).

Amostras comerciais de lipase de *Candida rugosa* (LCR) contêm cerca de 2-11% de proteína e o restante em açúcares e aditivos inertes. A técnica de eletroforese em gel mostra uma proteína única com uma massa de 63 kDa para LCR fornecida pela Sigma (KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998), mas análises mais sensíveis revelam pequenas quantidades de outras proteínas. A biologia molecular tem produzido cinco diferentes isômeros da LCR a partir do levedo da *Candida rugosa*, entretanto todas têm massa molecular similar. Essa lipase é classificada como inespecífica e tem habilidade de liberar todos os tipos de ácidos graxos (de cadeias médias e longas) independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 1997).

Lipases de *Thermomyces lanuginosa* são mais usadas na formulação de detergentes e comercialmente produzida pela Novozymes por fermentação submersa de um microorganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*). Recentemente, um grande interesse tem sido demonstrado no uso dessa preparação enzimática em outras aplicações industriais (COSTA NETO, 2002; SHINTRE *et al.*, 2002).

Lipases pancreáticas têm uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa e são normalmente isoladas de pâncreas ou biles de animais (porco). Por esta razão, são preparações geralmente impuras, contendo diversas outras hidrolases, como esterases, tripsina, proteases, entre outras. A lipase pancreática da Sigma (LPP) contém cerca de 8-20% de proteína e de acordo com informações de literatura (KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998) apresenta como proteínas contaminantes  $\alpha$ -quimotripsina, carboxipeptidase B, proteases, fosfolipases e colesterol esterases. Entre as hidrolases contaminantes, apenas a  $\alpha$ -quimotripsina e a colesterol esterase são consideradas como inibidores potenciais da reação de hidrólise de ésteres (FABER, 1997). Entretanto, essas limitações podem ser superadas pela adição de diversas substâncias, entre as quais podem ser citados íons cálcio e sódio (VERGER, 1997).

### 2.5.2. Especificidade das Lipases

A literatura relata que a especificidade das lipases é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN *et al.*, 1983), como a seguir descrito:

⇒ **Especificidade para substrato:** Essa característica se refere a diferentes velocidades de reação apresentadas por uma mesma lipase sobre triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, contendo ácidos graxos de

cadeia longa ou curta. A lipase pancreática apresenta maior taxa de hidrólise sobre o triglicerídeo (TG) e a atividade hidrolítica vai decrescendo na ordem dos substratos 1,2 (2,3) diglicerídeo (DG), 1,3 – DG e 1 (3) monoglicerídeo (MG) (BROCKERHOFF & JENSEN, 1974). O aparecimento de 1,3 DG e 1 (3) MG é dado pela migração espontânea do grupo acila. KHAN *et al.* (1967), relatam que a lipase do leite apresenta maior atividade sobre a tributirina do que a trioleína, ao passo que a lipase do *Achromobacter lipolyticum* exibe atividade oposta sobre aqueles substratos. Outra importante característica da especificidade para substrato está relacionada com a forma física do substrato, em solução ou emulsionada.

- ⇒ **Especificidade posicional:** Essa propriedade é proporcionada pela capacidade em hidrolisar ésteres primários e secundários, com ou sem especificidade. A especificidade posicional em relação ao ácido graxo tem grande importância no emprego das enzimas lipolíticas na produção de ácidos graxos livres a partir de gorduras e óleos, nas reações de interesterificação de óleos e gorduras e na esterificação de ácidos graxos com álcoois.
- ⇒ **Especificidade para ésteres primários:** Algumas lipases hidrolisam preferencialmente ácidos graxos esterificados nos carbonos 1 ou 3 do glicerol, liberando ácidos graxos e 1, 2 (2,3) – DG e 2 – MG. Os 1,2 (2,3) – DG e 1 (3) MG podem sofrer migração acila espontânea convertendo-se em 1-3-DG e 1(3)-MG, os quais são substratos para as lipases. Assim, incubações por tempos prolongados, podem levar a uma completa hidrólise do TG (BROCKERHOFF & JENSEN, 1974). A especificidade posicional 1,3 é observada nas lipases produzidas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas fragi*, *Humicola lanuginosa* e lipase pancreática (BROCKERHOFF & JENSEN, 1974).
- ⇒ **Especificidade para ésteres secundários:** JENSEN (1974) cita a lipase do *Geotrichum candidum* como possuidora de especificidade para ácido graxo, com insaturação no carbono C9-cis. ALFORD *et al.*, (1964), ao contrário, relataram que essa enzima possui forte especificidade para ácido graxo insaturado, independentemente da sua posição no triglicerídeo.
- ⇒ **Enzimas não específicas:** Existem lipases que não apresentam especificidade e todos os ácidos graxos, independentemente da posição no glicerol, são hidrolisados em concentrações equimolares. São incluídas as

lipases do *Geotrichum candidum*, *Candida cylindracea*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* (MACRAE & HAMMOND, 1985).

### 2.5.3. Propriedades Bioquímicas

A maioria das lipases apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e temperatura ótima para atividade máxima entre 40 e 60 °C (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4.** Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes

Propriedades	Fontes de lipases				
	<i>Candida rugosa</i>	Lipase pancreática	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Rhizopus delemar</i>
Massa molecular (kDa)	65	50	54	27,5	44
Especificidade	não específica	1,3 específica	não específica	1,3 específica	1,3 específica
Temperatura ótima (°C)	40	45	40	60	-
pH ótimo	7,5	8,0	6,3	8,0	5,6
Termo-estabilidade (°C)	37 (pH 7)	40 (pH 8 por 30')	55 (pH 6 por 15')	60 (pH 8 por 20')	65 (pH 6 por 15')

Fontes: IWAI & TSUJISAKA (1984); KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER (1998).

Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo microrganismo. Estas variações também dependem do método e do substrato utilizados e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando difícil a comparação apenas com os dados disponíveis na literatura ou fornecidos pelos fabricantes.

#### 2.5.4. Propriedades Cinéticas

As enzimas aceleram a velocidade de uma reação por diminuir a energia de ativação, sem alterar a sua termodinâmica, ou seja: as energias dos reagentes e os produtos da reação enzimática de sua equivalente não-enzimática são semelhantes.

Para se superar a energia de ativação de uma reação, passa-se pela formação de um estado intermediário denominado "Estado de Transição", instável e de alta energia, representado por "Ts", ligado com altíssima afinidade ao sítio catalítico. Nas reações enzimáticas, este composto de transição, "Ts" não pode ser isolado ou mesmo considerado um intermediário, uma vez que não é liberado para o meio de reação; sua formação ocorre no sítio catalítico da enzima.

Como a afinidade do "Ts" ao sítio catalítico é muito maior que ao do substrato, a pequena quantidade de moléculas em "Ts" será rapidamente convertida em produto. Assim, todo o fator que leva a um aumento do número de moléculas em "Ts" aumenta a velocidade da reação. São quatro os mecanismos principais pelos quais as enzimas aceleram uma reação, aumentando a formação de moléculas de substrato em "Ts" (SEGEL, 1979):

**Catálise Ácido-Base:** ocorre com a participação de ácidos com cadeias laterais ionizáveis, capazes de doar ou liberar prótons durante a catálise. A histidina, a cisteína, a tirosina, o glutamato e o aspartato são importantes aminoácidos nestes processos.

**Torção de Substrato:** depende da torção do substrato induzido pela ligação do mesmo com o sítio de ligação da enzima, alcançando o estado de transição e estimulando sua conversão em produto.

**Catálise Covalente:** resulta do ataque nucleofílico ou eletrofílico de um radical do sítio catalítico sobre o substrato, ligando-o covalentemente à enzima e induzindo a sua transformação em produto. Envolve com frequência a participação de coenzimas.

**Efeito de Diminuição da Entropia:** as enzimas ajudam no posicionamento e na definição da estequiometria correta da reação, facilitando os mecanismos anteriores.



Cinética enzimática é a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas e os fatores que influenciam nesta velocidade. A cinética de uma enzima [E] é estudada avaliando-se a quantidade de produto [P] formado ou a quantidade de substrato [S] consumido por unidade de tempo de reação. O complexo enzima- substrato [ES] tem uma energia de ativação ligeiramente menor que a do substrato isolado, e a sua formação leva ao aparecimento do estado de transição "Ts". A formação de produto a partir de [ES] é a etapa limitante da velocidade da reação. Uma reação enzimática pode ser expressa pela equação 2.1.



A velocidade de uma reação enzimática depende das concentrações da enzima e do substrato. A catálise enzimática baseada no estudo clássico de Michaelis-Menten é entendida como a análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influenciam a atividade enzimática, e avaliada por meio do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada. A atividade da enzima, portanto a cinética enzimática, é determinada pela concentração da enzima, concentração de substrato e sua disponibilidade, concentração de co-fatores, concentração e tipo de inibidores (quando presentes), e ainda pH e temperatura.

A Equação 2.2 de Michaelis-Menten propõe o modelo acima citado, como modelo de reação enzimática para apenas um substrato. A partir deste modelo, foi deduzida uma equação, que permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia com a concentração do substrato (BAILEY & OLLIS, 1986).

$$v = \frac{[S] \cdot V_{max}}{[S] + k_m} \quad (2.2)$$

em que:  $k_m$  = constante de afinidade de Michaelis-Menten

$V_{max}$  = velocidade máxima da reação

[S] = substrato

Baseando-se nesta equação pode-se expressar graficamente, e representar o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação enzimática. O  $k_m$  de um substrato para uma enzima específica é característico, e fornece um parâmetro de



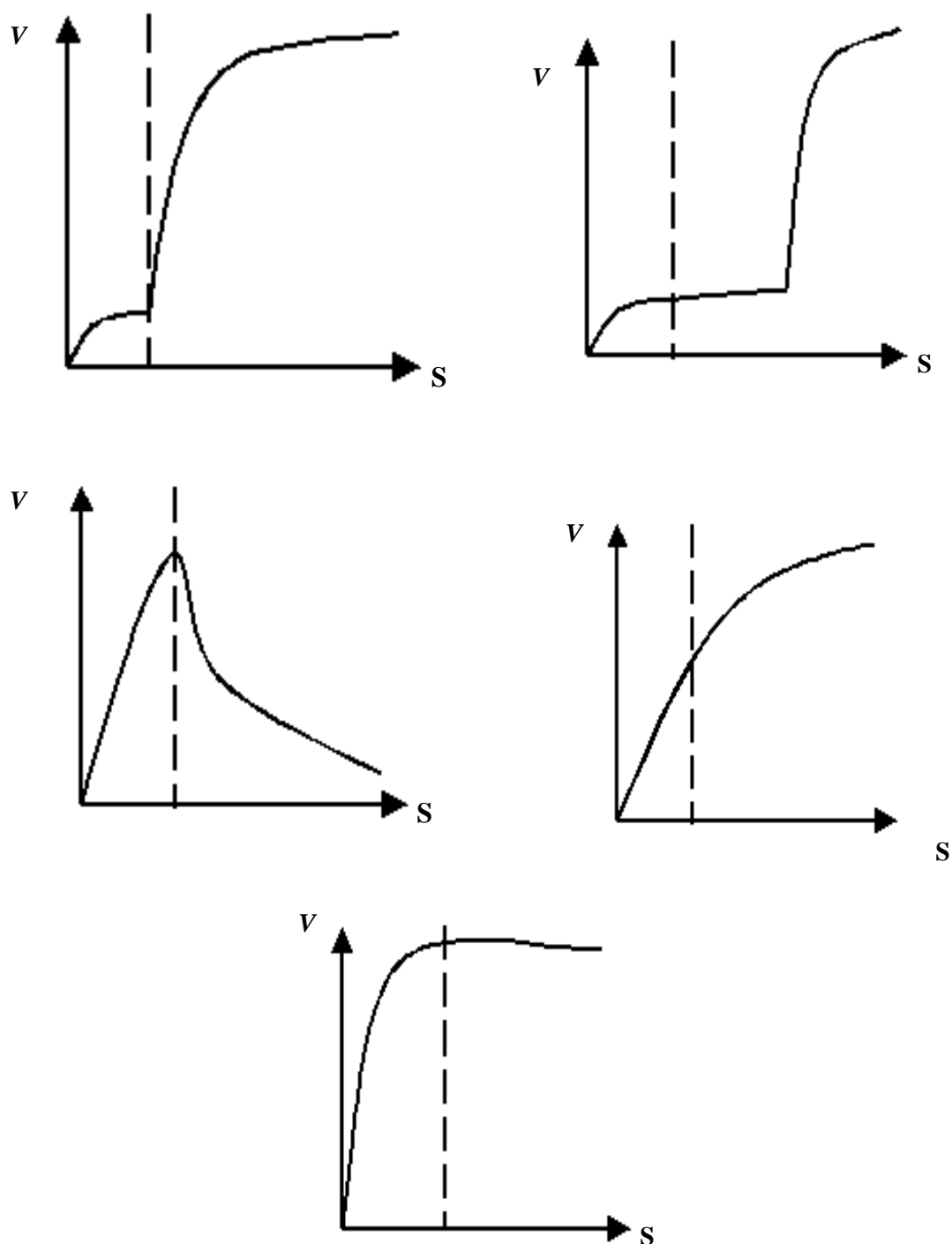
especificidade deste substrato em relação à enzima. Quanto menor o  $k_m$ , maior a especificidade, e vice-versa.

Vários mecanismos têm sido propostos para reações de hidrólise catalisadas por lipases. O modelo cinético mais simples é baseado no clássico mecanismo de Michaelis-Menten aplicado a sistemas emulsificados óleo/ água (GAN *et al.*, 2000; MALCATA *et al.*, 1990). Entretanto, resultados de pesquisas recentes sobre lipases, têm mostrado que é necessário ter prudência na extrapolação de algumas características cinéticas e estruturais observadas para todas as lipases em geral. As atividades catalíticas de muitas enzimas lipolíticas medida na síntese de ésteres carboxílicos, os quais são parcialmente solúveis em água, apresentam diferentes perfis cinéticos, conforme pode ser observado na Figura 2.6.

Apesar da descrição teórica desse processo ter sido desenvolvido há mais de quatro décadas (SARDA & DESNUELLE, 1958), este ainda permanece incompleto (GAN *et al.*, 2000). No entanto, vários mecanismos cinéticos de adsorção e catálise da lipase em sistema de emulsão heterogêneo óleo/ água têm sido propostos, relacionando a atividade da lipase tanto em medidas interfaciais qualitativa (área interfacial por unidade de volume) como quantitativa (características físico-químicas da interface).

BENZONAN & DESNUELL (1968) compararam as velocidades de lipólise de emulsões mais densas e menos densas e verificaram que as constantes de Michaelis-Menten diferem e não se relacionavam diretamente com as proporções massas/ volume do substrato. No entanto, quando a concentração do substrato foi expressa em área/ volume, as curvas de Lineweaver-Burk para as diferentes emulsões do mesmo substrato coincidiram, e um simples valor de  $k_m$  foi obtido independente do grau de dispersão do substrato.

A importância da determinação de um  $k_m$  interfacial tendo como dimensões área/ volume ao invés de massa/ volume foi, por outro lado, questionada por GAN *et al.*, (2000), argumentando que a orientação da molécula éster na interface óleo/ água e a especificidade da enzima para o substrato são os fatores principais na determinação da velocidade de hidrólise. Isto torna claro para ambos os argumentos que o valor interfacial de  $k_m$  não tem significado se a interface lipídeo/ água comportar-se como uma superfície não específica. Essa situação é muito mais complexa se for considerado que a quantidade de enzima lipolítica adsorvida varia com as diferentes interfaces lipídeo/ água.



**Figura 2.6.** Velocidade de reação de hidrólise ( $V$ ) em função da concentração do substrato ( $S$ ) parcialmente solúvel em água. Linhas verticais representam a solubilidade máxima ou concentração miscelar crítica do substrato (éster) usado. Esses perfis observados para diferentes lipases foram baseados em resultados publicados (RANSAC *et al.*, 1995).

NURRY *et al.* (1987) investigaram a dependência do tempo na tensão interfacial óleo/ água durante a hidrólise enzimática utilizando o método gota de óleo e Teflon-Plunger. Pelo significado destas técnicas qualitativas, valiosas informações foram obtidas sobre a influência na densidade do substrato na adsorção da lipase, na catálise e na estereosseletividade.

MUKATAKA *et al.* (1985) propuseram um modelo cinético para reações lipolíticas em um sistema de duas fases, considerando os valores da área interfacial e a fração da fase lipídica. WANG *et al.* (1988) estudaram a cinética da hidrólise de óleos vegetais pela lipase de *Candida rugosa*, usando uma célula de Lewis que fornece uma área interfacial constante.

Complicações adicionais podem ocorrer a partir da mudança da área interfacial durante o curso da reação lipolítica, devido, por exemplo, à formação de ácidos graxos livres. Consequentemente, as características físico-químicas do sistema emulsificado variam em função do tempo, resultando numa mudança da disponibilidade da interface pela enzima e de novos substratos. Devido a estas complexidades mencionadas, a verdadeira cinética da lipase num sistema bifásico dinâmico ainda não está completamente entendida.

Mesmo com as limitações apontadas e considerando que o meio reacional é heterogêneo, e que em alguns casos a interface água/ lipídeo pode impedir que as cinéticas de reações lipolíticas sejam descritas pelas equações do tipo Michaelis-Menten, esse modelo cinético é o mais adotado para descrever tais reações. A metodologia utilizada é baseada na velocidade de reação, expressa em velocidade de formação de ácido graxo por unidade de volume do fluido reagente, medida em diferentes razões de óleo/água. A melhor forma de representar em gráficos a relação entre a velocidade de reação no início de cada reação e razão molar óleo/ água é usando a curva linearizada de Lineweaver-Burk e os dados são analisados para obter valores de  $k_m$  e  $V_{max}$ .

Entretanto, um cuidado rigoroso deve ser tomado na aquisição desses dados cinéticos, tendo em vista que a adição de qualquer componente no sistema emulsificado é responsável, por efeitos qualitativos e quantitativos na interface. Por exemplo, alguns ésteres parcialmente solúveis em água, formam algumas vezes adsorção monomolecular em filmes na superfície das bolhas de ar que podem ser formadas pela agitação da mistura reacional. Este fenômeno é responsável pela grande discrepância nas medidas

de velocidades iniciais, dependendo do tipo de agitação usada (mecânica ou magnética). Em termos de tensão na superfície, este é um dos parâmetros mais decisivos em trabalhos com enzimas lipolíticas. Isto significa que uma comparação válida só pode ser feita entre dados obtidos sob condições experimentais idênticas e preferencialmente no mesmo laboratório.

Para ilustrar esse fato, valores para  $V_{\max}$  e  $k_m$  reportados na literatura para lipase de *Candida rugosa* em diferentes substratos são mostrados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5.** Parâmetros cinéticos da lipase microbiana de *Candida rugosa* em diferentes substratos

Substrato	$k_m$	$V_{\max}$	Referência
<i>Óleo vegetal</i>			
Oliva	11,9 mg/mL	24 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995
	0,42 mM	38,5 U/mg	PEREIRA <i>et al.</i> , 2001
	560 mM	3938 U/mg	FREITAS <i>et al.</i> , 2003
Palma	8,2 mM	1,3 U/mg	KNEZEVICK <i>et al.</i> , 1998
Girassol	4,6 mg/L	1,11 g/L.h	GAN <i>et al.</i> , 2000
<i>Gordura animal</i>			
Sebo de boi	6,9 mg/mL	146 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995
Sebo de porco	7,7 mg/mL	174 U/mg	VIRTO <i>et al.</i> , 1995

### 2.5.5. Reações Catalisadas por Lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações. De fato, embora sua função natural seja a quebra das ligações ésteres de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações ésteres a partir de álcool e ácido carboxílico (síntese de éster). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 2.7, BALCÃO *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2004).



## 2.6. Aplicações Potenciais das Lipases

A versatilidade das lipases tem sido explorada para substituir processos existentes ou para produzir uma série de produtos originalmente considerados como praticamente inviáveis de serem obtidos por via química convencional. Esta habilidade catalítica proporciona a estas enzimas uma aplicação de fronteiras. Elas podem ser empregadas tanto em meio aquoso como orgânico, na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de gorduras e tratamento de couros, conforme ilustrado na Tabela 2.6.

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta conversão enzimática tem sido usada, na obtenção de ácidos graxos poliinsaturados (MUKHERJEE, 1995), por exemplo, o ácido linolênico que é produzido pela hidrólise total ou seletiva de óleos vegetais, seguido da esterificação com *n*-butanol, utilizando lipases de *Brassica napus* ou *Rhizomucor miehei* (JACHMANIAN & MUKHERJEE, 1995).

Lipases podem ser também empregadas em biossensores para a detecção de triacilgliceróis, na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (PANDEY *et al.*, 1999). Na indústria de polpa e papel, os triglicerídeos e ceras contidas na madeira (pich), que dificultam o processo de produção de papel podem ser removidos por meio do emprego de lipases.

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. A indústria de cosméticos e de perfumes pode empregar lipases para a produção de aromas e de surfactantes, ou de emolientes usados em cremes para a pele e cremes bronzadores (SAXENA *et al.*, 1999). A utilização de lipases em meio orgânico não será abordada nesse trabalho. Revisões amplas sobre este específico tema podem ser encontradas nos trabalhos publicados por GANDHI (1997); YAHYA *et al.* (1998); SHARMA *et al.* (2001).

Tabela 2.6. Aplicações potenciais de lipases

Aplicação	Comentários	Referência
<b>Meio aquoso</b>		
- Hidrólise de triacilgliceróis	Métodos convencionais empregam temperatura e pressão elevadas para obtenção de ácidos graxos. O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos graxos.	GANDHI, 1997.
- Maturação e fermentação	Responsável pelo aroma distinto de produtos obtidos na hidrólise seletiva de lipídeos do leite na manufatura de queijos. Hidrólise enzimática da gordura do leite tem sido também usada para produzir aromas de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos.	BALCÃO & MALCATA, 1998.
- Controle enzimático do “pitch”	Problemas com “pitch” são comuns em fábricas de papel. Os motivos são os extrativos que estão presentes na remoção mecânica de celulose assim que ela entra na máquina de papel. Glóbulos de “pitch” tendem a perfurar os equipamentos em diversas partes tais como as caixas de válvulas, filtros e cilindros. As partes perfuradas podem resultar em buracos no papel, que terá então de ser reciclado ou terá uma qualidade inferior. Na pior das hipóteses, o rolo de papel pode se romper causando dispendiosas paradas na produção. Lipase tem demonstrado ser capaz de reduzir significativamente os depósitos de pitch sobre os cilindros e outros equipamentos.	NOVO NORDISK, 1995.
- Curtumes	Couros crus e peles contêm proteínas e gorduras entre as fibras de colágeno. Antes dos couros e peles serem curtidos, estas substâncias devem ser removidas. O uso de lipases para dissolver ou remover a gordura (desengraxe) está em fase de desenvolvimento como alternativa aos tensoativos solventes. As lipases hidrolisam não apenas a gordura de superfície dos couros crus e peles, mas também a gordura interna da estrutura do couro.	GANDHI, 1997
- Tratamento de efluentes	Usada no tratamento de efluentes ricos em lipídeos como os gerados nas indústrias alimentícias (laticínios, abatedouros, extração de óleos vegetais, entre outras).	MENDES <i>et al.</i> , 2005
- Formulação de detergentes	Usada geralmente em combinação com outras enzimas (proteases e celulases) é responsável pela remoção de manchas de gordura tais como batom, frituras, manteiga, azeite, molhos e as difíceis manchas em colarinhos e punhos. Lipolase ( <i>Humicola lanuginosa</i> ) é empregada na formulação de um grande número de marcas importantes de detergentes em todo mundo, desde 1980.	NOVO NORDISK, 1995.
<b>Meio Orgânico</b>		
- Síntese de ésteres	Usados para produzir ésteres como uma alternativa para síntese química. Além de serem utilizados na produção de essências e fragrâncias, os ésteres também são usados como surfactantes em produtos cosméticos, tais como umectantes e xampus. No caso destes produtos finais, a pureza é de vital importância. A especificidade da reação enzimática da lipase produz ésteres com praticamente nenhum subproduto não desejado.	VULFSON, 1994
- Modificação da composição triglicéridica de óleos e gorduras	Usados predominantemente para valorização de óleos de baixo custo, pela substituição regioseletiva de resíduos de ácidos graxos, visando a obtenção de equivalentes de manteiga de cacau. Estudos estão sendo realizados, principalmente, com a fração intermediária do óleo de palma e com gorduras de frutos exóticos da Índia (sal, mahua, Kakum) e do Brasil (piqui, dendê, babaçu).	FACIOLLI & GONÇALVES, 1998
- Especialidades químicas/ separação enantiosseletivas	Explora as propriedades de estereosseletividade de muitas lipases em meio aquoso ou orgânico para obter compostos opticamente puros. Exemplos incluem: antiinflamatórios (Naproxen, Isobufurin), $\beta$ -bloqueadores (propranolol).	JESUS <i>et al.</i> , 1997.

## 2.7. Hidrólise Enzimática de Óleos e Gorduras

Os trabalhos pioneiros de hidrólise enzimática iniciaram-se com BOTTINO *et al.* (1967), que demonstraram que os componentes dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) presentes em óleo de baleia resistiam à ação hidrolítica por lipase pancreática, resultando acilgliceróis parciais com níveis aumentados em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Considerando que, em sua maioria, os AGPI dos óleos de peixe e outros óleos vegetais estão localizados na posição *sn*-2 do triacilglicerol (STAUFFERT, 2000) os acilgliceróis resultantes da hidrólise parcial por lipases com especificidade posicional *sn*-1 e *sn*-3 perdem os ácidos saturados e monoinsaturados normalmente presentes nestas posições, resultando em um aumento no conteúdo de AGPI e permitindo, por exemplo, a obtenção de *sn*-2 eicosapentaenoil glicerol e *sn*-2 docosaexaenoil glicerol após hidrólise com a lipase obtida de *Mucor miehei* (CARVALHO *et al.*, 2003).

Na hidrólise enzimática de óleos e gorduras são mencionadas diversas lipases como catalisador, como por exemplo, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomas* sp. e lipase pancreática. Sendo mais aconselhável utilizar enzimas não específicas como *Candida rugosa*, porque hidrolisam as três posições do triglicerídeo (MUKHERJEE, 1995). As lipases com especificidade para as posições 1 e 3 convertem triacilgliceróis em diacilgliceróis (1,3) e ácidos graxos. Os intermediários na posição 2 produzem, por migração do grupo acila, diglicerídeos e monoglicerídeos 1 ou 3. A migração do grupo acila ocorre devido à instabilidade química dos diglicerídeos (1,2) e (2,3) e um prolongado período de hidrólise leva ao acúmulo de glicerol e ácidos graxos com desaparecimento dos intermediários.

A atuação da lipase inespecífica de *Candida rugosa* chegou a triplicar a concentração original de DHA após 60% de hidrólise do óleo de peixe. Isso foi atribuído à hidrólise preferencial de alguns ácidos saturados e poliinsaturados à possível “discriminação” desta enzima em relação ao DHA, baseado na especificidade quanto ao tipo de ácido graxo pela enzima (CARVALHO *et al.*, 2003), ou, conforme descrito posteriormente, à especificidade da molécula inteira de TG que contenha o DHA. Esta lipase mostrou-se mais eficiente no enriquecimento de DHA do óleo de atum quando comparada com outras lipases inespecíficas obtidas de *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomas* sp. e com lipase de *Geotrichum candidum*



(específica de ácido graxo) e de *Rhizopus delemar* (*sn*-1,3 específica). Níveis superiores em AGPI  $\omega$ 3 a partir de óleo marinho foram também obtidos utilizando lipase de *Candida rugosa* na forma imobilizada (RICE *et al.*, 1999).

Outros AGPI importantes como linolênico e o ácido araquidônico, têm recebido considerável atenção. HILLS *et al.* (1990), efetuaram uma série de estudos visando concentrar o ácido linolênico a partir de óleos vegetais. Os autores descreveram a hidrólise de óleo de prímula (*Oenothera biennis* L. contendo 9,5% de ácido linolênico) catalisada por lipase vegetal (*Brassica napus* L.). Nas frações MG e DG, o conteúdo de ácido linolênico resultante foi de 45 e 28%, respectivamente, demonstrando a resistência do ácido linolênico à atuação enzimática. SYED RAHMATULLAH *et al.* (1994), relataram posteriormente que lipase de *Candida rugosa* também se mostrou eficiente para o enriquecimento de ácido linolênico após hidrólise parcial do óleo de semente de prímula (*Oenothera biennis* L) e borragem (*Barogo officinallis* L).

A hidrólise do óleo de soja com diferentes lipases foi estudada por PARK *et al.*, (1988) tendo como principal objetivo a comparação das atividades dessas enzimas em sistemas isolados e combinados. Após 10h de reação, foi verificado que os sistemas combinados de lipases microbianas, tais como *Penicillium* sp e *Rhizopus niveous* ou *Penicillium* sp e *Rhizopus delemar* forneceram rendimentos mais elevados de hidrólise (98,0 e 99,5%) que os obtidos em sistemas contendo apenas uma lipase (7,2 e 44,4%).

BILYK *et al.* (1991) estudaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais e animais por lipases de *Candida rugosa*, de *Rhizomucor miehei*, e de pâncreas suíno, em sistemas contendo hexano como solvente. O sistema adotado permitiu a recuperação da enzima por filtração e sua reutilização no processo hidrolítico, não sendo verificado perda significativa de atividade nos ciclos consecutivos.

Na Tabela 2.7 estão sumarizadas algumas pesquisas efetuadas nos últimos dez anos que demonstram o grande interesse na obtenção dos ácidos graxos saturados e poliinsaturados a partir de óleos e gorduras.

Tabela 2.7. Exemplos de processos de hidrólise enzimática de lipídeos

<b>Tipo de óleo ou gordura</b>	<b>Lipase</b>	<b>Proporção óleo: água</b>	<b>Condições reacionais</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referência</b>
Óleo de babaçu	<i>Candida rugosa</i>	3:1	T = 45-55 °C, Tempo = 6-8 h [E] = 300 U/g de óleo Agitação = 300-650 rpm pH = 7,2 - 8,0	Seleção de lipase para hidrólise enzimática do óleo de babaçu e otimização do processo em reatores agitados	QUEIROZ <i>et al.</i> (1996)
Óleo de babaçu	<i>M. miehei</i> e <i>C. cylindracea</i> <i>imobilizada</i>	1:3 a 1:1,6	T = 45 °C [E] = 0,50 -1,67 g/m <sup>2</sup> Meio Tamponado	Estudo de hidrólise enzimática do óleo de babaçu por lipase imobilizada em reator de membrana em regime contínuo	MERÇON <i>et al.</i> (1996)
Azeite de oliva	<i>Candida rugosa</i> imobilizada em Celite	1:8 1:4	T = 37 °C [E]=2 mg do sistema imobilizado Agitação = 120 rpm pH = 7,0	Parâmetros cinéticos da LCR na hidrólise enzimática do azeite de oliva	FADILOGLU & SOYLEMEZ, (1998)
Azeite de oliva	Lipase pancreática Sigma e Nuclear	1:4	T = 37 °C, pH = 8,0 Tempo = 3 h [E] = 1% em relação ao substrato	Determinação de um modelo experimental para reação de hidrólise empregando lipase pancreática	TORALLES, (1998)
Óleo de babaçu	Lipase FAP - Amano	1:5	T = 40°C Tempo = 1-31h [E] = 3-327 U/mL de emulsão	Otimização da hidrólise parcial do óleo de babaçu por planejamento fatorial	OLIVEIRA <i>et al.</i> (1999)
Óleo de pescado	Lipase pancreática- Sigma	1:4	T= 38 °C Tempo = 3h [E] = 1,22% em relação ao substrato	Estudo da viabilidade técnica para a produção de ácidos graxos essenciais a partir do óleo de pescado.	STAUFFERT, (2000)

**Tabela 2.7.** Exemplos de processos de hidrólise enzimática de lipídeos (continuação)

<b>Tipo de óleo ou gordura</b>	<b>Lipase</b>	<b>Proporção óleo: água</b>	<b>Condições reacionais</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Referência</b>
Gorduras de fontes animais	<i>Candida rugosa</i> imobilizada em palha de arroz	1:1	T= 40 °C Tempo = 8h [E] = 0,50g Agitação = 200 rpm	Verificar o desempenho da lipase imobilizada na hidrólise de gorduras de animais com diferentes composições em ácidos graxos	FREITAS <i>et al.</i> , (2003)
Óleo de groselha	<i>M. miehei</i> livre <i>P. fluorescens</i> livre <i>M.miehei</i> imobilizada <i>P. cepacia</i> imobilizada	1:1	T = 40 °C Tempo = 24h [E] = 90U/mL de emulsão	Enriquecimento de ácidos ômega por hidrólise enzimática	ZAREVUCKA <i>et al.</i> (2003)
Óleo de sardinha	<i>Pseudomonas</i> sp imobilizada em cerâmica e diatomite	1:1,5	T = 40 °C Tempo = 24 h [E] = 0,22-0,75% (m/m) em óleo	Concentração de EPA e DHA do óleo de sardinha por hidrólise enzimática	GÁMEZ-MEZA <i>et al.</i> (2003)
Óleo de palma	Lipase SP 398 Novozymes	1: 4 a 1: 40	T = 40 °C Tempo = 2h [E] = 50 -300 kLU/L de emulsão Agitação = 250-2000 rpm	Definir as condições ótimas de hidrólise enzimática do óleo de palma	NOOR <i>et al.</i> , (2003)
Óleo de palma Óleo de girassol	<i>Candida rugosa</i>	0,2:1 1:1	T = 35- 65 °C Tempo = 2h [E] = 25 -250 U/L Agitação= 500 – 1300 rpm	Proposição de um modelo cinético da hidrólise de diferentes óleos com alta concentração de enzima	AL-ZUHAIR <i>et al.</i> (2004)

## 2.8. Fatores que Interferem no Processo de Hidrólise Enzimática

As lipases requerem uma ativação interfacial para sua total atividade catalítica, mecanismo este, originalmente estabelecido por SARDA & DESNUELLE (1958). A interface é considerada como uma superfície imaginária que separa duas fases fisicamente distintas, a qual corresponde em nível molecular a um grupo de duas camadas adjacentes de moléculas ordenadas: uma de natureza mais hidrofóbica e outra mais hidrofílica.

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação nas interfaces, incluindo: i) uma mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa (isso é explicado pelo fato de que nos sítios ativos de adsorção na interface, a lipase assume uma nova conformação espacial); ii) uma maior concentração do substrato local; iii) uma orientação mais favorável do substrato; iv) um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeos representa uma proteção às ligações ésteres.

A existência de uma interface (independente de sua natureza) é crítica, mesmo em presença de solventes hidrofóbicos existe uma pequena quantidade de água ao redor da estrutura da enzima e essa camada de hidratação no sítio ativo fornece a interface necessária local para a ativação da lipase. É importante ressaltar que, a atividade catalítica das lipases é sensivelmente reduzida na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão das hidrólises de ésteres solúveis em água pelas lipases.

Portanto, uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo da lipólise é devido ao fato da atividade das lipases depender fortemente de como os substratos lipofílicos são apresentados à enzima, isto é, das propriedades físicas da emulsão que é necessário estabelecer (BROCKMAN, 1984).

A reação de hidrólise de triglicerídeos é a padrão comumente usada na determinação da atividade lipolítica por meio da quantificação dos ácidos graxos livres liberados. Os métodos mais usados para monitorar esta reação são a titulação (PELED & KRENZ, 1981) e a colorimetria com sais de cobre (LOWRY & TINSLEY, 1976). Esta última metodologia pode também ser usada em sistemas micelares, embora uma especial atenção deva ser dada ao efeito do tensoativo Bis (2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio no estabelecimento das curvas de calibração (ROCHA & GARCIA, 1992).

Quando não é utilizado um agente tensoativo, a determinação da atividade lipolítica é muito demorada. O uso de substratos solúveis em água, tais como o p-nitrofenilpalmitato (pNPP), cuja hidrólise é rápida e pode ser acompanhada espectrofotometricamente, não é, contudo, o mais adequado para a determinação da verdadeira atividade da lipase, porque esses substratos também são hidrolisados pelas esterases (ERDMANN *et al.*, 1990). Considerando esta limitação, o método mais usado para determinar a atividade das lipases é o que envolve a titulação dos ácidos graxos livres liberados a partir de um triglicerídeo (em geral, a trioleína), produzido numa emulsão estabilizada com um agente tensoativo.

Desta forma, o processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a adsorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas.

Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de óleos e gorduras usando lipases como catalisadores. Alguns aspectos estudados são (BUHLER & WANDREY, 1987):

- i) Relação fase aquosa/ fase oleosa;
- ii) Eventual ação inibitória dos produtos formados;
- iii) Efeito dos íons cálcio e sódio na velocidade de reação;
- iv) Influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo e
- v) Efeito da agitação na velocidade de reação.

A concentração inicial de reagentes determina a extensão de uma reação. Com relação à dependência da velocidade de hidrólise na quantidade de água os resultados descritos por ROONEY & WEATHERLEY (2001) indicam que o equilíbrio da conversão de emulsões de óleo: água nas proporções de 3:1 e 8:1 foram 90 e 72%, respectivamente. Portanto, quanto menor a razão óleo: água, maior será a extensão da hidrólise. Uma outra forma de aumentar o grau de hidrólise é a remoção do glicerol formado no processo (ROONEY & WEATHERLEY, 2001).

Os sais exercem uma influência na atividade enzimática das lipases, podendo

aumentar ou reduzir a sua ação hidrolítica. Dependendo da fonte de lipase, existem diferenças dos íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e sais biliares. No caso da lipase de pâncreas de porco, o NaCl parece ser essencial em concentrações de 7 mM, na qual mostra um máximo de atividade. Para concentrações superiores a 7 mM a velocidade da reação decresce. É possível que o NaCl promova a ionização do ácido graxo em pH alcalino. Outras lipases como a do pâncreas bovino, não mostram essa necessidade (SHAHANI, 1975).

Lipases de *Geotrichum candidum* mostraram também ser dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (BROCKMAN, 1984). Na hidrólise do óleo de oliva, a atividade hidrolítica foi reduzida em 38% sem adição desses íons no meio da reação. Com lipase de *Penicillium roquefortii*, nesse mesmo trabalho, foi observado que os íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  até a concentração de 1 mM, e os íons  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  promoveram um incremento na atividade, ao contrário do íon  $\text{Fe}^{3+}$  que reduziu severamente a atividade de hidrólise.

Com relação à influência dos íons cálcio, nos trabalhos pioneiros, BENZONAN & DESNUELL (1968), relativos a hidrólise enzimática de óleos já se estudava o efeito de íons sobre a velocidade de reação. Em pesquisas posteriores alguns aspectos importantes sobre esse tema foram elucidados, comprovando a importância do papel de íons como o cálcio sobre a atuação no centro catalítico de alguns tipos de lipases (WANG *et al.*, 1988). O íon cálcio pode estimular a catálise hidrolítica por lipases pelos seguintes mecanismos: i) pela ativação da lipase por meio da alteração da conformação da enzima; ii) pelo aumento da adsorção da lipase na interface óleo/ água; iii) pela remoção de ácidos graxos da interface óleo/ água de tal forma que a lipase pode agir em outras moléculas de água. Entretanto, dados descritos na literatura são contraditórios. Enquanto alguns trabalhos descrevem o íon cálcio como agente estimulante outros relatam sua ação inibitória. Essa inconsistência pode resultar das diferentes condições testadas como pH e teor de cálcio, principalmente quando goma arábica é usada como agente tensoativo (cálcio é um possível contaminante de algumas preparações comerciais de goma arábica). Para concentrações de íons cálcio entre 0 e 5 mM, o efeito estimulante do íon cálcio foi mais significativo para reações conduzidas em pH 7 quando comparadas com reações realizadas em pH 5 (WANG *et al.*, 1988).

Quanto ao efeito dos emulsificantes nas lipases deve se ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo como da sua

concentração (MOZAFFAR *et al.*, 1994). Entre os tensoativos, a goma arábica e o Triton X-100 são os emulsificantes mais usados nas análises da ação lipolítica sobre triglicerídeos (ROCHA, 1999). Os tensoativos iônicos não são convenientes porque podem deslocar o equilíbrio iônico. Entre os tensoativos não iônicos, alguns deles como é o caso do "Tween" e do "Span", também não são adequados à determinação de atividade lipolítica porque, em virtude de possuírem ligações éster nas suas moléculas, podem sofrer ataque por parte da lipase.

Desta forma, as atividades enzimáticas só são comparáveis quando se usa o mesmo tensoativo, na mesma concentração, em todos os ensaios (ROCHA, 1999). O efeito (ativação ou inibição) dos tensoativos sobre a atividade hidrolítica das lipases é importante na indústria dos detergentes, onde as lipases são usadas para facilitar a remoção de gorduras, principalmente em baixas temperaturas (XIA *et al.*, 1996).

O uso de solventes no meio reacional também tem sido descrito como um fator responsável do aumento das velocidades de hidrólise dos triacilgliceróis. MUKATAKA *et al.* (1985) testaram diferentes solventes no processo de hidrólise de óleos em sistema emulsificados, verificando que o isoctano foi o mais adequado.

WANG *et al.* (1988) analisaram a hidrólise do óleo de oliva catalisada pela lipase de *Candida rugosa* em um sistema emulsificado apenas por agitação mecânica, tendo sido verificado taxas de hidrólise similares nos sistemas reacionais na presença e ausência de emulsificante.

O tipo de triglicerídeo também pode interferir na atividade de uma preparação de lipase, de acordo com sua especificidade e definido por JENSEN *et al.* (1983), como uma diferença comparativa nas velocidades de catálises de certas reações. Por exemplo, se um substrato contém três diferentes ácidos graxos A, B e C, eles podem ser hidrolisados em três diferentes velocidades. O monitoramento da velocidade de aparecimento de A, B e C, permite determinar a velocidade aparente de A, B e C, tendo como vantagem verificar a habilidade da enzima em discriminar entre os diferentes ácidos graxos. Se A é hidrolisado mais rápido do que B, e B é hidrolisado mais rápido do que C, então o produto da reação de hidrólise será uma mistura de fração de ácidos graxos, contendo principalmente A e B, uma quantidade mínima de C e uma fração de glicerídeos enriquecido em C. Um destes ácidos pode ser separado em duas frações com o objetivo de produzir o ácido graxo C, quando este for de interesse.

## **2.9. Separação dos Produtos obtidos por Hidrólise**

Os ácidos graxos obtidos por hidrólise, geralmente podem ser submetidos a processos físicos de separação por destilação simples ou fracionada, solidificação e prensagem, cristalização fracionada direta ou em solventes (SONNTAG, 1984; HARALDSSON, 1991).

Os ácidos graxos purificados podem ainda ser submetidos a vários processos de transformação química como hidrogenação, esterificação, etoxilação, sulfatação, sulfonação, oxidação e condensação (MEFFERT, 1984; MARKLEY, 1960). O glicerol recuperado pode ser utilizado na indústria de cosméticos, fumo, adesivos, emulsificantes e na fabricação de resinas.

Em escala de laboratório a separação dos produtos da hidrólise, geralmente é efetuada por adição de solventes polares como clorofórmio ou diclometano. A fase aquosa encontram-se o glicerol, os diglicerídeos e monoglicerídeos, enquanto na fase orgânica os ácidos graxos. A quantificação dessas frações pode ser efetuada por cromatografia de fase gasosa.

Cromatografia de fase gasosa separa os componentes voláteis de uma mistura, de acordo com suas tendências relativas entre adsorver-se no material inerte da coluna cromatográfica e a volatilizar-se e mover-se através da coluna, carregados por um gás inerte. Alguns glicerídeos são naturalmente voláteis, porém a maioria deve ser transformada em um derivado mais volátil. Para a análise e determinação dos ácidos graxos, por exemplo, estes devem ser inicialmente convertidos a ésteres metílicos e em seguida injetados em coluna cromatográfica apropriada. Os ésteres de ácidos graxos mais solúveis no material da coluna dissolvem-se nesse material e aqueles menos solúveis são carregados pela corrente de gás de arraste e emergem primeiro na coluna. Usando-se esta técnica, misturas de ácidos graxos com vários comprimentos de cadeia e vários graus de insaturação, podem ser completamente separadas e quantificadas (FOWLIS, 1995).

## **2.10. Planejamento de Experimentos**

Planejamento de experimentos é uma ferramenta de grande utilidade em pesquisa, pois fornece com uma menor quantidade de experimentos uma maior quantidade de informações e de indicações sobre a influência das variáveis e



principalmente suas interações sobre a variável dependente em estudo (BOX *et al.*, 1978).

Um planejamento de experimentos consiste em testes para investigar um processo produtivo ou um determinado sistema, no qual são alteradas as variáveis de entrada e observadas as respostas obtidas, com objetivo de determinar as variáveis que mais influenciam no resultado de um determinado processo. Esta metodologia, além de ser mais racional, possibilita economia de tempo, material e recursos quando comparada a experimentos feitos por tentativa (BOX *et al.*, 1978).

Com o desenvolvimento dos recursos computacionais que também se tornaram mais acessíveis, essa técnica passou a ser amplamente utilizada. Um planejamento deve passar por várias etapas, sendo uma exploratória, uma de refinamento ou otimização e outra de análise estatística dos resultados finais (BARROS NETO *et al.*, 1995).

Na fase exploratória, empregam-se planejamentos fatoriais de dois níveis, os quais permitem analisar quantitativamente a influência de uma ou mais variáveis sobre uma resposta de interesse, bem como suas possíveis interações, com a execução de um número mínimo de experimentos. Planejamentos desse tipo são de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja verificar se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta (BARROS NETO *et al.*, 1995). São planejamentos de fácil execução e podem ser ampliados para formar um planejamento mais sofisticado quando se deseja conhecer melhor a relação funcional existente entre a resposta e os fatores.

Para executar um planejamento fatorial é necessário em primeiro lugar especificar os fatores e os níveis que serão estudados, bem como selecionar a variável resposta. Os fatores podem ser tanto quantitativos como qualitativos. Os níveis são os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Dependendo do problema, podem existir mais de uma variável resposta, ou seja, resultado observado e analisado no processo produtivo, quando submetido às condições experimentais dos fatores e níveis selecionados.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar, a influência dessa variação no resultado. Isso implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Desta forma, a execução de um planejamento fatorial, em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis para K fatores

(K variáveis controladas) será necessário à realização de  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes, sendo denominado por isso de planejamento fatorial  $2^K$ .

Tendo selecionado as variáveis importantes, os ensaios delineados por uma matriz de experimento são executados e os registros das respostas, para todas as possíveis combinações dos níveis e fatores, efetuados. Os resultados obtidos no planejamento são interpretados a partir do cálculo dos efeitos dos fatores isolados (efeitos principais) e dos efeitos de interação entre os fatores. Tanto os efeitos principais quanto os efeitos de interação são calculados a partir de todas as respostas observadas. A existência de um efeito de interação significativo indica que estes valores devem ser interpretados conjuntamente. Para tanto, traça-se um diagrama contendo as respostas médias em todas as combinações de níveis das variáveis.

A otimização do processo empregando a técnica de planejamento experimental é feita pela metodologia de superfície de resposta (BOX *et al.* 1978). Esta metodologia é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima (máxima ou mínima) da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos no planejamento experimental. O deslocamento ocorre sempre ao longo do caminho de ascensão máxima de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Num planejamento  $2^2$ , utilizando a técnica de análise de regressão linear múltipla e adotando-se a metodologia da superfície de resposta, o modelo estatístico é dado pela seguinte equação:

$$Y(x_1, x_2) = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}(x_1 \cdot x_2)$$

em que:

Y= variável dependente ou variável resposta; b= coeficientes de regressão;  $x_1, x_2$  = variáveis codificadas.

Neste trabalho, esta técnica foi adotada para estudar a influência de alguns fatores que interferem na hidrólise enzimática. O objetivo principal desses testes foi otimizar as variáveis do processo para obter uma maior conversão em ácidos graxos livres na hidrólise do óleo de soja catalisada pela preparação de enzima selecionada.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Enzimas**

Foram utilizadas cinco preparações de lipases comerciais, três de origem de células animais (pâncreas de porco) adquiridas de empresas Kin Master (RS), Nuclear (SP) e Sigma Co (EUA) e duas microbianas (*Candida rugosa*, tipo VII), adquirida da empresa Sigma Co (EUA) e *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase), adquirida da empresa Novozymes (Dinamarca). Essas enzimas foram identificadas no presente trabalho, respectivamente, como: LKM, LNU, LPP, LCR e Lipolase.

##### **3.1.2. Substrato**

Todos os experimentos foram efetuados com emulsões preparadas com óleo de soja comercial, adquirido no mercado local, na forma refinada, da marca Soya.

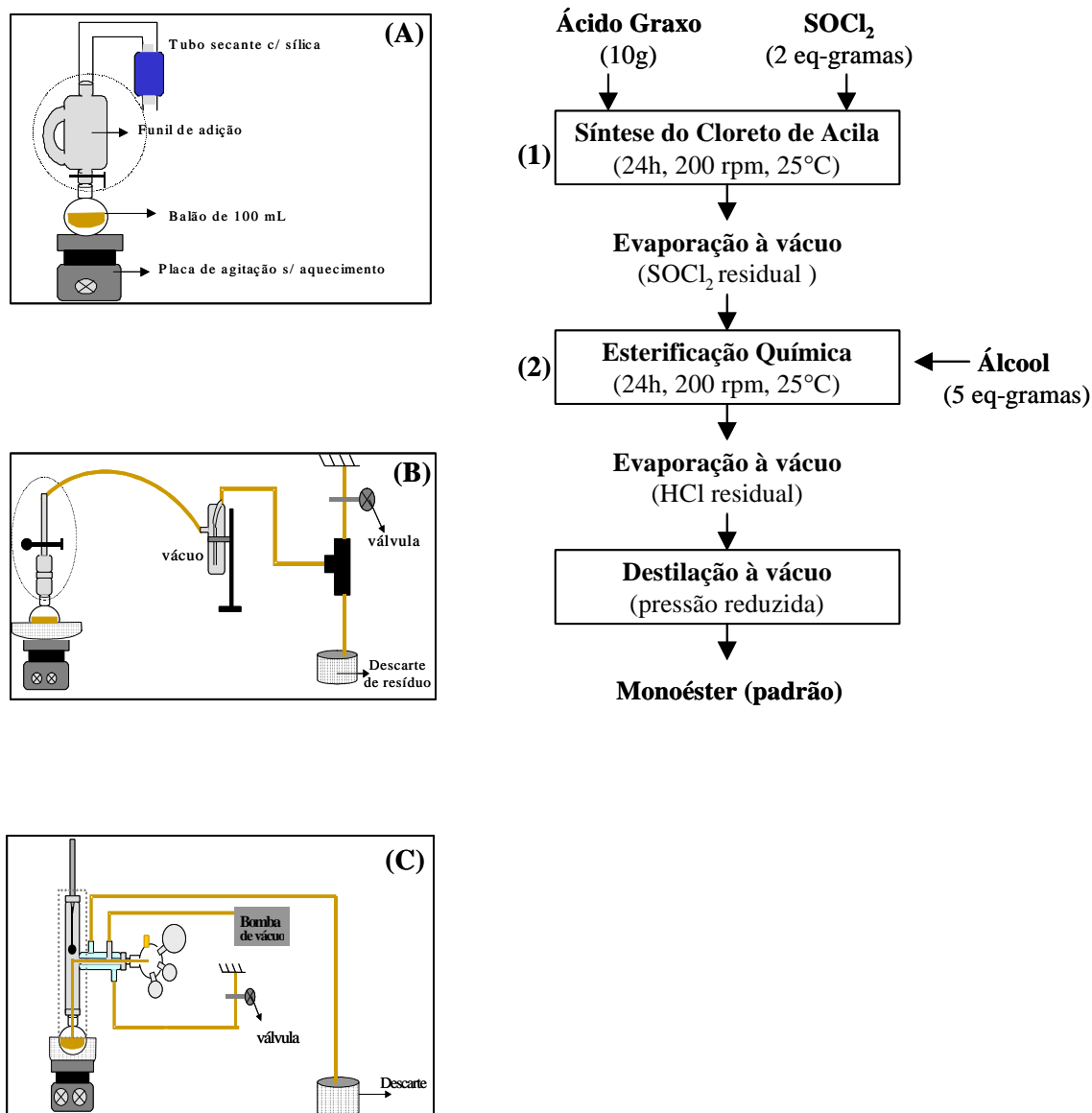
##### **3.1.3. Reagentes**

Outros reagentes utilizados incluem reagentes específicos (albumina sérica bovina e Coomassie Brilliant Blue G-250, ambos adquiridos da empresa Sigma Co (EUA), solventes (acetona, álcool etílico, hexano, diclorometano, éter de petróleo); sais (cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de sódio, fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio, sulfato de sódio, cloreto de amônio); emulsificantes (goma arábica); bases (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio); ácidos (ácido sulfúrico, ácido acético glacial e ácido clorídrico); álcool (metanol). Todos os reagentes foram com grau analítico, adquiridos das empresas Synth e Reagen.

#### **3.2. Procedimentos Experimentais**

##### **3.2.1. Síntese Química dos Monoésteres de Ácidos Graxos**

A Figura 3.1 apresenta o fluxograma referente ao procedimento experimental adotado nas sínteses dos ésteres metílicos, bem como as reações químicas envolvidas e montagens experimentais.



**Figura 3.1.** Fluxograma do procedimento experimental adotado nas sínteses dos padrões cromatográficos.

As sínteses foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL contendo 10 g de ácido graxo e 2,0 equivalentes-gramas de  $\text{SOCl}_2$  por 24 h sob agitação magnética de 200 rpm e temperatura de 25 °C (Figura 3.2 a). O  $\text{SOCl}_2$  residual foi removido do meio reacional por evaporação a vácuo (Figura 3.2 b) e em seguida, foram adicionados ao meio 5,0 equivalentes-gramas de metanol. A reação de esterificação foi efetuada sob agitação magnética de 200 rpm e temperatura de 25 °C por 24 h. O HCl formado na reação e o álcool residual foram removidos do meio reacional por evaporação a vácuo (Figura 3.2 c).

Os ésteres de ácidos graxos foram purificados por destilação a vácuo sob pressão reduzida e suas estruturas químicas confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN  $^{13}\text{C}$ ), empregando o equipamento (Varian, modelo Oxford 300). O Apêndice 8.1 apresenta, respectivamente, o detalhamento dessas sínteses e os espectros obtidos nas análises de RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 3.2.2. Caracterização das Propriedades do Óleo de Soja

O óleo de soja foi analisado quanto aos teores de interesse para o processo, incluindo pH, alcalinidade total, composição em ácidos graxos segundo normas recomendadas por métodos oficiais (AOAC, 1990).

### 3.2.3. Caracterização das Preparações de Lipase

As lipases pancreáticas e microbianas foram caracterizadas quanto à sua atividade em função do pH utilizando-se a reação de hidrólise do óleo de soja na faixa de pH entre 5,0 e 9,0 com incremento de 0,5. Para esse estudo foi empregada a metodologia descrita no item 3.5.2 variando o pH do tampão fosfato de sódio (0,1 M) na temperatura de 37 °C. A influência da temperatura nas atividades das lipases foi estudada na faixa de 37 a 60 °C, pH 7. O efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi determinado por meio da incubação de 1 mL de solução de lipase (5 mg/mL) numa faixa de temperatura de 37- 60 °C em tampão fosfato 0,1 M por 120 min. Em intervalos de 60 min, foram retiradas as amostras, as quais foram imediatamente resfriadas em banho de gelo para interromper a reação de inativação. Em seguida, a atividade residual foi determinada a 37 °C, pela adição de 5 mL de substrato preparado como descrito no item 3.5.2. As constantes de desativação  $k_d$  ( $\text{h}^{-1}$ ), foram calculadas pela equação 3.1.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (3.1)$$

em que:

$A_0$  = atividade enzimática inicial;

$A$  = atividade residual após tratamento térmico por um certo período de incubação (h);

$k_d$  = constante de desativação térmica;

$t$  = tempo (h).

A influência da concentração do substrato foi estudada de acordo com a metodologia descrita no item 3.5.2, variando a porcentagem do óleo de soja entre 10 a 50%. Os ensaios foram conduzidos em pH 7,0 para LCR, pH 7,5 para a LPP e 8,0 para as lipases pancreáticas (LKM e LNU) e Lipolase.

### 3.3. Testes de Hidrólise

#### 3.3.1. Testes de Seleção da Preparação de Lipase

O método consistiu no monitoramento da reação de hidrólise com óleo de soja empregando as diversas preparações de lipase, medindo-se a produção de ácidos graxos, em intervalos de tempo pré-estabelecidos. Parâmetros reacionais, tais como pH e temperatura foram fixados em valores determinados como ótimo para atuação das diferentes preparações de lipase. O substrato foi preparado pela adição direta do agente emulsificante, goma arábica (2,5% m/v), ao óleo de soja. Em balões de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 50 mL do substrato contendo 25% do óleo de soja e pH ajustados com NaOH 1 M (pH 7,0 para a LCR, pH 7,5 para a LPP e pH 8,0 para as lipases LKM, LNU e Lipolase) e relação fixa em unidades de atividades das diversas preparações de lipase (0,25% m/v). Os balões foram incubados por um período máximo de 24 h numa temperatura de  $37 \pm 2$  °C para a LCR, Lipolase, LPP e LKM e  $32 \pm 2$  °C para a lipase LNU, com agitação magnética (200 rpm). Periodicamente foram retiradas amostras de 1mL do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,02 N.

A conversão foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos formados durante a reação de hidrólise dos triglicerídeos presente no substrato, de acordo com a equação 3.2 (ROONEY & WEATHERLEY, 2001).

$$\% \text{ Hidrólise} = \frac{(V_a - V_b) * N * 10^{-3} * M}{m * f} * 100 \quad (3.2)$$

em que:

$V_a$  = volume de KOH da amostra (mL);

$V_b$  = volume de KOH do controle (mL);

$N$  = normalidade do KOH;

$M$  = massa molecular média dos ácidos graxos no óleo de soja (g/mol);

$m$  = massa da amostra (g);  $f$  = fração de óleo usada.

### 3.3.2. Planejamento Estatístico

Com base nos resultados obtidos, foi realizado um estudo do efeito das variáveis: concentração da enzima e concentração de íons sódio, com objetivo de determinar a melhor combinação dessas variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL). Um planejamento fatorial de face centrada constituído de  $2^2$  experimentos, com 4 pontos centrais foi utilizado para melhor entendimento da influência dessas variáveis e de suas interações na porcentagem de hidrólise enzimática do óleo de soja (BOX *et al.*, 1978).

Na Tabela 3.1 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. As reações de hidrólise foram realizadas em um balão de 2 bocas de 100 mL contendo quantidades apropriadas de óleo de soja, goma arábica e NaCl. As misturas foram incubadas sob agitação magnética constante de 200 rpm e a temperatura do sistema foi mantida em  $37 \pm 2$  °C por aquecimento em banho de glicerina. A enzima foi adicionada ao meio e em tempos pré-estabelecidos, foram retiradas amostras para acompanhamento da evolução da reação. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica. Como variável resposta foi considerado o grau de hidrólise, calculado como descrito na equação 3.2. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica (versão 5.0).

**Tabela 3.1.** Níveis das variáveis utilizados nos ensaios de hidrólise do óleo de soja

Variáveis	Níveis		
	Mínimo (-)	Ponto central (0)	Máximo (+)
Concentração de lipase [E] (%)	1,0	2,0	3,0
Concentração de NaCl (%)	0	0,04	0,08

### 3.4. Separação e Recuperação dos Produtos de Hidrólise

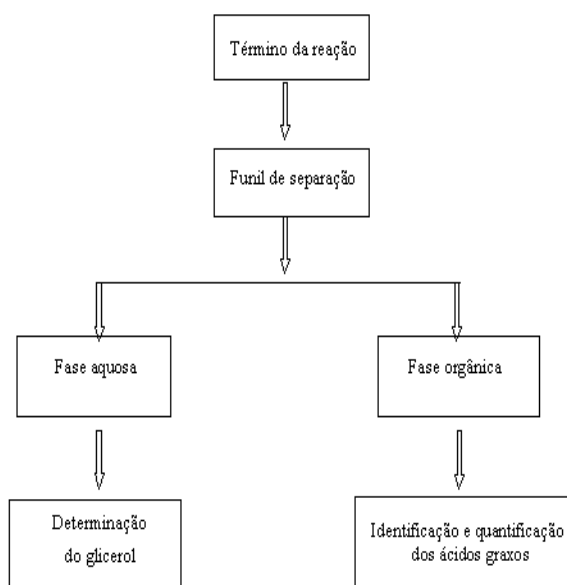
A reação de hidrólise foi finalizada adicionando-se ao reator, uma mistura de 90 mL de clorofórmio e 25 mL de ácido acético glacial, com homogenização por 10 min sob agitação. Em seguida, o conteúdo do reator foi transferido para uma proveta de 1000 mL e o volume completado com água destilada. Posteriormente, o conteúdo da proveta foi transferido para um funil de separação e deixado em repouso para a separação das fases (AOAC, 1990).

A fase aquosa foi separada para determinação do glicerol. A fase clorofórmica,

contendo glicerídeos, foi fracionada e os ácidos graxos livres foram metilados e identificados por cromatografia de fase gasosa. O fluxograma da Figura 3.2 mostra o esquema operacional para fracionamento dos produtos da hidrólise.

A metilação da fase orgânica foi realizada segundo metodologia descrita por HARTMAN & LAGO (1973). Inicialmente as amostras (10 g) foram colocadas em refluxo por 20 min com 10 g de reagente de esterificação. Decorrido esse tempo, as amostras foram resfriadas e transferidas para um funil de separação de 125 mL. Os metilésteres foram extraídos com 10 mL de hexano, seguida de lavagens com água destilada para a eliminação do ácido utilizado na metilação (5 vezes). O extrato final foi desidratado com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrado e concentrado em rota-evaporador à 50 °C. Os ácidos graxos metilados foram levados para o desenvolvimento da análise cromatográfica.

Para a preparação do reagente de esterificação, em um balão de fundo redondo de 500 mL, foram adicionados 2 g de cloreto de amônio e 60 mL de metanol e lentamente 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida, a mistura foi adaptada a um condensador e mantida em refluxo por 20 min, até a completa dissolução do cloreto de amônio.



**Figura 3.2.** Processo operacional do fracionamento dos produtos da hidrólise



### 3.5. Métodos de Análises

#### 3.5.1. Determinação da Concentração de Proteína

O teor de proteína das amostras de preparações enzimáticas comerciais foi dosado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Este método foi o selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, presentes em algumas das amostras de enzimas. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para preparar uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,1 mg/mL, como apresentado no Apêndice 8.2.

#### 3.5.2. Determinação da Atividade Hidrolítica

A atividade hidrolítica das preparações enzimáticas foi determinada, conforme metodologia estabelecida por SOARES *et al.* (1999). O substrato foi preparado pela emulsão do óleo de soja e água destilada na proporção 1:1 e goma arábica a 7% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados: 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática (5 mg sólido/ mL). Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostaticado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela equação 3.3 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. Em paralelo, foi realizado um ensaio controle utilizando água destilada. As atividades foram expressas em µmoles/mg.min (U).

$$U (\mu\text{moles}/\text{mg}\cdot\text{min}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^6}{t \cdot m} \quad (3.3)$$

em que:

$M$  = Concentração molar da solução de KOH (mol/L);

$m$  = Massa de enzima (miligramas);

$t$  = Tempo de reação (min);

$V_a$  = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL);

$V_b$  = Volume do KOH gasto na titulação do controle (mL).

### 3.5.3. Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO & FETT (1998). Em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 2 g de óleo de soja e 25 mL de solução neutralizada de éter de petróleo e álcool etílico (2:1). Adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína e titulou-se a amostra com solução 0,1 N de NaOH. O índice de acidez (%) foi calculado de acordo com a equação 3.4.

$$IA (\%) = \frac{V \cdot F}{M} \times 100 \quad (3.4)$$

em que:

$V$  = Volume de NaOH gastos na amostra (mL);

$F$  = Fator de correção da solução de NaOH 0,1N;

$M$  = Massa da amostra (g).

### 3.5.4. Índice de Saponificação

O índice de saponificação foi determinado conforme metodologia descrita por MORETTO & FETT (1998). Em um frasco Erlenmeyer foram pesados 2 g do óleo de soja e adicionados com auxílio de uma bureta 20 mL de solução alcoólica de KOH a 4%. Adaptou-se o Erlenmeyer a um condensador de refluxo e a amostra foi aquecida brandamente, por um período de 30 min. Em seguida o frasco foi resfriado, e após adição de 3 gotas de fenolftaleína o conteúdo foi titulado com uma solução de HCl 0,5 N, até o desaparecimento da cor rósea. Esse mesmo procedimento foi feito para o controle (água). A diferença entre os volumes de HCl gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de KOH gasto na saponificação. O índice de saponificação foi calculado de acordo com a equação 3.5.

$$IS = \frac{3 \cdot (V_a - V_b) \cdot F \cdot 56,11}{M} \quad (3.5)$$

em que:

$V_a$  = Volume gasto de HCl na titulação da amostra (mL);

$V_b$  = Volume gasto de HCl na titulação do controle (mL);

$F$  = Fator de correção da solução de HCl 0,5N;

$M$  = Massa da amostra (g).

### 3.5.5. Porcentagem de Ácidos Graxos Livres

A porcentagem de ácidos graxos livres foi determinada conforme metodologia descrita por MORETTO & FETT (1998). Em um Erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 8 g da amostra e 50 mL de álcool etílico a 95%, neutralizando com solução 0,1 N de NaOH e fenolftaleína, como indicador. O sistema foi aquecido até a ebulição e a solução titulada, a quente, com a solução de NaOH, até coloração rósea por 15 segundos. A porcentagem de AGL foi calculada pela equação 3.6.

$$\% \text{ AGL } (\%) = \frac{(V_2 - V_1) \cdot N \cdot 28,2}{M} \times 100 \quad (3.6)$$

em que:

$V_2$  = Volume gasto de NaOH na 1ª titulação (mL);

$V_1$  = Volume gasto de NaOH na 2ª titulação (mL);

$N$  = Concentração Normal da solução de NaOH (mol/L);

$M$  = Massa da amostra (g).

### 3.5.6. Concentração de Glicerol

A determinação da concentração de glicerol consiste na reação do glicerol contido na amostra com metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) em solução aquosa ácida para produzir formaldeído e ácido fórmico: este último foi utilizado para deduzir a concentração de glicerol (COKS & VAN REDE, 1966). A amostra contendo entre 1 a 2 g do óleo foi previamente diluída em 50 mL de água destilada, sendo acidificada com ácido sulfúrico 0,2 N, utilizando azul de bromotimol como indicador. A solução foi, então, neutralizada com NaOH 0,05N até coloração azul. Em seguida, 100 mL de solução de metaperiodato de sódio (60 g/L) foram adicionados às amostras e esses mantidos ao abrigo da luz por 30 min. Após este período, 10 mL de solução de etilenoglicol (1:1) foram adicionados à mistura que foi deixada à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por mais 10 min. As amostras foram, então, diluídas para um volume de 300 mL com água destilada e tituladas com solução de NaOH 0,125 N, usando pHmetro para determinar o ponto final, pH de 6,5 para o controle e 8,1 para o substrato hidrolisado. A porcentagem de glicerol contida na amostra foi determinada pela equação 3.7.

$$\text{Glicerol (\%)} = \frac{9,209 \cdot N \cdot (V_1 - V_2)}{MA} \times 100 \quad (3.7)$$

em que:

$N$  = Normalidade da solução de NaOH;

$V_1$  = Volume da solução de NaOH gasto para titular a amostra (mL),

$V_2$  = Volume da solução de NaOH gasto para titular o controle (mL),

$MA$  = Massa de amostra utilizada (g).

### 3.5.7. Análises Cromatográficas

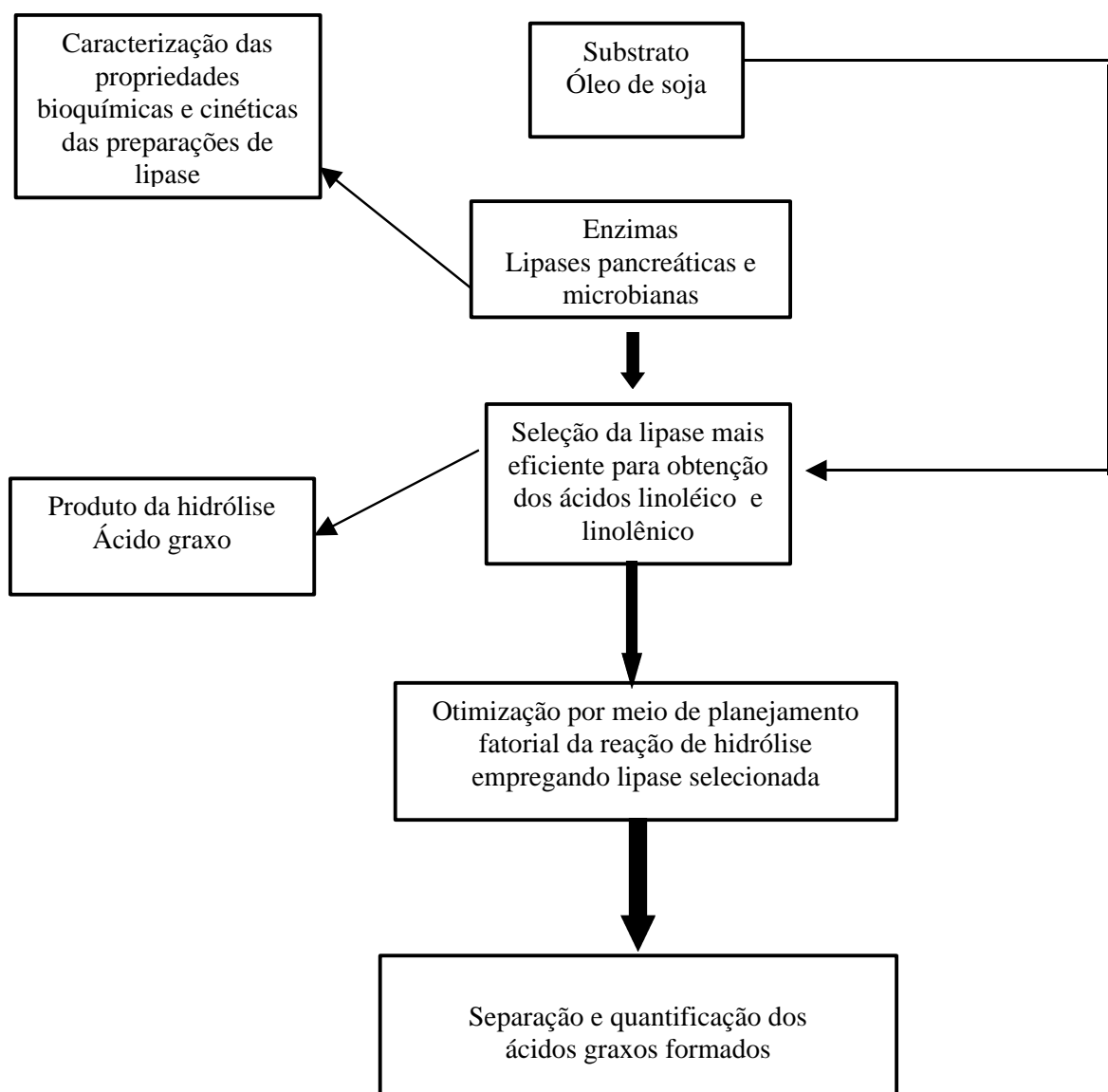
Os ácidos graxos liberados na hidrólise foram analisados por cromatografia em fase gasosa. As amostras submetidas à análise cromatográfica foram previamente metiladas, conforme descrito no item 3.4 e os ésteres metílicos identificados por cromatografia em fase gasosa (Varian, Modelo 3800), empregando uma coluna capilar CP SIL 88 específica para ésteres metílicos (FAME-Varian), com 50 m de comprimento e diâmetros interno e externo de 0,25 mm e 0,39 mm, respectivamente. As condições utilizadas foram: pressão de hidrogênio= 15,9 psi, temperatura do injetor a 250 °C e detector a 300 °C, a temperatura da coluna foi programada para 140 °C por 5 min com taxa de elevação de temperatura de 4°C /min até a temperatura de 240 °C totalizando em 33 min o tempo de análise. A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com padrões e a quantificação foi realizada por normalização de áreas calculadas pelo Programa Star Integrator Varian versão 4.5. Os padrões utilizados na edição e calibração do método cromatográfico estão listados na Tabela 3.2, bem como a forma de aquisição de cada um deles.

**Tabela 3.2.** Padrões cromatográficos utilizados e sua forma de aquisição

<b>Padrões Cromatográficos</b>	<b>Forma de Aquisição</b>
Laurato de Metila, Miristato de Metila, Palmitato de Metila, Estearato de Metila, Oleato de Metila	Sintetizados por via química no Laboratório de Química Fina
Linoleato de Metila	Adquirido da Aldrich (23526-1)
Linolenato de Metila	Adquirido da Sigma (A 3881)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e analisados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho. Os experimentos foram realizados de acordo com o esquema da Figura 4.1 e a Tabela 4.1 orienta o leitor sobre a seqüência de apresentação e discussão dos resultados obtidos, assim como o item da metodologia empregada para a coleta dos dados.



**Figura 4.1** Fluxo operacional do processo

**Tabela 4.1.** Disposição geral dos ensaios realizados

Ensaio realizado	Resultados e Discussão	Metodologia
Padrões cromatográficos de monoésteres de ácidos graxos Síntese química dos padrões cromatográficos Caracterização dos monoésteres por RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , δ, 300Hz) Estabelecimento do método de identificação de quantificação dos ácidos graxos	4.1	3.2.1 Apêndice 8.1
Propriedades do óleo de soja Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja Índice de acidez Índice de saponificação (mg KOH/g) Ácidos graxos livres (%) Glicerol livre (%)	4.2	3.2.2 3.5.3 3.5.4 3.5.5 3.5.6
Propriedades bioquímicas e cinéticas das preparações de lipase Influência do pH Influência da temperatura Estabilidade térmica Determinação dos parâmetros cinéticos	4.3	3.5.2 3.5.2 3.5.2 3.5.2
Seleção da preparação de lipase para a hidrólise do óleo de soja	4.4	
Planejamento experimental	4.5	
Testes de hidrólise nas condições otimizadas empregando as preparações de lipase selecionadas	4.6	
Monitoramento da liberação de ácidos graxos poliinsaturados na hidrólise enzimática do óleo de soja	4.7	

#### 4.1. Estabelecimento do Método de Quantificação dos Ácidos Graxos Livres

Para quantificar os ácidos graxos livres formados na hidrólise do óleo de soja foi desenvolvido um método de análise por cromatografia de fase gasosa.

Devido ao elevado custo dos padrões cromatográficos, foram adquiridos apenas os ésteres dos ácidos poliinsaturados, ou seja, linoleato de metila e linolenato de metila. Os demais ésteres de metila foram preparados por via química de acordo com a metodologia descrita em 3.2.1. Os monoésteres obtidos foram purificados por destilação a pressão reduzida e caracterizados por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton, a fim de se comprovar suas estruturas químicas (Apêndice 8.1).

Em seguida foram estabelecidas as condições para o método de análise como resumidas na Tabela 4.2, em termos de regulagem do aparelho quanto as temperaturas (coluna, ionizador de chama, vaporizador), vazões (gases de chama e gás de arraste), atenuação e zeragem da linha de base no integrador. O cromatógrafo foi operado com a coluna capilar CP-SIL 88 for FAME com 50 m de comprimento com diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme de 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 4.2.** Condições de operação do cromatógrafo para dosagem dos ésteres metílicos por CG

<b>Temperaturas</b>	<b>Coluna</b> 140 °C por 5 min 240 °C por 3 min taxa de elevação de temperatura 4 °C/ min	<b>Injector</b> 250 °C	<b>Detector</b> 300 °C
<b>Vazão dos gases</b>	Nitrogênio 30 mL/min	Hidrogênio 28,9 mL/min	Ar sintético 300 mL/min.
<b>Atenuação: 1</b>			

Para determinar os tempos de retenção de cada éster, as amostras dos ésteres foram diluídas em hexano (30 g/L) e em seguida, 1 $\mu\text{L}$  de cada amostra foi injetada no cromatógrafo (Tabela 4.3). Os métodos foram estabelecidos e ativados segundo procedimento descrito no Manual de Operação da Workstation Varian (Versão 4.5). Em seguida, os métodos foram calibrados com uma injeção de 1 $\mu\text{L}$  da mistura dos ésteres diluídos em hexano (30 g/L) contendo o padrão interno previamente estabelecido (laurato de metila).

**Tabela 4.3.** Determinação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos

<b>Composto</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
C12:0 (Padrão Interno)	15,03	21,54
C16:0	22,24	30,37
C18:1	27,29	30,21
C18:2	28,54	30,52
C18:3	30,57	30,70

#### 4.2. Propriedades do Óleo de Soja

A Tabela 4.4 mostra a composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja, empregando o método cromatográfico estabelecido anteriormente.

A qualidade do óleo utilizado na reação de hidrólise é de fundamental importância. Inibidores catalíticos podem provocar a redução da atividade enzimática. Essa qualidade está relacionada, principalmente, com os teores de ácidos graxos livres e índice de peróxido.

A Tabela 4.5 apresenta a composição do óleo de soja em termos de ácidos graxos livres, acidez, índice de saponificação, utilizando a metodologia descrita na seção 3.5. Por se tratar de um óleo comercial, as concentrações encontradas estão dentro dos valores fixados pela legislação, destacando o baixo teor de ácido provavelmente devido ao método de refino do óleo (5 vezes segundo o rótulo).

**Tabela 4.4.** Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja

<b>Ácido graxo</b>	<b>% (m/m)</b>
C14:0 - Mirístico	0,1
C16:0- Palmítico	10,5
C18:0- Esteárico	3,2
C18:1- Oléico	22,3
C18:2- Linoleico	54,5
C18:3- Linolênico	8,3
C20:0- Eicosanóico	0,2
C 20:1- Eicosenóico	0,9
Saturados	13,80
Insaturados	86,20



**Tabela 4.5.** Propriedades físicas e químicas do óleo de soja

Propriedades	Valores médios
Índice de acidez em ácido oléico (%)	0,24
Índice de saponificação (mg KOH/g)	188,13
Massa específica (g/cm <sup>3</sup> )	0,91
Ácidos graxos livres (%)	0,018
Glicerol livre (%)	0,11
pH	5,0

### 4.3. Propriedades Bioquímicas e Cinéticas das Preparações de Lipase

A caracterização das propriedades catalíticas das preparações enzimáticas testadas neste trabalho: lipases pancreáticas (LKM, LNU, LPP) e microbianas (LCR e Lipolase) foi uma etapa preliminar necessária, tendo em vista que os valores de atividade fornecidos pelos diversos fabricantes são determinados por diferentes metodologias. Além disso, foi necessário estabelecer um parâmetro de comparação da atuação entre as lipases no substrato proposto (óleo de soja) para posterior utilização nos testes catalíticos visando à obtenção dos ácidos ômega.

Na Tabela 4.6 são apresentadas as atividades hidrolíticas, teores de proteína e atividades específicas dessas preparações. Nesta seção são ainda apresentados e discutidos os resultados obtidos quanto às influências do pH e temperatura nas atividades das diversas preparações de lipase, bem como determinadas as constantes de inativação térmica e parâmetros cinéticos.

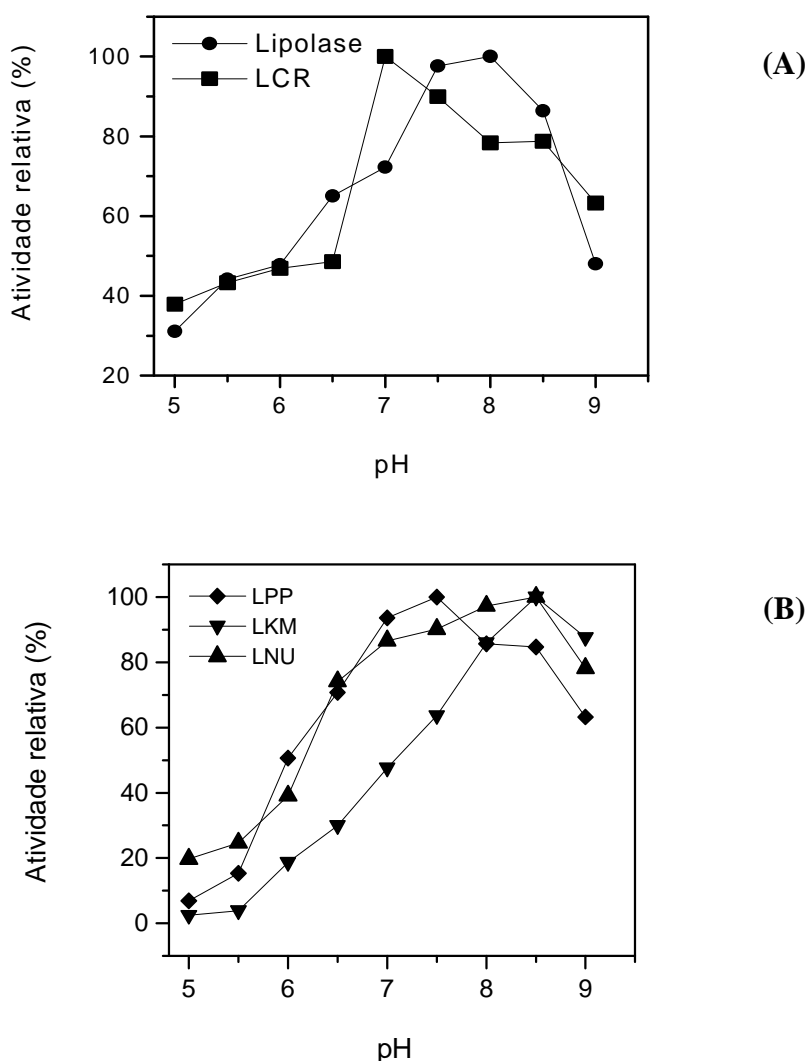
**Tabela 4.6.** Atividade hidrolítica específica das preparações de lipase testadas

Lipase	Atividade (U/mg)	Proteína (mg/g)	Atividade específica (U/g de proteína)
<i>Candida rugosa</i> LCR	8938	58,9	151,75
<i>Thermomyces lanuginosa</i> (Lipolase)	9850	101,4	97,14
Lipase pancreatina LKM	2859	142,8	20,02
Lipase pancreatina LNU	3335	127,3	26,19
Lipase pancreatina LPP	5106	141,7	36,03

(pH 7,0, T= 37°C)

### 4.3.1. Influência do pH na Atividade das Preparações de Lipases

Lipases de diversas fontes apresentam valores diferentes de pH ótimo de atuação. Para investigar a influência do pH no desempenho catalítico das preparações comerciais de lipases (LCR, Lipolase, LPP, LKM e LNU) na reação de hidrólise do óleo de soja, variou-se o pH de incubação na faixa de 5,0 a 9,0, numa temperatura fixa de 37°C. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.2 (a–b), tomando por base os dados descritos no Apêndice 8.3 A.



**Figura 4.2.** Influência do pH na atividade hidrolítica das lipases LCR, Lipolase (A) LPP, LKM e LNU e (B) empregando como substrato emulsão de óleo de soja. Ensaio realizado a 37 °C.

Nos perfis das atividades das lipases microbianas LCR e Lipolase em função do pH (Figura 4.2 a) observa-se um comportamento similar para ambas lipases testadas apresentando uma faixa de atuação ótima entre 7,0 – 8,5 para a LCR e uma pequena variação para a Lipolase, que apresentou faixa de atuação ótima de pH entre 7,5 – 8,5.

O comportamento das lipases pancreáticas LPP, LKM e LNU (Figura 4.2 b) foi similar ao constatado para as lipases microbianas, apresentando uma pequena variação entre as lipases testadas, a LPP apresentou faixa de atuação ótima de pH entre 7,0 – 8,5, a LKM entre pH 8,0 e 9,0 e a LNU apresentou uma atividade lipolítica mais constante a partir do pH 7,0 até o pH 8,5. Um resumo dos valores ou faixas ótimos de pH para cada preparação de lipase é apresentado na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7.** Valores ótimos de pH das preparações de lipase testadas

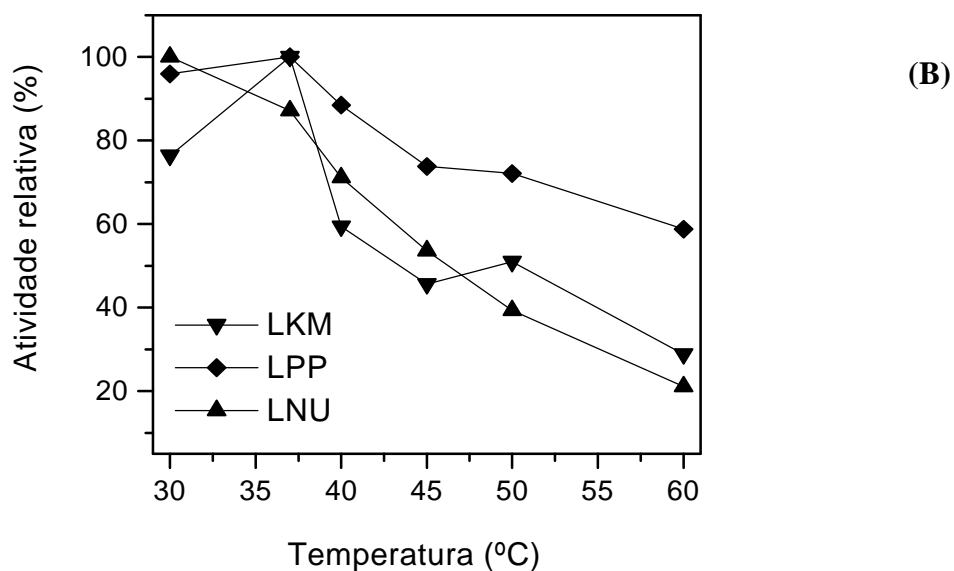
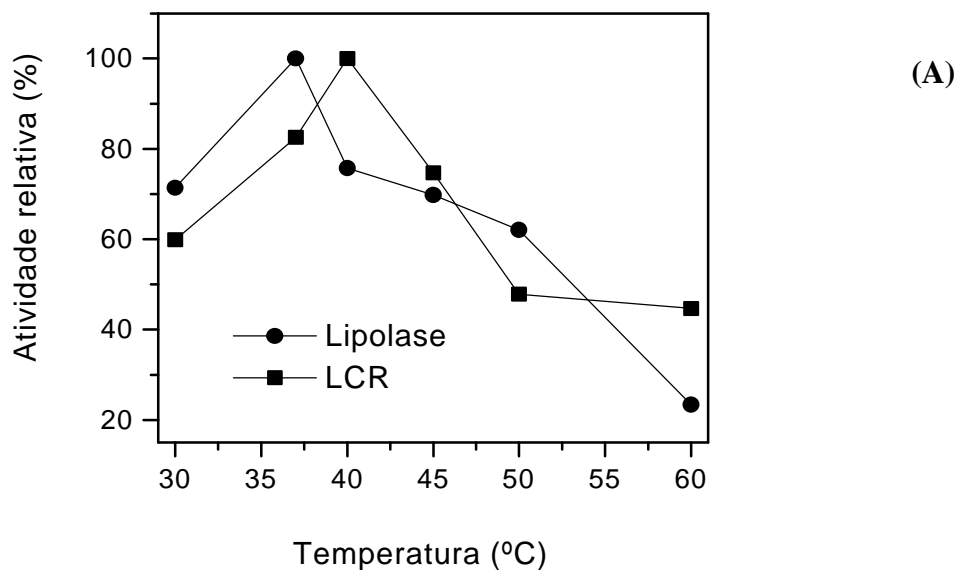
<b>Lipase</b>	<b>Faixa de pH</b>
LCR	7 – 8,5
Lipolase	7,5 – 8,5
LPP	7 – 8,5
LKM	8,0 – 9,0
LNU	7,0 – 8,5

Proporção óleo: água (1:1); Temperatura 37 °C

#### 4.3.2. Influência da Temperatura na Atividade das Lipases

Para a determinação da temperatura ótima de atuação das preparações enzimáticas de lipases (LCR, Lipolase, LPP, LKM e LNU) variou-se a temperatura de incubação entre 40 a 60 °C em seus respectivos valores de pH ótimos de atuação, empregando como substrato emulsão de óleo de soja, conforme metodologia descrita por SOARES *et al.*, (1999). As atividades relativas das enzimas são mostradas na Figura 4.3 a-b (Apêndice 8.3 B).

Para as lipases LCR e Lipolase foram obtidos perfis similares de atividade enzimática em função da temperatura (Figura 4.3 a), com um pequeno deslocamento para temperaturas mais elevadas para a LCR que apresentou uma atividade máxima na temperatura de 40 °C, enquanto que a Lipolase apresentou atividade máxima na temperatura de 37 °C.



**Figura 4.3.** Influência da temperatura na atividade hidrolítica da lipase LCR e Lipolase (A) e LPP, LKM e LNU (B) em emulsão preparada com óleo de soja.

Um perfil similar foi observado para as lipases pancreáticas LPP e LKM (Figura 4.3 b), ambas apresentaram atividade máxima na temperatura de 37 °C. Entretanto, no caso da enzima LNU (Figura 4.3 b) observa-se que a temperatura ótima de atuação dessa preparação foi um pouco inferior às demais lipases pancreáticas testadas. Na Tabela 4.8 são apresentados os valores ótimos de temperatura para cada preparação de lipase.

**Tabela 4.8.** Valores ótimos de temperatura para as preparações de lipase testadas

Lipase	Temperatura ( °C)
LCR	40
Lipolase	37
LPP	37
LKM	37
LNU	30

### 4.3.3. Estabilidade Térmica das Preparações de Lipase

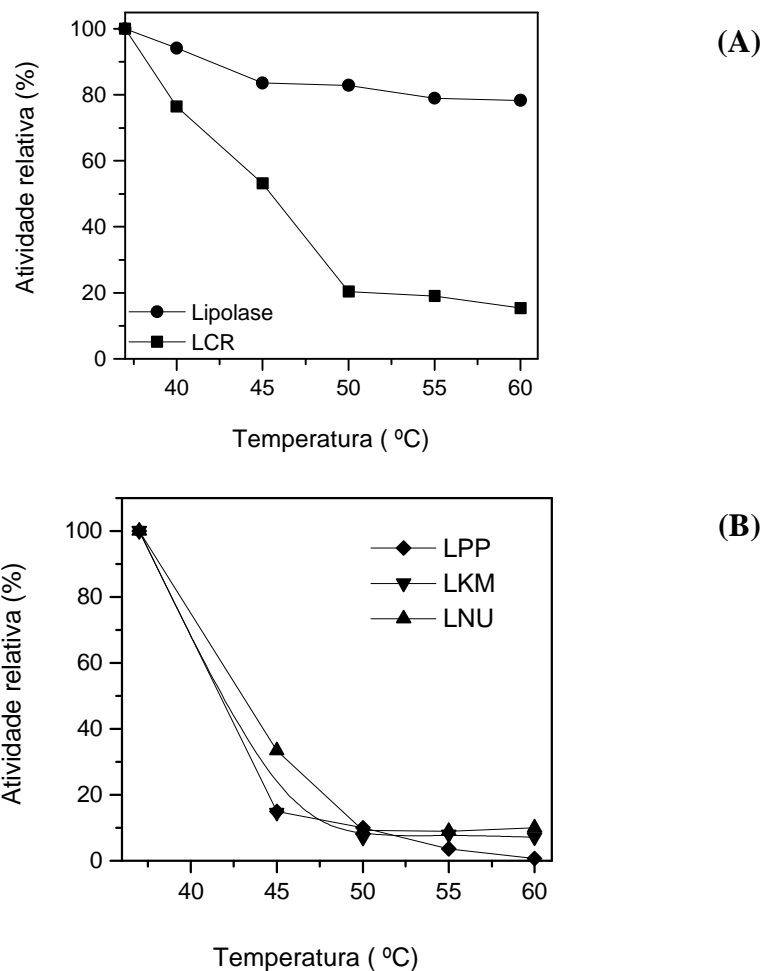
Um aumento de temperatura, geralmente corresponde a um aumento na velocidade de reação por unidade de enzima. Entretanto, um aumento de temperatura também pode promover aumento na velocidade de desnaturação térmica da lipase, reduzindo, portanto, a velocidade de formação de produto.

A estabilidade térmica foi verificada por meio da determinação das atividades residuais após a incubação numa faixa de temperatura entre 37 – 60 °C em tampão fosfato de sódio 0,1M no pH ótimo de cada preparação enzimática por um período de 2 h. As atividades residuais foram determinadas a 37 °C por 5 min e os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.4 (a-b) (Apêndice 8.3 C).

As atividades residuais das enzimas testadas, após tratamento térmico indicam que com exceção da Lipolase, todas outras preparações de lipases são termicamente instáveis acima de 40 °C. A partir desses resultados, calculou-se a constante de inativação térmica ( $k_d$ ) e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) pela equação 3.1. Estes resultados são mostrados na Tabela 4.9.

As lipases de *Candida rugosa* e Lipolase (Figura 4.4 a) apresentaram comportamentos distintos, a Lipolase apresentou uma elevada estabilidade térmica acima de 50 °C, enquanto a lipase de *Candida rugosa* apresentou velocidade de desnaturação acentuada acima de 45 °C.

Para as lipases pancreáticas foram observados comportamentos similares para as três preparações LPP, LKM e LNU (Figura 4.4 b), mas comparando-se as velocidades de desnaturação ( $k_d$ ) verifica-se o menor valor de  $k_d$  a 40 °C para LPP, seguidas da LKM e LNU, sendo que os valores elevados de  $k_d$ , obtidos para LNU, indicam uma baixa estabilidade térmica desta enzima.



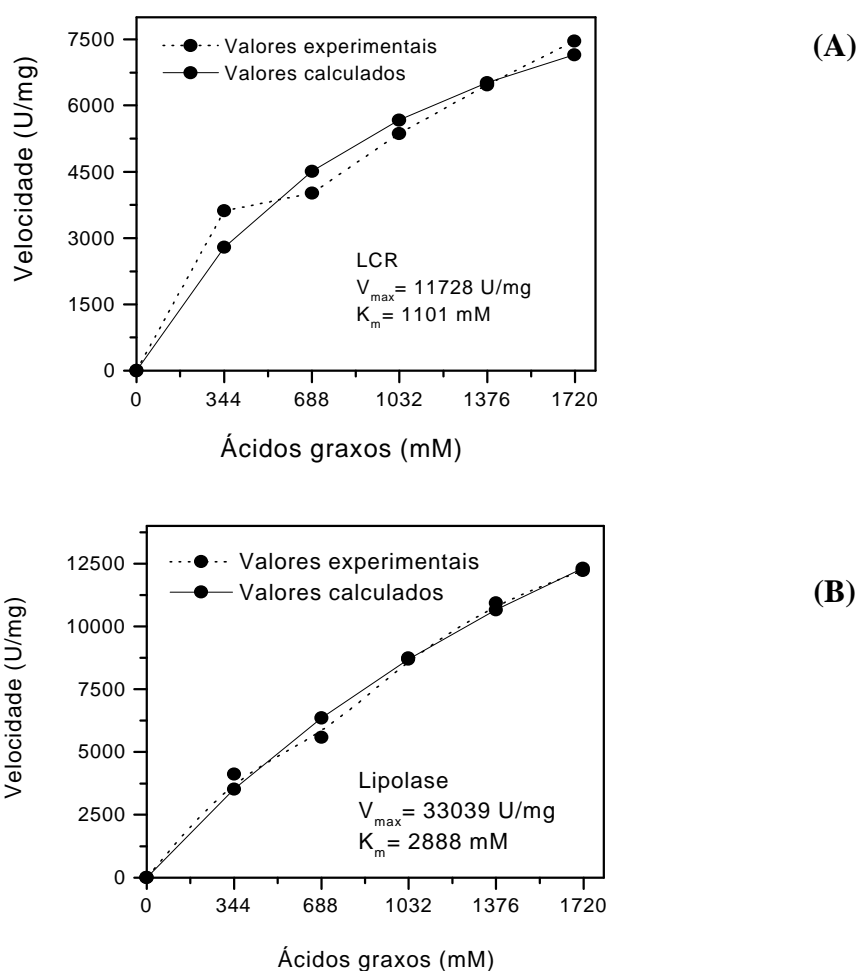
**Figura 4.4.** Estabilidade térmica das enzimas LCR e Lipolase (A), LPP, LKM e LNU (B) em emulsão preparada com óleo de soja.

**Tabela 4.9.** Constantes de inativação térmica e tempo de meia-vida das preparações de lipase, em diferentes temperaturas

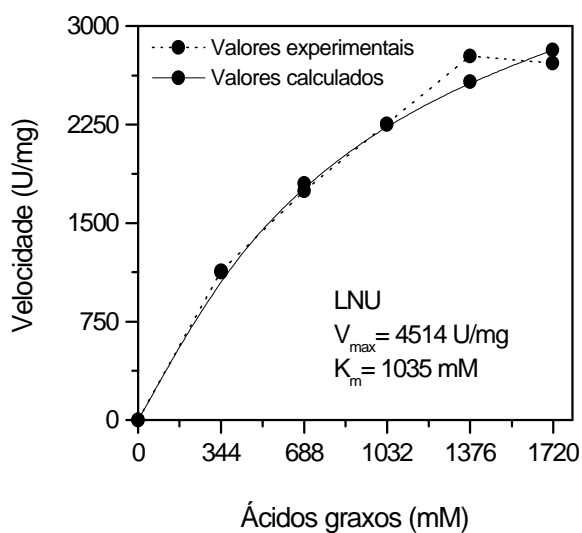
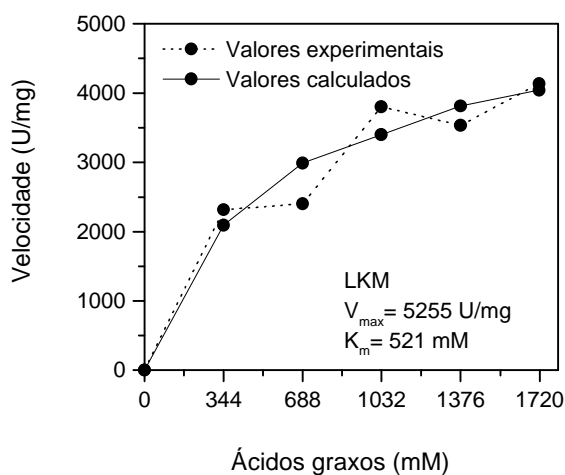
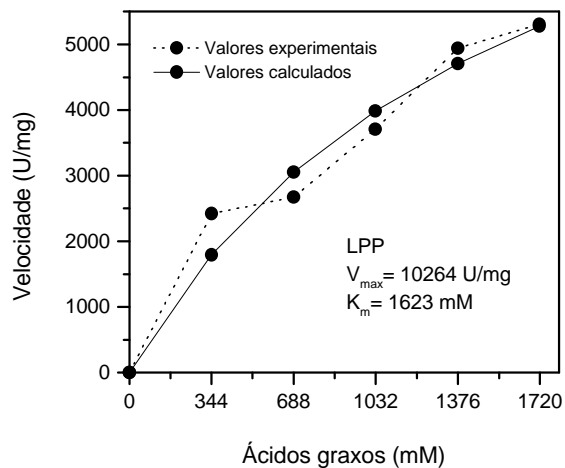
Lipase	Constante de inativação térmica ( $k_d$ ) ( $h^{-1}$ )			Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) (h)		
	40 °C	50 °C	60 °C	40 °C	50 °C	60 °C
LCR	0,20	1,34	1,59	3,46	0,52	0,43
Lipolase	0,06	0,13	0,16	11,55	5,33	4,33
LPP	0,52	1,79	3,52	1,33	0,39	0,21
LKM	0,76	1,91	2,72	0,91	0,36	0,25
LNU	1,18	2,38	5,80	0,59	0,29	0,12

#### 4.3.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das preparações de lipase, a porcentagem do óleo de soja na emulsão foi variada na faixa de 10 a 50% (v/v), correspondendo a concentrações em ácidos graxos entre 344 a 1720 mM. Os ensaios foram conduzidos no valor de pH ótimo para cada preparação de lipase e na temperatura de 37 °C. Nas Figuras 4.5 (a-b) e 4.6 (a-c) são apresentadas as atividades enzimáticas das lipases microbianas e pancreáticas, respectivamente, em função da concentração do substrato preparado nas proporções apresentadas no Apêndice 8.3 D.



**Figura 4.5** Atividade hidrolítica das lipases microbianas (A) *Candida rugosa*, (B) Lipolase em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo de soja /água (37 °C).



**Figura 4.6** Atividade hidrolítica das lipases pancreáticas (A) LPP; (B) LKM; (C) LNU em função da concentração de ácidos graxos nas emulsões óleo de soja /água (37 °C).



Por meio desses ensaios, foi possível deduzir um mecanismo cinético da reação, isto é, a ordem na qual os substratos se ligam e os produtos se liberam da enzima e se esta ordem foi obrigatória.

Os resultados mostrados nas Figuras 4.5 (a-b) e 4.6 (a-c) sugerem que as atividades das lipases testadas em função da concentração de ácidos graxos seguem uma cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada, e no tempo de reação hidrolítica (5 min), não se detectou uma possível inibição por produtos de reação (glicerol ou ácidos graxos) ou pelo decréscimo de água no meio reacional (emulsões preparadas com proporções mais elevadas de óleo).

Utilizando o Programa Enzyme fitter foram calculadas as constantes de afinidade ( $k_m$ ) e as velocidades máximas de reação ( $V_{max}$ ). O ajuste das curvas experimentais pelo modelo proposto levou aos resultados apresentados na Tabela 4.10.

Dentre as lipases microbianas testadas, a lipase LCR foi a preparação enzimática que apresentou a maior afinidade pelo substrato apresentando valor de  $k_m$  2,5 menor que a *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase). Dentre as preparações de lipases pancreáticas a LKM foi a que apresentou a maior afinidade pelo substrato seguida pela LNU (afinidade pelo substrato 2 vezes menor) e LPP (afinidade 3 vezes menor).

**Tabela 4.10.** Valores das constantes cinéticas para as preparações de lipase em emulsões preparadas com óleo de soja

Constantes cinéticas	Lipases				
	LCR	Lipolase	LPP	LKM	LNU
$k_m$ (mM)	1101	2888	1623	521	1035
$V_{max}$ (U/mg)	11728	33039	10264	5255	4514

Tomando por base as propriedades bioquímicas e cinéticas das preparações de lipase descritas nas seções anteriores e sumarizadas na Tabela 4.11, foram realizados testes com o objetivo de verificar o desempenho das diferentes preparações de lipases comerciais na hidrólise do óleo de soja, possibilitando uma comparação do desempenho das enzimas entre si para a seleção de um número menor de preparados, para estudos posteriores mais criteriosos. Nesse estudo, não foi considerada a preparação de lipase pancreática obtida da empresa Nuclear, por apresentar uma baixa estabilidade térmica.

**Tabela 4.11.** Caracterização das preparações de lipase no substrato óleo de soja

Propriedades	Preparação de lipase				
	LCR	Lipolase	LPP	LKM	LNU
Especificidade	ne	1,3	1,3	1,3	1,3
pH ótimo	7,0	8,0	7,5	8,0	8,0
Temperatura ótima (°C)	40	37	37	37	30
$k_d$ (40°C) ( $h^{-1}$ )	0,20	0,06	0,52	0,76	1,18
Tempo de meia-vida 40°C (h)	3,46	11,55	1,33	0,91	0,59
$k_m$ (mM)	1101	2888	1623	521	1035
$V_{max}$ (U/mg)	11728	33039	10264	5255	4514

ne= lipase não específica; 1,3= lipase específica para as posições 1,3

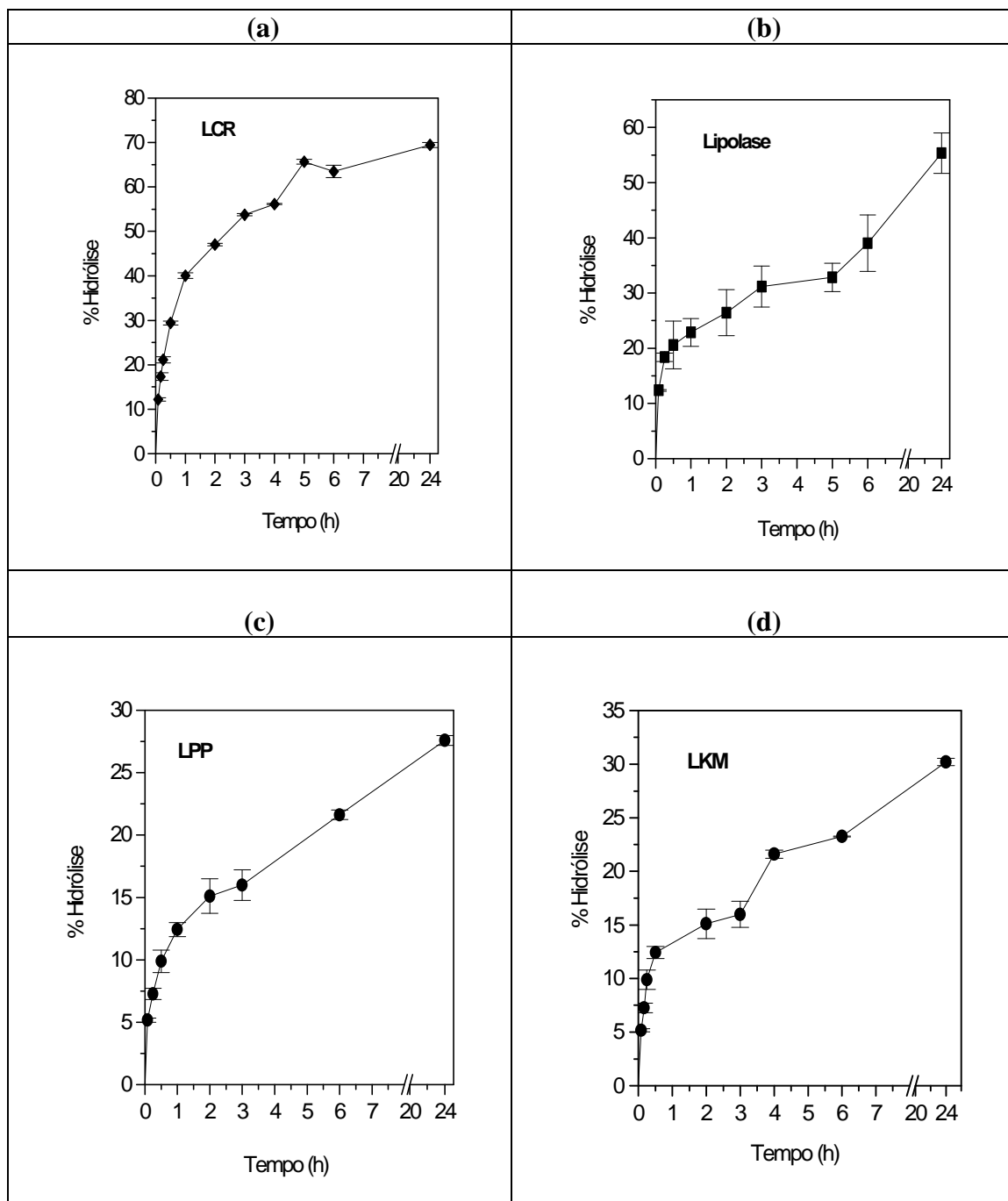
#### 4.4. Seleção da Preparação de Lipase para Hidrólise do Óleo de Soja

Para realização desses ensaios, o óleo de soja na proporção de 25% (m/v) foi emulsificado com goma arábica (2,5 % m/v) e incubado com as diversas preparações de lipase numa concentração fixa em unidades de atividade por grama de óleo (10.000 U/g). Os ensaios foram realizados em duplicata com ajuste de pH da emulsão com NaOH 1M no valor ótimo de atuação de cada lipase e numa temperatura de 37 a 40 °C, com agitação magnética de 200 rpm (Apêndice 8.4).

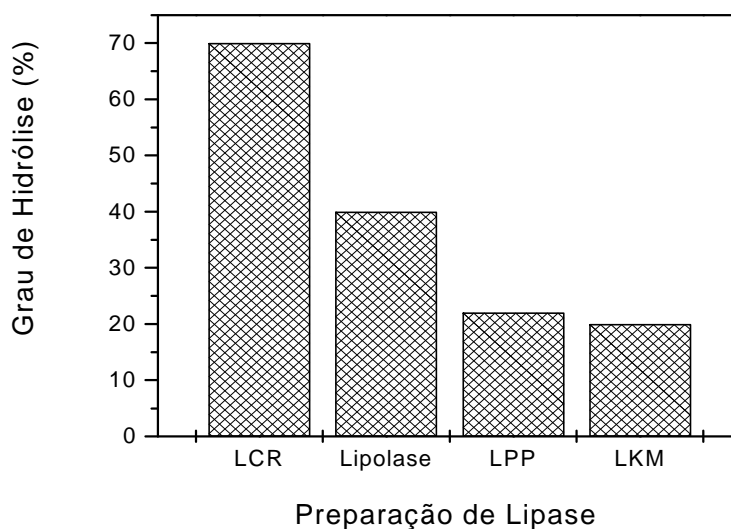
A Figura 4.7 (a-d) apresenta a evolução da hidrólise enzimática do óleo de soja empregando as diferentes preparações de lipase em termos de porcentagem de hidrólise, calculada, conforme descrito na seção 3.3.1.

Os resultados obtidos indicam que todas as lipases testadas foram capazes de hidrolisar os triglicerídeos presentes no óleo de soja. As reações ocorreram com uma velocidade mais elevada nas primeiras 6 h de reação, alcançando graus de hidrólise entre 16,15 e 63,04 %. A continuidade da reação por um período adicional de 18 h, proporcionou um pequeno incremento na concentração de ácidos graxos, atingindo graus de hidrólises entre 20,63 a 69,34%, dependendo da fonte de lipase (Figura 4.8). Nas condições testadas não foi observada reversibilidade da reação.

As lipases microbianas LCR e Lipolase forneceram concentrações mais elevadas em ácidos graxos totais, resultando em graus de hidrólise da ordem de 69,34 e 47,70%, respectivamente para as preparações LCR e Lipolase. Graus de hidrólise similares de 23,82 e 20,63%, respectivamente, foram alcançados nos testes efetuados com as preparações pancreáticas LPP e LKM.



**Figura 4.7.** Perfil de porcentagem de hidrólise enzimática do óleo de soja empregando diferentes preparações de lipase: (a) LCR, (b) Lipolase, (c) LPP, (d) LKM. Ensaios efetuados com emulsão óleo: água na proporção (1:4), temperatura 37-40 °C, agitação magnética (200 rpm).

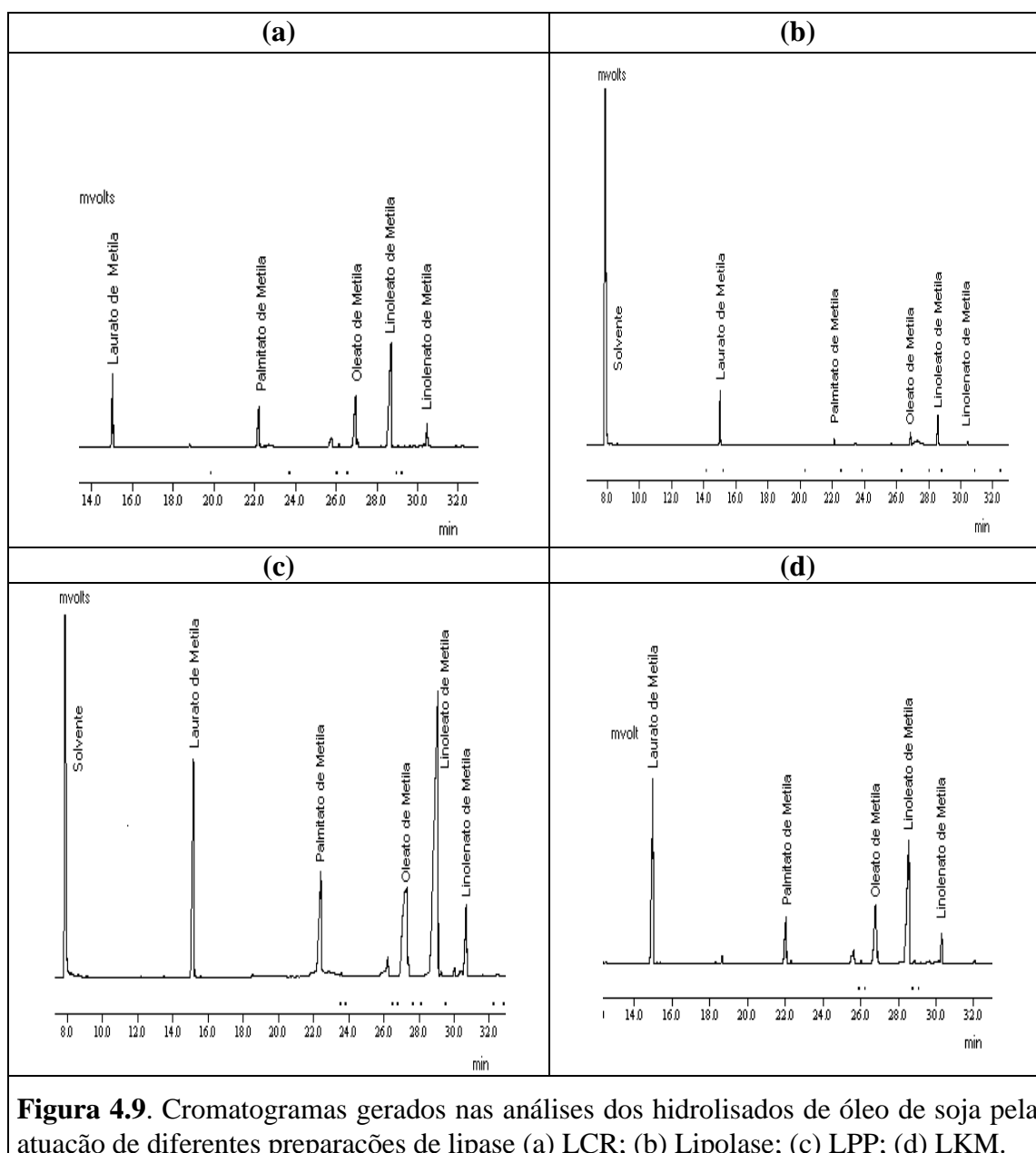


**Figura 4.8.** Porcentagem de hidrólise enzimática alcançada em 24 h do óleo de soja empregando diferentes preparações de lipase.

Em termos de produção de ácidos graxos livres, as lipases microbianas foram mais efetivas para promover a hidrólise enzimática do óleo de soja. Entretanto, a seleção da preparação enzimática mais adequada deve ser feita com base na liberação dos ácidos ômega para o meio reacional. Para tanto, os produtos da hidrólise do óleo de soja foram analisados por cromatografia em fase gasosa, gerando os cromatogramas mostrados na Figura 4.9 (a-d).

Os resultados obtidos (Tabela 4.12) indicam que todas as preparações de lipase foram capazes de enriquecer o meio hidrolisado com ácidos poliinsaturados (ômega). Entre essas, a lipase pancreática (LPP) comercializada pela Sigma, foi a mais eficiente sendo capaz de enriquecer o meio hidrolisado tanto em termos de ácido linoleico (C18: 2) como ácido linolênico (C18: 3), atingindo valores da ordem de 32,97 g/L e 5,85 g/L, respectivamente.

A lipase de *Candida rugosa*, mesmo sendo uma lipase inespecífica, foi a segunda preparação enzimática que se mostrou mais eficiente na liberação dos ácidos ômega para o meio reacional atingindo os seguintes valores 18,46 g/L para o ácido linoleico e 3,38 g/L para o ácido linolênico. Entretanto, a Lipolase não apresentou um desempenho igualmente satisfatório quanto a LCR, pois liberou para o meio reacional somente 8,63 g/L de  $\omega_6$  e 1,05 g/L de  $\omega_3$ .



A lipase pancreática comercializada pela Kin Master, também apresentou um desempenho satisfatório na formação do ácido linoleico (12,90 g/L), entretanto a concentração do ácido linolênico liberado (1,99 g/L) foi 2,5 vezes inferior ao valor alcançado pela LPP. Esses valores podem ser justificados pela presença de enzimas contaminantes (carboxilases) que podem ter limitado o desempenho desta preparação enzimática.

**Tabela 4.12.** Composição em ácidos graxos no substrato e hidrolisados obtidos empregando diferentes lipases

Amostra	Hidrólise (%)	Ácidos graxos (g/L)			
		Palmítico C 16	Oleico C 18:1	Linoleico C 18: 2	Linolênico C 18:3
Substrato	-	0,42	0,73	1,08	0,11
Hidrolisado LCR	69,86	10,95	16,19	18,46	3,38
Hidrolisado Lipolase	52,78	1,08	9,97	8,63	1,05
Hidrolisado LPP	21,34	9,18	23,73	32,97	5,87
Hidrolisado LKM	17,98	3,33	9,57	12,93	1,99

Período de reação de 24h

Os comportamentos das preparações testadas indicam que as lipases pancreáticas, apesar de apresentarem porcentagens de hidrólise menores que as microbianas, liberaram uma maior concentração dos ácidos ômega para o meio reacional. Entre as lipases microbianas testadas apenas a lipase de *Candida rugosa*, apresentou afinidade pelos ácidos graxos essenciais. A menor afinidade pelos ácidos ômega foi verificada para a lipase *Thermomyces lanuginosa* (Lipolase), apesar de ser 1,3 específica, como as lipases pancreáticas.

Tomando por base a concentração de ambos ácidos ômega enriquecidos no meio reacional a seleção da preparação de lipase mais adequada ficou estabelecida na seguinte ordem LPP> LCR> LKM> Lipolase, sendo selecionada para os ensaios posteriores uma lipase específica (LPP) e uma lipase não específica (LCR).

Um tratamento estatístico foi empregado, visando economia de materiais e tempo, por meio da redução do número de experimentos, uma vez que inúmeras variáveis podem afetar a eficiência desse processo, conforme descrito no item 2.8.

#### 4.5. Planejamento Experimental

O objetivo deste conjunto de testes foi determinar a melhor combinação das variáveis para a obtenção máxima de ácidos graxos livres (AGL) a partir do óleo de soja usando a lipase pancreática (LPP). Um planejamento fatorial  $2^2$  com face centrada foi utilizado para melhor entendimento da influência das variáveis: concentração da enzima ( $x_1$ ) e de NaCl ( $x_2$ ).

A matriz do planejamento proposto, juntamente com os resultados obtidos em termos de porcentagem de hidrólise alcançada após 6 h de reação, é mostrada na Tabela

4.13. O progresso dessas reações em função do tempo está ilustrado na Figura 4.10. O detalhamento desses experimentos é mostrado no Apêndice 8.5.

A liberação de ácidos graxos variou entre 168 a 239 mM, correspondendo a porcentagens de hidrólise entre 19,55 a 27,81%. Verifica-se que a formação de ácidos graxos foi dependente da concentração de lipase e do íon sódio. De uma maneira geral, a reação de hidrólise foi favorecida para meios reacionais suplementados com íons sódio, sugerindo que a adição desse sal foi relevante para que ocorresse uma maior liberação de ácidos graxos.

**Tabela 4.13.** Matriz de planejamento experimental e resultados obtidos com a lipase pancreática

Experimento	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Porcentagem de hidrólise
	$x_1$	$x_2$	[E] (%)	NaCl (%)	(%)
1	-1	-1	1,0	0	20,88
2	+1	-1	3,0	0	23,75
3	-1	+1	1,0	0,08	20,34
4	+1	+1	3,0	0,08	27,81
5	-1	0	1,0	0,04	19,55
6	+1	0	3,0	0,04	25,33
7	0	-1	2,0	0	21,44
8	0	+1	2,0	0,08	24,32
9	0	0	2,0	0,04	24,33

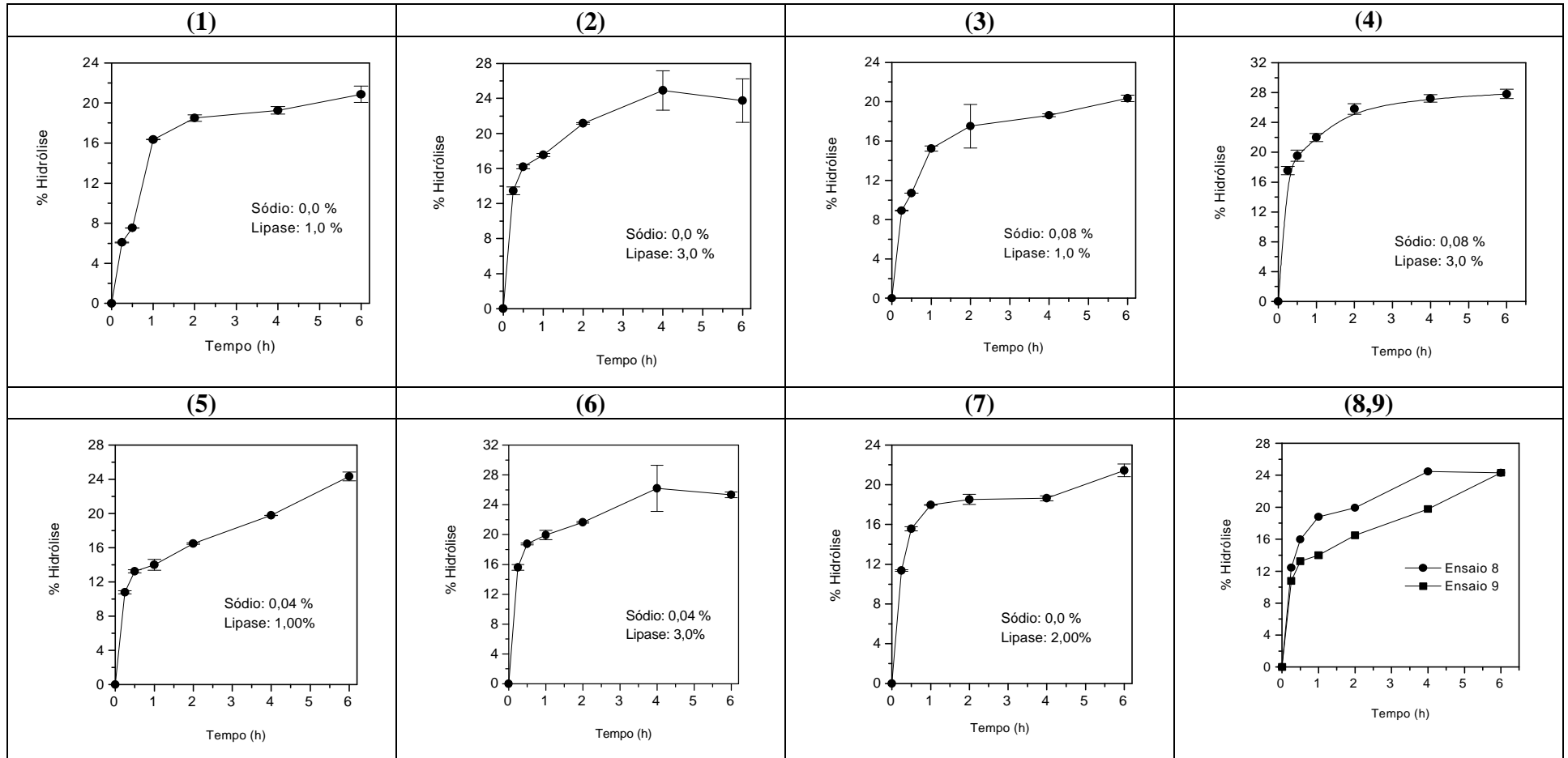
Período de reação de 6h

A Tabela 4.14 reúne os dados da análise dos efeitos, erros-padrão e do teste t de Student. Verifica-se que tanto as variáveis  $x_1$  e  $x_2$ , como a interação ( $x_1x_2$ ) apresentaram influência altamente significativa ao nível de 99% de confiança, sendo selecionados para estimativa do modelo matemático que descreve o processo de hidrólise na região experimental estudada.

**Tabela 4.14.** Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste t de Student para a porcentagem de hidrólise, de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$

Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de t	p
Média	23,08	$\pm 0,260$	88,57	
Lipase ( $x_1$ )	5,37	$\pm 0,638$	8,42	0,0003*
NaCl ( $x_2$ )	2,13	$\pm 0,638$	3,34	0,0205*
Interação $x_1x_2$	2,30	$\pm 0,782$	2,94	0,0322*

$p < 0,01$ ;  $R^2 = 0,9477$



**Figura 4.10.** Perfil da porcentagem de hidrólise em função do tempo na reação de hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase pancreática (LPP) sob diferentes condições operacionais.



Os efeitos principais foram ajustados por análise de regressão múltipla para um modelo linear e a melhor função linearizada pode ser demonstrada pela equação 4.1.

$$\hat{y} = 23,08 + 2,69x_1 + 1,06x_2 + 1,15x_1x_2 \quad (4.1)$$

em que: y é a variável resposta,  $x_1$  e  $x_2$  representam os valores codificados para concentração de enzima e concentração de NaCl.

A significância estatística desse modelo foi avaliada pelo teste F (Tabela 4.15), demonstrando que a regressão é altamente significativa a 95% de nível de confiança e apresenta um bom coeficiente de determinação ( $R^2=0,9477$ ), deste modo, justificando 94,77% a variação total da resposta. Segundo BARROS NETO *et al* (1995), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, o modelo estatístico determinado para a porcentagem de hidrólise foi também preditivo.

**Tabela 4.15.** Análise de Variância para o modelo fatorial proposto

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
$x_1$	43,31	1	43,31	70,84	0,0003*
$x_2$	6,83	1	6,83	11,17	0,0205*
Interação $x_1, x_2$	5,29	1	5,29	8,65	0,0322*
Erro Puro	3,06	5	0,61		
Total	58,48	8			

Ensaio de hidrólise enzimática do óleo de soja nas condições previstas pelo modelo foram efetuados e o comportamento da reação confirmado, sendo que a porcentagem de hidrólise alcançada com 6 h de reação (27,81%), sofreu um pequeno incremento nas 18 h adicionais (34,64%), indicando que nessas condições operacionais não ocorre reversibilidade da reação.

Para a lipase microbiana selecionada (LCR) não foi efetuado o teste de otimização, tendo em vista que as condições utilizadas forneceram resultados elevados de grau de hidrólise.

#### 4.6. Testes de Hidrólise do Óleo de Soja nas Condições Otimizadas Empregando as Preparações de Lipase Seleccionadas

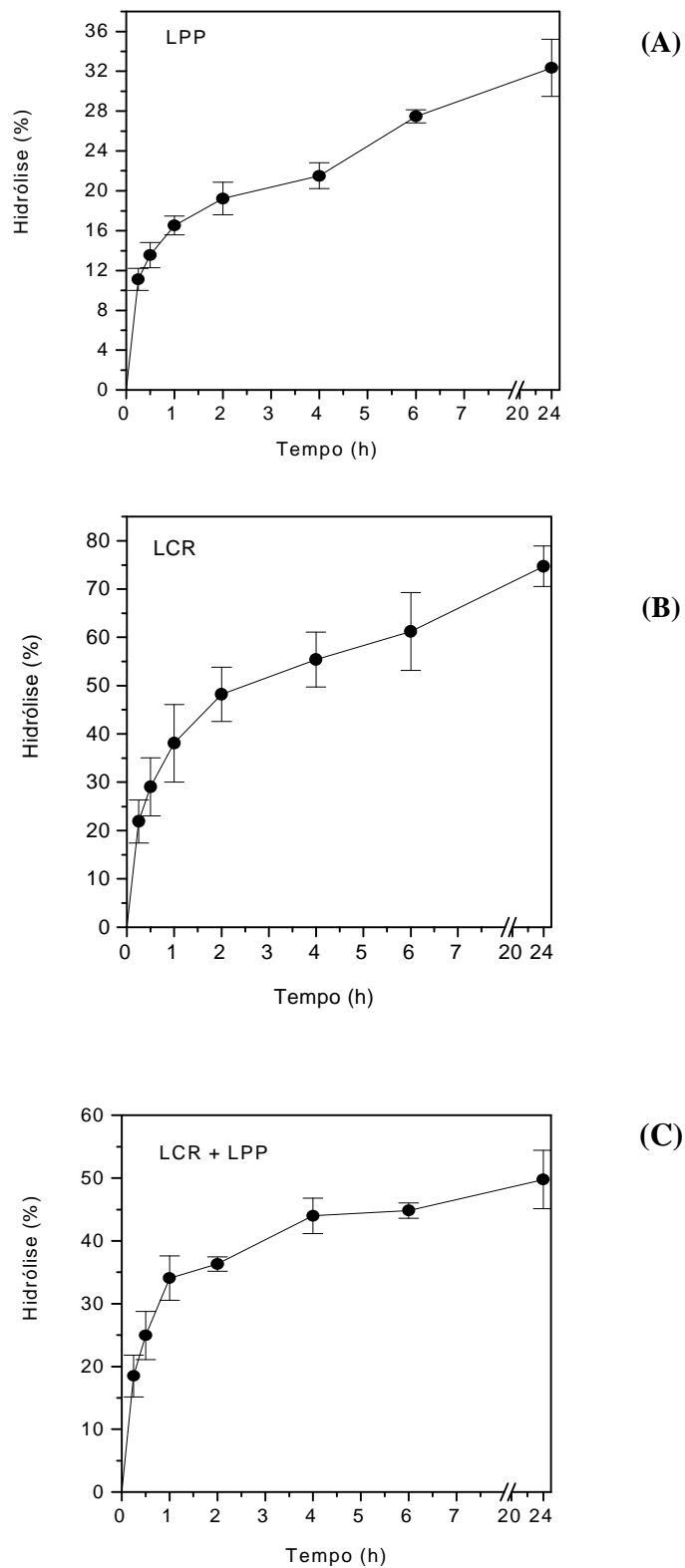
As condições otimizadas por meio do planejamento experimental para a lipase pancreática LPP foram testadas isoladamente e em associação com a lipase microbiana LCR em reações de hidrólise do óleo de soja.

Essa série de experimentos teve como objetivo verificar se a atuação combinada de uma lipase inespecífica com alto poder hidrolítico (LCR), com uma lipase específica para as posições 1,3 do triacilglicerídeo que são as posições preferenciais dos ácidos ômega 3 e 6 (LPP), poderia aumentar a concentração de ácidos graxos poliinsaturados no hidrolisado.

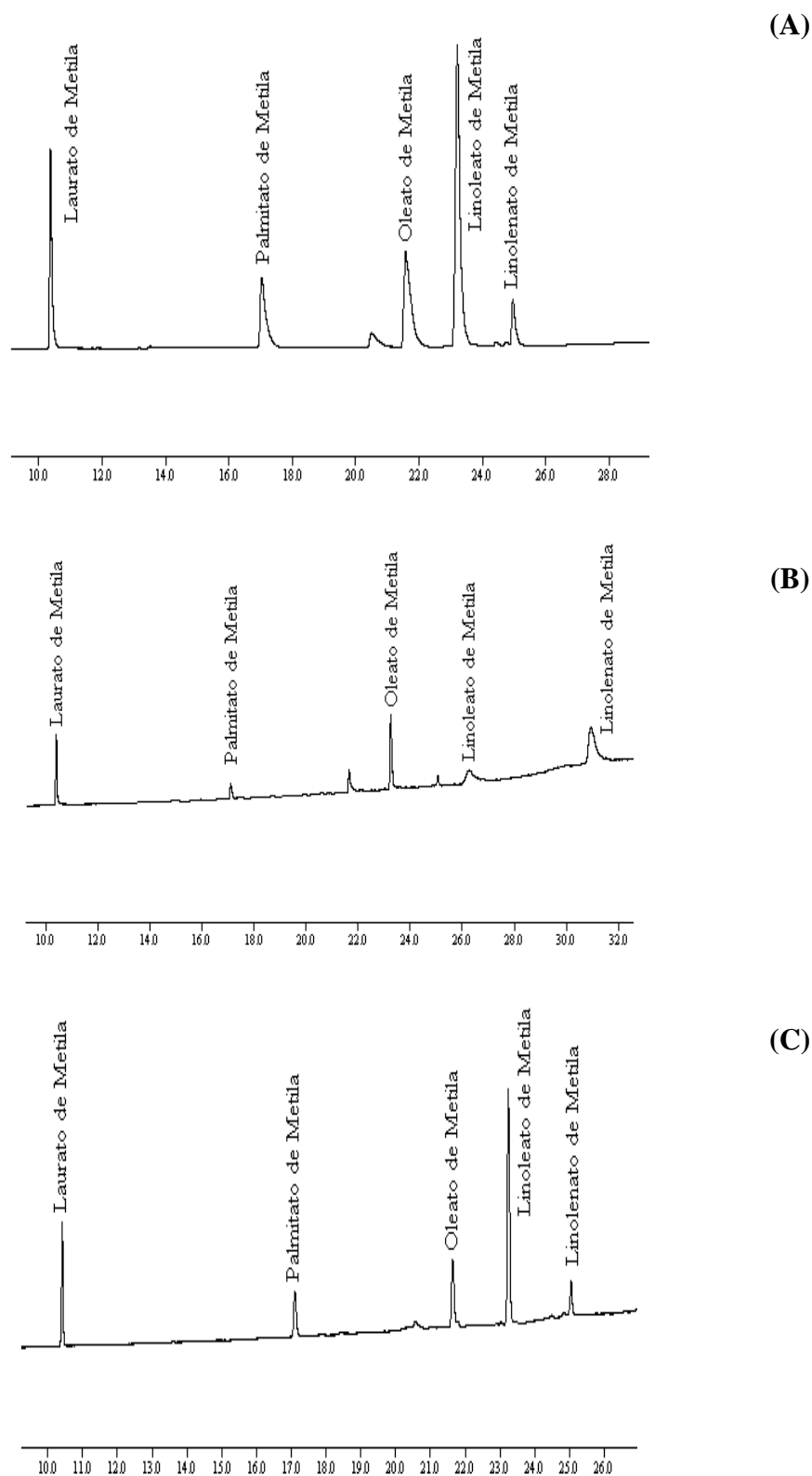
Os resultados obtidos (Figura 4.11 a-c) indicam que em termos de produção de ácidos graxos totais, a atuação combinada das lipases LCR e LPP foi mais efetiva que a atuação isolada da LPP. Entretanto, os dados gerados pela cromatografia (Figura 4.12 e 4.13) comprovam que dentre as preparações de lipase testadas para hidrólise do óleo de soja, o melhor desempenho na obtenção dos ácidos ômega foi alcançado pela atuação isolada da lipase pancreática (LPP). Esta preparação foi capaz de enriquecer o meio hidrolisado tanto em termos de ácido linoleico (C18:2) como ácido linolênico (C18:3), atingindo valores da ordem de 25,95g/L e 3,25g/L, respectivamente. Esses resultados estão detalhados no Apêndice 8.4 G.

A lipase de *Candida rugosa* por ser inespecífica atuou na clivagem da molécula do triacilglicerol de uma maneira aleatória, liberando uma quantidade diversificada dos ácidos presentes na molécula do triacilglicerol. Apesar das hidrólises realizadas com esta lipase terem liberado uma grande quantidade de ácidos graxos para o meio reacional, a contribuição dos ácidos ômega foi muito inferior a obtida pela lipase de pâncreas de porco (LPP). A LCR enriqueceu o meio hidrolisado com valores da ordem de 12,03 g/L e 1,58 g/L, respectivamente dos ácidos linoleico (C18: 2) e linolênico (C18: 3).

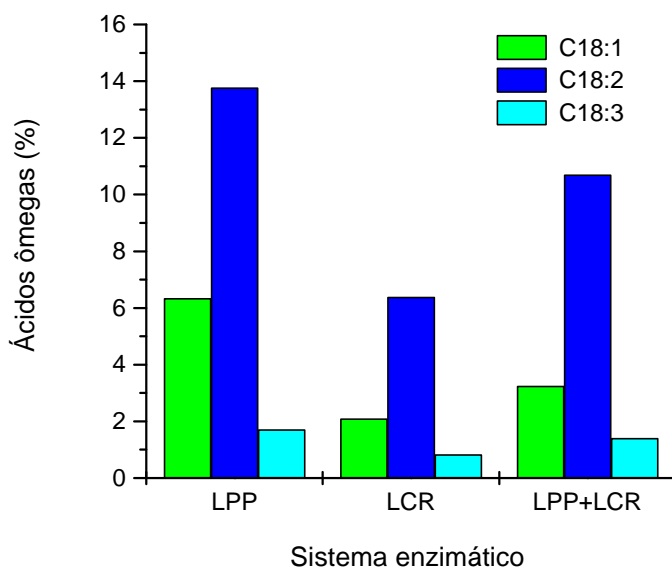
O desempenho da atuação combinada das lipases foi intermediário ao alcançado por cada uma das enzimas isoladamente. Desta forma a associação das preparações de lipase não trouxe nenhum benefício ao processo, tendo em vista que o custo da LCR é três vezes superior ao da LPP.



**Figura 4.11.** Perfil de porcentagem de hidrólise do óleo de soja em função do tempo pela atuação isolada (A, B) e combinada (C) das lipases LPP e LCR.



**Figura 4.12.** Cromatogramas gerados nas análises dos hidrolisados de óleo de soja pela atuação isolada (A, B) e combinada (C) das lipases LPP e LCR..



**Figura 4.13.** Porcentagem de ácidos ômega obtidos na hidrólise enzimática do óleo de soja pela atuação isolada e combinada das lipases LCR e LPP

#### 4.7. Monitoramento da Liberação de Ácidos Graxos Poliinsaturados na Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja

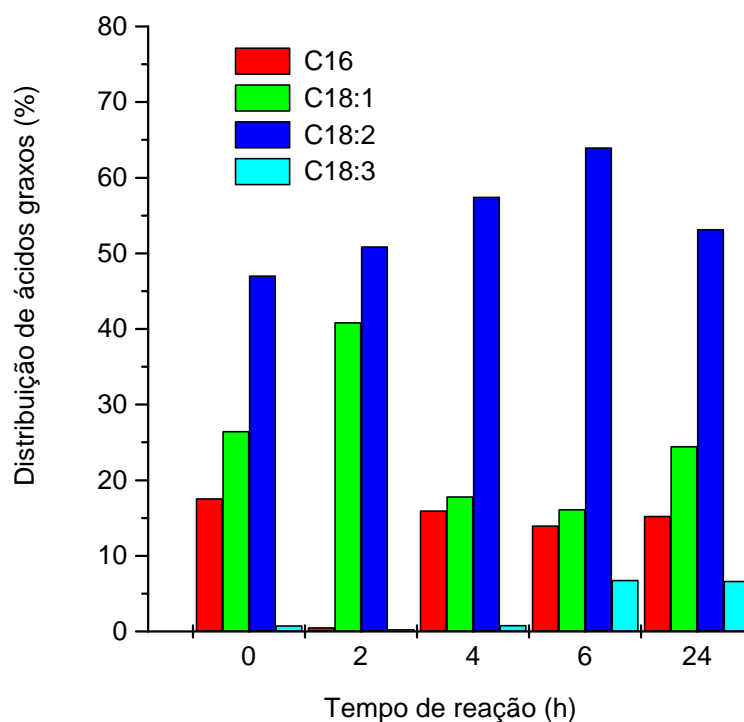
Com o objetivo de monitorar a formação dos ácidos graxos poliinsaturados para o meio reacional, foram realizados experimentos adicionais de hidrólise empregando a lipase de pâncreas de porco (LPP). Os testes foram efetuados por um período de 24 h com amostragens em diferentes tempos de reação, para quantificação da concentração de cada ácido graxo formado (Figura 4.14).

Na amostra inicial, os ácidos graxos estavam distribuídos da seguinte forma: ácido palmítico (17,64 %); ômega 9 (26,47 %); ômega 6 (47,05 %) e ômega 3 (8,82 %). Após 2 h de reação observou-se uma atuação preferencial da lipase LPP sobre os ácidos ômega 6 e 9 elevando a porcentagem de distribuição desses ácidos no meio reacional, respectivamente, para 50,45 % e 40,54 %. A ação da lipase na liberação dos ácidos palmítico e ômega 3 nas duas primeiras horas de reação apresentou uma menor velocidade específica, confirmando a atuação preferencial desta preparação de lipase para os ácidos ômega 6 e 9.

Na amostra referente ao tempo de hidrólise de 4 h, a porcentagem do ácido ômega 6 foi da ordem de 56,63 % e observou-se um aumento da velocidade reacional específica em relação aos ácidos palmítico e ômega 3.

No tempo de reação de 6 h observou-se a ação preferencial da LPP sobre os ômega 3 e 6, sendo que para os demais ácidos analisados a distribuição manteve-se praticamente constante. Ao final da reação (24 h) foram constatadas porcentagens de distribuição de ácidos graxos similares às porcentagens de ácidos graxos presentes no óleo de soja: ácido palmítico (15,34 %); ômega 9 (24,58 %); ômega 6 (53,38 %) e ômega 3 (6,68 %).

O monitoramento da liberação dos ácidos graxos poliinsaturados pode ser útil em processos industriais, minimizando assim o tempo de reação e conseqüentemente o custo global do processo, atendendo desta forma, a produção específica de um determinado ácido de acordo com a demanda do mercado.



**Figura 4.14.** Porcentagem de distribuição de ácidos graxos nas reações de hidrólise do óleo de soja pela atuação da LPP nas condições otimizadas

## 5. CONCLUSÕES

O objetivo deste projeto foi utilizar a tecnologia enzimática em óleos e gorduras, visando a produção de ácidos graxos de alto valor agregado e com baixo consumo de energia. O enfoque foi baseado no uso de preparações de lipases disponíveis comercialmente. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

1. Dentre as preparações de lipases disponíveis comercialmente e inicialmente testadas na hidrólise do óleo de soja, a lipase pancreática (LPP) e microbiana de *Candida rugosa* (LCR) ambas fornecidas pela empresa Sigma, foram as preparações mais eficientes no enriquecimento de ácidos ômega no hidrolisado.
2. As preparações de lipase selecionadas *Candida rugosa* (LCR) e lipase pancreática (LPP) foram testadas na hidrólise do óleo de soja (25% óleo) em regime de batelada simples. Para a *Candida rugosa* (LCR) foram empregadas condições operacionais uma concentração de enzima de 0,5% (m/v) na presença de agente emulsificante (2,5 % m/v), proporcionando maior grau de hidrólise em ácidos graxos totais (%H=69,34). Em termos de ácidos ômega, a lipase *Candida rugosa* (LCR) forneceu hidrolisados de óleo de soja enriquecidos em 18,46 g/L para o ácido linoleico e 3,38 g/L para o ácido linolênico.
3. Para a lipase pancreática (LPP), foi adotada a metodologia de planejamento experimental para otimizar as condições de hidrólise do óleo de soja, considerando como variável resposta a porcentagem de hidrólise. De acordo com o modelo matemático proposto, porcentagens de hidrólises mais elevadas (27,81%), podem ser obtidas empregando uma concentração de enzima de 3,0% (m/v) e de íons sódio de 0,08%. Experimentos nessas condições foram conduzidos por um período adicional de 18 h, proporcionando um incremento na porcentagem de hidrólise para 34,64%, resultando no enriquecimento do meio hidrolisado tanto em termos de ácido linoleico como ácido linolênico, atingindo valores da ordem de 29,46 g/L e 4,55 g/L.
4. Os resultados obtidos sugerem que a LPP demonstrou hidrolisar preferencialmente os ácidos da molécula do triglicérido na seguinte ordem: ácido oléico > ácido linoleico > palmítico > linolênico.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes etapas:

1. Estabelecer um método de quantificação dos diglicerídeos e monoglicerídeos por cromatografia de fase gasosa.
2. Aumentar a porcentagem de óleo na emulsão e adotando a metodologia de planejamento experimental estabelecer condições otimizadas da hidrólise do óleo de soja.
3. Realizar ensaios com agitação mecânica para verificar as condições que maximizam a hidrólise do óleo de soja.



## 7. REFERÊNCIAS

ALFORD, J. A.; SUGGS, F. G.; PIERCE, D. A. (1964). Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides, *Journal of Lipid Research*, v.5, n. 3, p. 390.

AL-ZUHAIR, S.; RAMACHANDRAN, K. B.; HASAN, M. (2004). High enzyme concentration model for the kinetics of hydrolysis of oil by lipase, *Chemical Engineering Journal*, v. 103, n. 1-3, p. 7-11.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (1990). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 4.ed. Champaign.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2<sup>nd</sup> edition, McGraw-Hill, p.180-222.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 392 – 416.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. (1998). Lipase catalyzed modification of milk fat, *Biotechnology Advances*, v.16, n. 2, p. 309 – 341.

BARROS NETTO, N. B.; SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. (1995). *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 1<sup>a</sup>. Edição, Campinas, Editora da UNICAMP, 299 p.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. (1985). *Química de los alimentos*. 2<sup>nd</sup> ed. Zaragoza: Acribia, p. 75 –131 e 153 – 154.

BENZONAN, G.; DESNUELL, P. (1968). Action of some effectors on hydrolysis of long-chain triglycerides by pancreatic lipase, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 164, n. 1, p. 47.

BENZONAN, G., ESPOSITO, S. (1971). Positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 231, n. 1, p. 15-22.

BILYK, A.; BISTLINE, R. G.; HAAS, M. J.; FEAIRHELLER, S.H. (1991). Lipase-catalyzed triglyceride hydrolysis in organic solvent, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 68, n. 5, p. 320-323.

BOTTINO, N. R.; VANDENBU, G. A.; REISER, R. (1967). Resistance of certain long chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis *Lipids*, v.2, n 6, p. 489-493.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. (1978). *Statistics for experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, New York: Wiley & Sons Inc. pp. 653.

BRADFORD, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254.

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. *Nature*, v. 343, n. 6260, p. 767-770.

BROCKERHOFF, H., JENSEN, R. G. (1974). *Lipolytic Enzymes*, Academic Press, (N.Y). p. 34-89.

BROCKMAN, H. L. (1984). *General features of lipolysis: Reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches*. Borgstrom, B.; Brockman, H. L. (Eds.). Lipases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 1- 46.

BROADHURST, C. L.; CUNNANE, S. C.; CRAWFORD, M. A. (1998). Rift Valley lake fish and shellfish provided brain-specific nutrition for early Homo, *British Journal of Nutrition*, v. 79, n. 1, p.3-21.

BUEHLER, M.; WANDREY, C. (1987). Continuous use of lipases in fat hydrolysis, *Feet Wissenschaft Technologie Fat Science Technology*, v. 89, n. 14, p. 598-605.

CARVALHO, P. D.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. (2003). Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids, *Química Nova*, v. 26, n.1, p. 75-80.

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

CLAUSS, J. (1996). Interesterificação de óleo de palma, *Óleos & Grãos*, v. 5, p. 31-37.

COKS, L. V.; VAN REDE, C. (1966). In: *Laboratory Handbook for Oils and Fats Analysis*, Academy Press, London, 1st ed.

COSTA NETO, P. R. (2002). Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja. (Tese de Doutorado). Departamento de Química; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas – UFSC.

DIECKELMANN, G., HEINZ, H. J. (1988). *The basics of industrial oleochemistry. A comprehensive survey of selected technologies based on natural oils and fats*. 1<sup>a</sup> ed. Mulheim/Ruhr, Germany: Peter Pomp GmbH. p. 13 –37 e 177 – 180.

- ERDMANN, H.; VORDERWERLBECKE, T.; SCHMID, R.; KIESLICH, K. (1990). *Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*, edited by L. Alberghing, R.D. Schmidt and R. Verger, GBF. Monographs, Braunschweig Germany, v. 16, p. 425-428.
- FABER, K. (1997) (ed.). *Biotransformation in Organic Chemistry: A textbook*, 3<sup>rd</sup> Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, cap. 1,2 e 3.
- FACIOLLI, N. L., GONÇALVES, L.A. (1998). Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de piqui, *Química Nova*, v. 21, p.16-19.
- FADIOGLU, S.; SOYLEMEZ, S. (1997). Kinetics of lipase catalyzed hydrolysis of olive oil, *Food Research International*, v. 30, n. 3-4, p. 171-175.
- FADIOGLU, S.; SOYLEMEZ, S. (1998). Olive oil hydrolysis by Celite immobilized *Candida rugosa* lipase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 3411-3414.
- FENNEMA, O. R. (1993). *Química de los alimentos*. 2<sup>nd</sup> ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 497 – 498.
- FOWLIS, I. A. (1995). Gas chromatography, *Analytical Chemistry*, John Wiley, New York.
- FREITAS, L.; MENDES, A. A.; CASTRO, H. F. (2003). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação com lipase imobilizada em resíduo agroindustrial, *Anais da Associação de Brasileira de Química*, v. 52, n. 3, p. 124-128.
- GÁMEZ-MEZA, N.; NORIEGA-RODRÍGUEZ, J. A.; MEDINA-JUÁREZ, L. A.; ORTEGA- GARCÍA, J.; MONROY-RIVERA, J.; TORO-VÁZQUEZ, F. J.; GARCÍA, H. S.; ANGULO-GUERRERO, O. (2003). Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Research International*, v. 36, p. 721-727.
- GAN, Q.; BAYKARA, F.; RAHMAT, H.; WEATHERLEY, L.R. (2000). Analysis of a direct contact membrane reactor for lipase catalysed oil hydrolysis in a dynamic emulsion system, *Catalysis Today*, v. 56, n.1-3, p. 179-190.
- GANDHI, N. N. (1997). Application of lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.74, n. 6, p. 621-634.
- GUNSTONE, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.79, n. 12, p. 1535-1549.
- HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. (1988). *Biotechnology Applied to Fats and Oils*, *Food Biotechnology*, Department of Food Technology, Iowa State University, Ames, Iowa, USA, v.2, p.174.

HARALDSSON, G. G. (1991). *The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils*. Marine Lipids Biotechnology, cap. 7, p. 337-352.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids, *Laboratory Practice*, v. 22, n. 8, p. 473.

HILLS, M. J.; KIEWITT, I.; MUKHERJEE, K. D. (1990). Enzymatic fractionation of fatty acids – Enrichment of gamma linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n. 9, p. 561-564.

HORNSTRA, G.; AL, M. D. M.; VON HOUWELINGEN, A. C. (1995). Essential fatty acids in pregnancy and early human development, *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, v. 61, n. 1, p. 57-62.

IBRAHIM, C. O., HAYASHI, M., NAGAI, S. (1987). Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* n° 3. *Agricultural and Biological Chemistry* v. 51, n. 1, p. 37-45.

INNIS, S. M. (2000). Essential fatty acids in infant nutrition: Lessons and limitations from animal studies in relation to studies on infant fatty acid requirements, *Journal of the Clinical Nutrition*, v. 71, n.1, p. 238s-244s.

IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. (1975). Comparison of properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* westring, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 39, n. 5, p. 1063-1070.

IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. (1984). *Fungal lipases*, Lipases. Amsterdam: Edited by B. Borgston and H.L. Brockman, Elsevier, p. 443-469.

JACHMANIAN, I.; MUKHERJEE, K. D. (1995). Germinating rapeseed as biocatalyst – Hydrolysis of oils containing common and unusual fatty acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2997- 3000.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 396-403.

JENSEN, R. G. (1974). Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*, *Lipids*. v. 9, n.3, p.149-157.

JENSEN, R. G.; DEJONG, F. A.; CLARK, R. M. (1983). Determination of lipase specificity. *Lipids*, v. 18, n. 3, p. 239–252.

JESUS, P. C.; JOÃO, J. J.; DA SILVA, P. L. F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M. D.; (1997). Organo-gels: A new system for lipase immobilization and its application in organic synthesis, *Química Nova*, v. 20, n. 6, p. 664-672.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. (1998). *Biotransformation with lipases*, In: *A Multi-Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology*, (ed.) Rehm, H.J., Pihler G., Stadler, A., Kelly, P. J.W. New York: Wiley VCH Verlag, v. 8, p. 37-192.

KHAN, I. M.; DILL, C. W.; CHANDAN, R. C.; SHAHANI, K. M. (1967). Production and properties of extracellular lipase of *Achromobacter lipolyticum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 132, n. 1, p. 68 -77.

KNEZEVICK, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVI, B. (1998). Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. 4, p. 275-280.

KUEN SOON, T. (2001). An overview of the Asean olechemical market. *Malasyan Oil Science and Technology*, v.10, p 59-71.

LANDS, W. E. M. (1986). *Fish and human health*. Orlando, FL: Academic Press, 1986, Chapter 18; p. 138-148.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. J. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v.53, p. 479-472.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R.C. (1985). Present and future applications of lipases, Review, *Biotechnology and Genetic Engineering*, v. 3, n. 9, p. 193-217.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL JR, C. G.; AMUNDSON, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 67, n.12, p. 890- 910.

MARKLEY, K. S. (1960). *Fatty acids: Their chemistry, properties, production, and uses*. 2 ed. New York: Interscience Publishers, p. 714.

MEFEERT, A. (1984). Technical uses of fatty acid esters, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 61, n. 2, p. 255-258.

MENDES, A. A; CASTRO, H. F; PEREIRA, E. B.; FURIGO JR, A. (2005). Aplicação de enzimas hidrolíticas no pré-tratamento de águas residuárias com elevado teor de lipídeos, *Química Nova*, v.28, n.2, 296-305.

MERÇON, F.; ERBES, V. L.; SANT'ANNA JR., G. L.; NOBREGA, R. (1996). Efeitos hidrodinâmicos no processo de hidrólise enzimática de óleos em reatores com membranas. *V Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass (SHEB)*, Anais (CD-ROM, p. 8).

MORETTO, E.; FETT, R. (1998). *Óleos e Gorduras Vegetais (Processamento e Análises)*. Editora da UFSC, Florianópolis, 2º ed.

MOZAFFAR, Z.; WEETE, J. D.; DUE, R. (1994). Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. *Journal of American Oil Chemists' Society*, v. 71, n.1, p. 75-79.

MUKATAKA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, J. (1985). Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems, *Journal of Fermentation Technology*, v.63, n. 5, p. 461-466.

MUKHERJEE, K. D. (1995). *Fats and oils biotechnology: Present and future applications*. In: Congresso y Exposição Lationoamericano sobre Processamento de óleos e gorduras, 6 ed. UNICAMP, p. 67 – 74.

NASCIMENTO, M. G.; COSTA NETO, P.R; MAZZUCO, L. M. (2001). Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 17, p. 28-31.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. (2003). Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase, *Process Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 13-20.

NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP. (1995). A ação das enzimas, Catálogo Técnico.

NURRY, S.; PIÉRONI, G.; RIVIERE, C.; GARGONI, Y.; BOIS, A.; VERGER, R. (1987). Lipase kinetics at the triacylglycerol water interface using surface tension measurements, *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 45, n. 1, p. 27-37.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. (1999). Hidrólise parcial enzimática da gordura de babaçu, *Ciência Tecnologia de Alimentos*, vol. 19, n. 2, p. 270-276.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; THOMAZ-SOCCOL, V. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnology Applied and Biochemistry*, v. 65, n. 2, p.252-254.

PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.; DE ALMEIDA, M. M. (1988). Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v. 65, n. 2, p. 252-254.

PELED, N. KRENZ, M. C. (1981). A new assay of microbial lipases with emulsified trioleoyl glycerol, *Analytical Biochemistry*, v. 112, n. 2, p. 219-222.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. (2001). Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and immobilized enzyme on porous chitosan beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91/93, p.739-752.

QUEIROZ Jr., P.C.; GIRALDO, C. O. N.; SANT'ANNA JR., G. L. (1996). Hidrólise enzimática de óleos de babaçu em reatores agitados. *V Seminar on Enzymatic Hydrolysis of Biomass (SHEB)*, Anais (CD-ROM, p. 13).

RANSAC, S.; CARRIÈRE, F.; ROGALSKA, E.; VERGER, R.; MARGUET, F.; BUONO, G.; MELO, E.P.; CABRAL, J. M. S.; EGLOFF, M-P.E.; VAN TILBEURGH, H.; CAMBILLAU, C. (1995). The kinetics, specificities and structural features of lipases. In: Malcata, F.X. (Ed.). *Engineering of/ with lipases*, Nato ASI Series: Applied Sciences, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 317, pp.143- 182.

RICE, K. E.; WATKINS, J.; HILL, C. G. (1999). Hydrolysis of menhaden oil by a *Candida cylindracea* lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. *Biotechnology and Bioengineering* v. 63, n. 1: p.33-45.

RITTNER, H. (1996). *Óleo de palma: Processamento e utilização*. 1ª ed. São Paulo: p. 311 – 320.

ROCHA, J. M. S., GARCIA, F.A. P. (1992). Effect of AOT concentration on the colorimetric determination of free fatty acids in a reverse micellar system. *Biotechnology Techniques*, v. 6, n. 2, p. 131-132.

ROCHA, J. M. S. (1999). Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*, v. 5, p. 25.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L.R. (2001). The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor, *Process Biochemistry*, v.36, n. 10, p. 947-953.

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

SAXENA, R. K; GHOSH, P. K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADDOO, S; GULATI, R. (1999). Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, v. 77, p.101-115.

SCHMIDT, E. B.; DYERBERG, J. (1994). Omega-3 fatty acids. Current status in cardiovascular medicine. *Drugs*, v.47, p. 405-424.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. (1991). Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*, *Nature*, v. 351, p. 761-764.

SEGEL, I. H. (1979). *Bioquímica*, Rio de Janeiro, 2ª ed., Livros Técnicos e Científicos, p.527.

SHAHANI, K.M. (1975). Lipases and Esterases, In: Reead, Gerald (Ed), *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York, 2ªed, p. 182-214.

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

SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. (2001). Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v.91, n.6, p. 529-538.

SHINTRE, M. S.; GHADGE, R. S.; SAWANT, S. B. (2002). Lipolase catalysed synthesis of benzyl esters of fatty acids, *Biochemical Engineering Journal*, v. 12, p. 131-141.

SIRIN, O.; YASAR, T.; OMA, D.; GUVENLIR, Y. (2005). Effect of different parameters on the enrichment of DHA by enzymatic hydrolysis from cod liver oil, 27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, *Program & Abstracts*, p. 200, Denver- Colorado, EUA.

SOARES, C. M. F; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.77-79, p. 745-757.

SONNTAG, N. O. V. (1979). Structure and composition of fats and oils. *Bailey's industrial oil and fat products*, 4th edition, ed. Swern, D. John Wiley and Sons, New York, v. 1, p. 1-343.

SONNTAG N. O. V. (1984). New developments in the fatty acid industry in America. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v.61, n.2 p. 229-232.

STAUFFERT, D. (2000). Hidrólise enzimática do óleo de pescado (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química. pp. 120.

SUGIURA, M., OIKAWA. T., HIRANO, K., INUKAI, T. (1977). Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemical Biophysics Acta*. v. 488, p.353-358.

SYED RAHMATULLAH, M. S. K., SHUKLA, V. K. S, MUKHERJEE, K. D. (1994). Enrichment of  $\gamma$ -linolenic acid from evening primrose oil and borage via lipase catalysed hydrolysis, *Journal of the American Oils Chemists' Society*, v.71, p. 569-573.

TORRALES, R. P. (1998). Modelo experimental para a reação de lipólise com lipase pancreática, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, pp 121.

VERGER, R. (1997). Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts, *Trends in Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 32-38.



VIRTO, M. D., AGUD, I., MONTERO, S., BLANCO, A., SOLOZABAL, R., LASCARAY, J. M., LLAMA, M. J., SERRA, J. L., LANDETA, L. C., RENOBALLES, M. (1995). Kinetic properties of soluble and immobilized *Candida rugosa* lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 50, p.127-136.

VULFSON, E. (1994) Industrial applications of lipases. In: WOOLEY, P & PETERSEN, S. B. *Lipases: their structure, biochemistry and applications*. Cambridge University Press, p. 271-288.

WANG, Y. J.; SHEU, J. Y.; WANG, F. F.; SHAW, J. F. (1988). Lipase catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, n. 6, p. 628-633.

WARD, O. P.; SINGH, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, in press (<http://www.elsevier.com>)

WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, v. 343, p. 771-774.

XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, I. A. (1996). Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions. *Journal of the American Oil Chemist' Society*, v. 73, n. 1, p.115-120.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. (1998). Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.438-450.

ZAREVÚCKA, M.; VACEK, M.; WIMMER, Z.; STRÁNSKÝ, K.; DEMNEROVÁ, K. (2003). Enzymic transformations of blackcurrant oil: Enrichment with gamma linolenic acid and alpha linolenic acid, *Chemické Listy*, v. 97, n. 4, p. 206-213.

## 8. APÊNDICES

### Apêndice 8.1. Experimentos de síntese química dos padrões cromatográficos

A) Proporção dos materiais usados na síntese dos monoésteres de metila

#### Ácido láurico (C12) com metanol

Reagentes	Massa molecular	Eq	N° moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido láurico	200,31	1,0	0,099	20,00	-
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,199	23,76	14,73
Metanol	30,04	5,0	0,499	14,99	18,96

#### Ácido palmítico (C16) com metanol

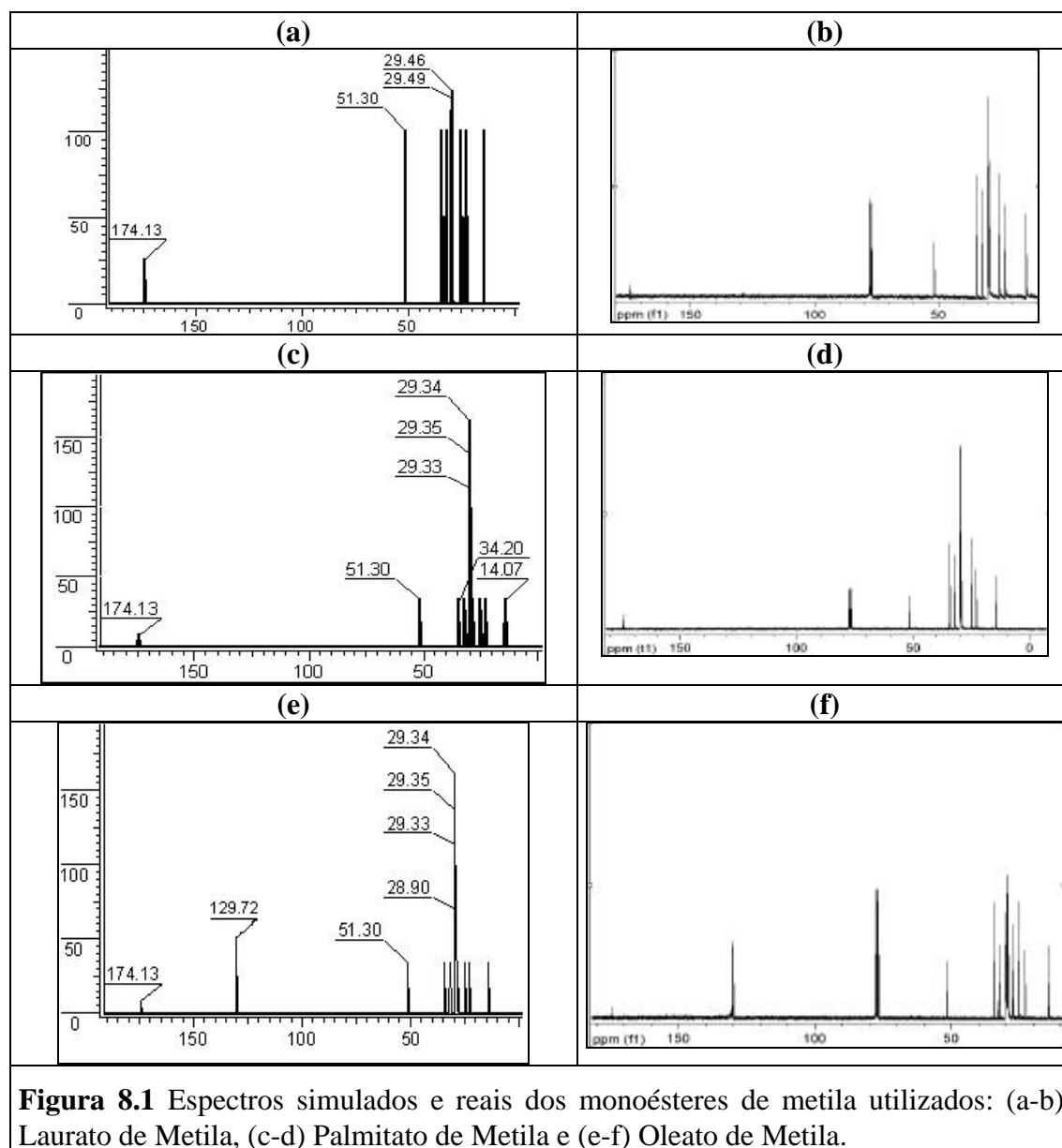
Reagentes	Massa molecular	Eq	N° moles	Massa (g)	V (mL)
Acido palmítico	256,42	1,0	0,039	10,00	-
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,078	9,28	5,69
Metanol	30,04	5,0	0,195	5,86	7,41

#### Ácido oleico (C18:1) com metanol

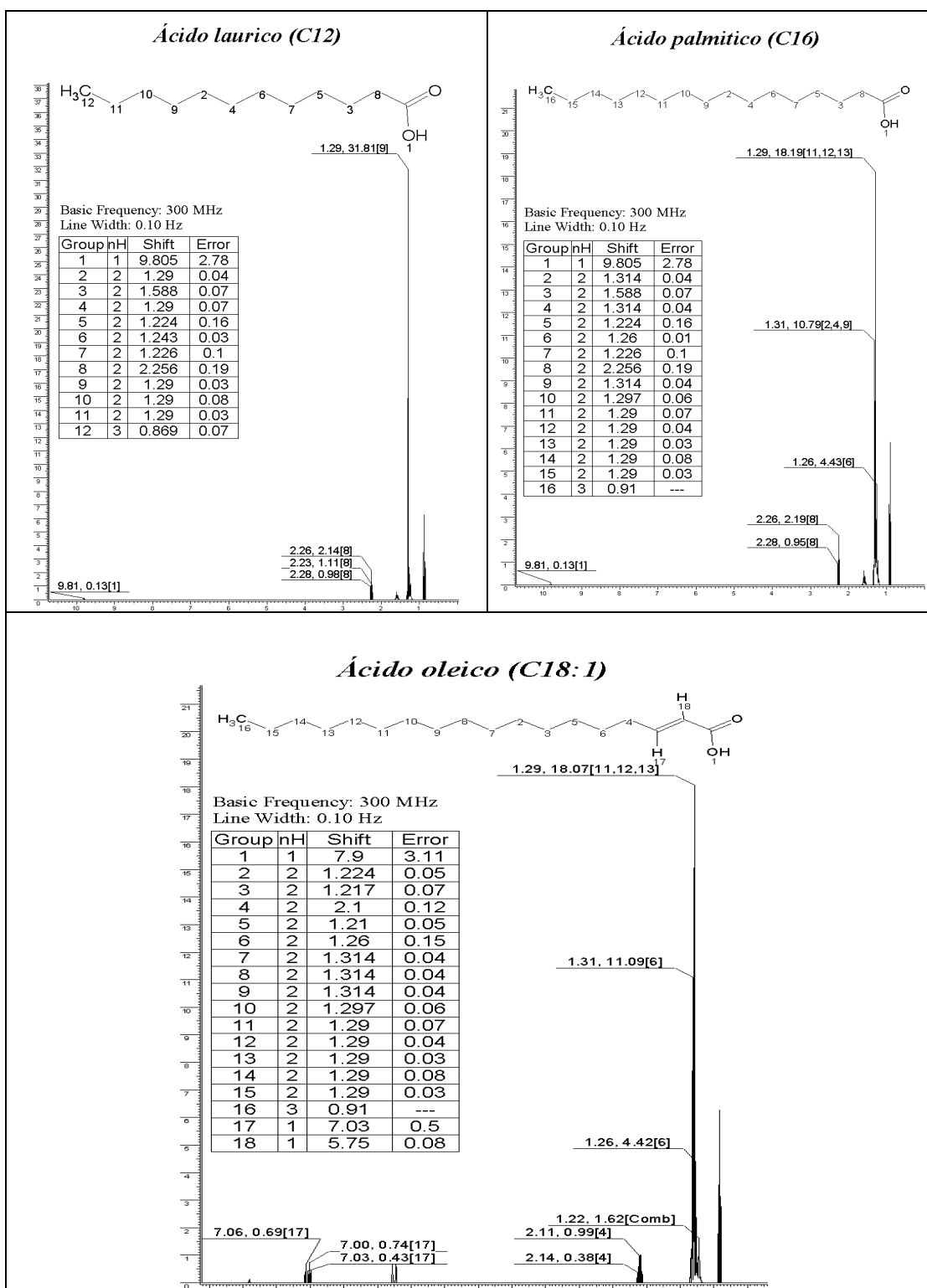
Reagentes	Massa molecular	Eq	N° moles	Massa (g)	V (mL)
Ácido oleico	282,42	1,0	0,035	10,00	-
SOCl <sub>2</sub>	119,00	2,0	0,071	8,43	5,17
Metanol	30,04	5,0	0,177	5,31	6,72

## B) Caracterização dos monoésteres de ácidos graxos por RMN $^1\text{H}$

**Experimentos A:** Comparação dos espectros simulados (obtidos pelo programa ACD) e reais (obtidos pelo programa Mestre C) de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) dos monoésteres de metila



**Experimentos B:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm, 300Hz) simulados no programa ACD dos ácidos graxos utilizados na síntese dos monoésteres

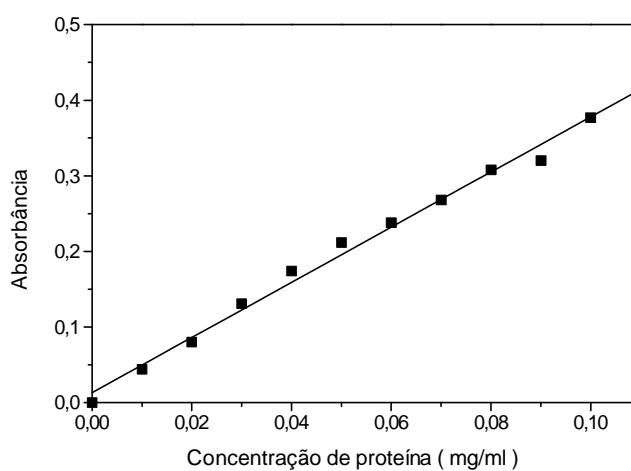


## Apêndice 8.2. Curva de calibração para determinação de proteína pelo método de Bradford

A seguir apresenta-se um exemplo de obtenção da curva de calibração para a determinação de proteína pelo Método de Bradford (1976), empregando-se como padrão a BSA.

Curva de Calibração para Determinação de Proteína pelo Método de Bradford (1976)

Tubo n°	Solução Proteína (mL)	Água (mL)	Conc. Proteína (mg/mL)	Abs. (1)	Abs. (2)	Abs. (3)	Abs. (média)
1	0	4,0	0,00	0	0	0	0
2	0,4	3,6	0,01	0,033	0,054	0,046	0,044
3	0,8	3,2	0,02	0,074	0,08	0,068	0,080
4	1,2	2,8	0,03	0,140	0,131	0,131	0,131
5	1,6	2,4	0,04	0,173	0,164	0,174	0,174
6	2,0	2,0	0,05	0,211	0,210	0,214	0,212
7	2,4	1,6	0,06	0,223	0,247	0,244	0,238
8	2,8	1,2	0,07	0,242	0,277	0,284	0,268
9	3,2	0,8	0,08	0,308	0,311	0,299	0,308
10	3,6	0,4	0,09	0,307	0,320	0,320	0,320
11	4,0	0,0	0,10	0,354	0,377	0,341	0,377



A equação de ajuste para o cálculo do teor de proteína é:

$$\text{Abs} = 0,01332 + 3,6463 \text{ Cp (mg/mL)}, \quad r = 0,9955, \quad \text{desvio padrão} = 0,01208, \quad n = 11$$

### Apêndice 8.3. Caracterização das preparações de lipase

#### A) Influência do pH na Atividade das Lipases

Substrato: Emulsão do óleo de soja e água (1:1) e goma arábica 7 % (m/v)

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura: 37 °C

pH	Atividade Lipolítica (U/mg)				
	<i>Candida rugosa</i> (LCR)	Lipolase	Pancreatina (LPP)	Pancreatina (LKM)	Pancreatina (LNU)
5,0	3387 ± 231	4227 ± 167	377 ± 72	147 ± 147	759 ± 97
5,5	3868 ± 84	6017 ± 38	837 ± 87	229 ± 37	949 ± 84
6,0	4189 ± 103	6503 ± 83	2761 ± 192	1118 ± 254	1504 ± 35
6,5	4343 ± 155	8860 ± 165	3858 ± 43	1798 ± 127	2850 ± 125
7,0	8938 ± 12	9849 ± 118	5106 ± 163	2859 ± 117	3335 ± 374
7,5	8038 ± 85	13304 ± 38	5454 ± 123	3822 ± 350	3469 ± 124
8,0	7002 ± 23	13626 ± 207	4676 ± 45	5163 ± 141	3744 ± 52
8,5	7038 ± 64	11768 ± 89	4617 ± 12	5999 ± 207	3847 ± 21
9,0	5657 ± 90	6551 ± 177	4574 ± 16	5258 ± 51	3010 ± 287

#### B) Influência da Temperatura na Atividade das Lipases

Substrato: Emulsão do óleo de soja e água (1:1) e goma arábica 7 % (m/v)

LCR: pH 7,0; Lipolase: pH 8,0 LPP: pH 7,5 LKM: pH 8,0; LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura (°C)	Atividade Lipolítica (U/mg)				
	<i>Candida rugosa</i> (LCR)	Lipolase	Pancreatina (LPP)	Pancreatina (LKM)	Pancreatina (LNU)
30	6480 ± 238	9730 ± 44	5233 ± 224	3942 ± 15	4294 ± 218
37	8938 ± 12	13626 ± 207	5454 ± 123	5163 ± 141	3744 ± 52
40	10824 ± 400	13032 ± 327	4828 ± 196	3068 ± 60	3055 ± 86
45	8083 ± 276	9511 ± 117	4024 ± 161	2357 ± 14	2304 ± 85
50	5179 ± 46	8454 ± 302	3936 ± 134	2632 ± 24	1688 ± 26
55	8350 ± 243	8227 ± 159	3490 ± 142	4112 ± 233	524 ± 267
60	4836 ± 69	3188 ± 46	3207 ± 103	1490 ± 66	904 ± 74

### C) Estabilidade Térmica das Preparações de Lipase

Substrato: Emulsão do óleo de soja e água (1:1) e goma arábica 7 % (m/v)

LCR: pH 7,0; Lipolase: pH 8,0 LPP: pH 7,5 LKM: pH 8,0; LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura 37°C

#### Lipase *Candida rugosa* (LCR)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	8938 ± 12	8938 ± 12
40	6833 ± 225	6930 ± 42
45	4750 ± 130	4616 ± 122
50	1823 ± 84	1016 ± 0
55	1701 ± 432	1142 ± 319
60	1378 ± 403	655 ± 0

#### Lipase *Thermonyces lanuginosa* (Lipolase)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	13626 ± 207	13626 ± 207
40	12835 ± 136	12131 ± 312
45	11383 ± 75	11695 ± 396
50	11286 ± 48	11779 ± 13
55	10764 ± 165	12144 ± 64
60	10677 ± 106	11528 ± 95

#### Lipase Pancreatina Tipo II Sigma (LPP)

Temperatura (°C)	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	5454 ± 123	5454 ± 123
40	3432 ± 87	1681 ± 123
45	814 ± 163	999 ± 57
50	541 ± 48	422 ± 53
55	198 ± 92	97 ± 17
60	35 ± 15	100 ± 20

**Lipase Pancreatina Kin Master (LKM)**

Temperatura ( °C )	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 h	2 h
37	5163 ± 141	5163 ± 141
40	2339 ± 4	1113 ± 12
45	852 ± 21	412 ± 33
50	862 ± 17	395 ± 25
55	707 ± 12	386 ± 25
60	565 ± 21	269 ± 8

**Lipase Pancreatina Nuclear (LNU)**

Temperatura ( °C )	Atividade Hidrolítica (U/mg)	
	1 hora	2 h
37	3992 ± 52	3744 ± 52
40	1218 ± 54	948 ± 50
45	1336 ± 33	461 ± 21
50	368 ± 33	11 ± 11
55	34 ± 17	0
60	12 ± 3	0



### D) Influência da Concentração de Substrato na Atividade Hidrolítica

Variação da concentração do substrato na atividade hidrolítica da LCR, LKM e LNU

Substrato: Emulsão de óleo de soja em goma arábica 7% (m/v)

LCR: pH 7,0; Lipolase: pH 8,0; LPP: pH 7,5; LKM: pH 8,0 e LNU: pH 8,0 (tampão fosfato 0,1M).

Tempo de incubação: 5 min

Temperatura 37°C

Emulsão (v/v, %)	Ácidos graxos* (mM)	Valores obtidos				
		Atividade (U/mg)				
		LCR	Lipolase	LPP	LKM	LNU
10	344	3618	4107	1579	2316	1135
20	688	4018	5586	2422	2402	1744
30	1030	5368	8734	2672	4032	2256
40	1376	6468	10929	3707	3536	2772
50	1718	7459	12217	4941	4136	2719

\*MM (óleo de soja) = 873,8 g/mol

Emulsão (v/v, %)	Ácidos graxos* (mM)	Valores calculados				
		Atividade (U/mg)				
		LCR	Lipolase	LPP	LKM	LNU
10	344	3472	3516	1795	2186	1469
20	688	5056	6356	3056	3067	1726
30	1030	5958	8685	3985	3540	1833
40	1376	6549	10661	4709	3841	1892
50	1718	6959	12324	5278	4044	1929

Valores calculados pelo Programa EnzymeEffiter

#### Apêndice 8.4. Resumo dos testes de hidrólise enzimática do óleo de soja

Neste apêndice estão representados todos os experimentos efetuados cuja numeração é referente aquela utilizada no caderno de protocolo de laboratório, sendo que somente os sombreados foram discutidos e estão incorporados no texto desta monografia. Os experimentos foram agrupados pelo tipo de lipase empregada.

##### A) Lipase de *Candida rugosa* (LCR)

Experimento	Enzima (g)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio	Glicerol (%)
56*	0,25	Magnética	24	78,94	±0,37	-
53	0,25	Magnética	24	70,50	±0,13	-
51	0,25	Mecânica	2	65,04	±1,15	19,35
36*	0,25	Magnética	24	57,55	±0,02	-
35	0,25	Magnética	24	79,91	±0,22	-
30*	0,25	Magnética	24	58,91	±2,47	-
27**	0,25	Magnética	24	33,10	±0,30	-

\* Experimentos com análises cromatográficas

\*\* Experimento com substrato 50:50%

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
23	0,25	0,88	Magnética	24	69,86	±5,46
13	0,25	0,88	Magnética	24	69,04	±1,40
11*	0,25	0,88	Magnética	24	69,14	±0,91
8	0,25	0,88	Magnética	24	56,72	±0,43

\* EXPERIMENTOS COM ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

##### B) Lipase *Thermonyces lanuginosa* (Lipolase)

Experimento	Enzima (g)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio	Glicerol (%)
50	0,25	Mecânica	4	44,58	±0,42	12,56
34*	0,25	Magnética	24	57,91	±0,80	-
31*	0,25	Magnética	24	42,62	±1,51	-

\* Experimentos com análises cromatográficas

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
24	0,25	0,88	Magnética	24	52,78	± 0,17

**C) Lipase pancreatina Kin Master (LKM)**

Experimento	Enzima (g)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio	Glicerol (%)
48	0,5	Mecânica	0,5	30,61	±0,24	2,27
32*	0,5	Magnética	24	30,46	±0,49	-
28*	0,5	Magnética	24	23,29	±0,86	-

\* Experimentos com análises cromatográficas

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
20	1	0,88	Magnética	4	23,79	±0,34
19	0,75	0,88	Magnética	24	33,16	±2,5
18	0,5	0,88	Magnética	24	17,98	±0,37
17	0,25	0,88	Magnética	24	15,65	±0,05
10*	0,25	0,88	Magnética	6	8,45	±0,11
5	0,25	0,88	Magnética	17	19,53	±2,06

\* Experimentos com análises cromatográficas

**D) Lipase pancreatina Nuclear (LNU)**

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
14	0,75	0,88	Magnética	24	18,82	2,40
9*	0,25	0,88	Magnética	3	7,38	0,63
6	0,25	0,88	Magnética	18	9,52	0,28

\* EXPERIMENTOS COM ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

**E) Lipase pancreatina Sigma (LPP)**

Experimento	Enzima (g)	NaCl (g)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
55*	1,5	0,04	Magnética	24	35,21	±0,29
52	0,5	0,02	Magnética	24	29,47	±0,91
49	0,5	0	Mecânica	4	26,92	±2,18
47	1,5	0,02	Mecânica	24	13,56	±1,25
46	1,5	0,02	Magnética	24	31,95	±1,98
33*	0,5	0	Magnética	24	27,86	±0,55
29*	0,5	0	Magnética	24	22,27	±1,12

\* Experimentos com análises cromatográficas

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
22	0,5	0	Magnética	24	21,34	0,04
21	0,25	0	Magnética	24	20,15	0,06

**F) Lipase *Rhizomucor miehei* (Lipozyme)**

Experimento	Enzima (g)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
26	0,1	Magnética	24	8,69	0,34
25	0,1	Magnética	6	3,38	0,41

**G) Associação Lipase pancreatina Nuclear (LNU) com Lipase microbiana (LCR)**

Experimento	Enzima (g)	CaCl <sub>2</sub> (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
16	0,05 (LCR) 0,45 (LNU)	0,88	Magnética	24	67,08	±0,62
15	0,15 (LCR) 0,35 (LNU)	0,88	Magnética	4	61,89	±3,08
12*	0,13 (LCR) 0,13 (LNU)	0,88	Magnética	6	52,37	±0,51
7	0,13 (LCR) 0,13 (LNU)	0,88	Magnética	17	56,95	±4,36

\* EXPERIMENTOS COM ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

**H) Associação Lipase pancreática (LPP) com Lipase microbiana (LCR)**

Experimento	Enzima (g)	NaCl (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
57*	0,15 (LCR) 0,35 (LPP)	-	Magnética	24	54,41	±2,12
54	0,15 (LCR) 0,35 (LPP)	0,04	Magnética	24	45,14	±0,15

\* Experimentos com análises cromatográficas

## G) Análises Cromatográficas

Experimento	Enzima	Tempo (h)	Ácidos graxos (g/L)				
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<b>Substrato</b>		0	0,14	0,06	0,33	0,74	0,08
9	LNU	24	0,14	0,05	0,27	0,64	0,07
10	LKM	24	0,84	0,28	1,66	3,82	0,38
11	LCR	24	0,24	0,10	0,58	1,30	0,14
12	LCR+LNU	24	3,16	0,99	6,77	16,14	1,59
<b>Substrato</b>		0	0,10	-	0,21	0,47	0
28	LKM	24	3,52	-	0	0,36	29,78
29	LPP	24	0	-	76,47	0,45	10,53
30	LCR	24	0,21	-	0,70	1,07	0,15
31	Lipolase	24	4,43	-	0,88	1,37	0,18
<b>Substrato</b>		0	0,42	-	0,73	1,08	0,11
32	LKM	24	3,33	-	9,57	12,93	1,99
33	LPP	24	9,18	-	23,73	32,97	5,85
34	Lipolase	24	1,27	-	9,97	8,63	1,05
36	LCR	24	11,48	-	13,93	10,65	4,98
<b>Substrato</b>				-			
55	LPP	24	7,46	-	11,95	25,95	3,25
56	LCR	24	2,59	-	3,97	12,03	1,58
57	LPP+LCR	24	4,21	-	6,12	20,14	2,65

## Apêndice 8.5. Planejamento fatorial

### Condições Experimentais:

Temperatura = 37° C

Agitação: 200 rpm

**Ensaio 45:** 50 mL de emulsão  
1,0 % de enzima LPP  
0,0 de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	0,89	0,17	-	-	-
0,25	1,06	3,26	6,04	6,08	±0,04
	1,08	3,36	6,12		
0,50	1,00	3,78	7,52	7,53	±0,01
	0,95	3,60	7,54		
1	0,92	7,37	16,38	16,35	±0,03
	1,01	8,06	16,32		
2	0,90	7,98	18,18	18,50	±0,32
	0,88	8,07	18,81		
4	0,89	8,51	19,63	19,26	±0,37
	0,91	8,38	18,89		
6	0,91	9,60	21,70	20,88	±0,83
	1,00	9,76	20,05		
24	0,93	10,55	23,37	23,18	±0,19
	0,97	10,83	22,99		

**Ensaio 44:** 50 mL de emulsão  
3,0 % de enzima LPP  
0,04% de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	1,30	0,22	-	-	-
0,25	1,35	7,65	16,00	15,60	±0,40
	1,17	6,31	15,20		
0,50	1,25	8,31	18,85	18,75	±0,11
	1,22	8,02	18,64		
1	1,38	13,04	19,31	19,93	±0,63
	1,27	12,76	20,56		
2	1,36	14,29	21,52	21,64	±0,11
	1,35	14,33	21,75		
4	0,84	12,33	30,26	26,68	±3,58
	1,33	14,98	23,11		
6	1,36	16,52	24,96	25,33	±0,37
	1,38	17,25	25,70		
24	1,19	18,04	31,27	31,35	±0,08
	1,28	19,50	31,43		

**Ensaio 43:** 50 mL de emulsão  
2,0 % de enzima LPP  
0,04% de NaCl

<b>Tempo (h)</b>	<b>Massa amostra (g)</b>	<b>Volume KOH (mL)</b>	<b>Hidrólise (%)</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio</b>
0	1,03	0,18	-	-	-
0,25	1,42	5,60	1,97	10,78	±0,19
	1,28	4,88	10,59		
0,50	1,36	6,34	13,06	13,24	±0,19
	1,28	6,13	13,43		
1	1,26	9,10	14,62	14,00	±0,63
	1,44	9,54	13,37		
2	1,27	10,25	16,40	16,49	±0,09
	1,17	9,54	16,58		
4	1,31	12,70	19,80	19,78	±0,02
	1,32	12,77	19,76		
6	1,28	14,87	23,83	24,33	±0,50
	1,16	14,03	24,83		
24	1,33	17,85	27,61	27,22	±0,39
	1,45	18,92	26,83		

**Ensaio 42:** 50 mL de emulsão  
1,0 % de enzima LPP  
0,04% de NaCl

<b>Tempo (h)</b>	<b>Massa amostra (g)</b>	<b>Volume KOH (mL)</b>	<b>Hidrólise (%)</b>	<b>Médias</b>	<b>Desvio</b>
0	1,02	0,17	-	-	-
0,25	1,17	4,80	11,45	11,22	±0,24
	1,17	4,61	10,98		
0,50	1,07	5,39	14,17	13,76	±0,42
	1,17	5,56	13,34		
1	1,15	5,75	14,07	14,39	±0,32
	1,04	5,43	14,71		
2	1,04	6,40	17,42	16,80	±0,62
	0,99	5,67	16,18		
4	1,10	7,43	19,17	19,19	±0,02
	1,09	7,38	19,22		
6	1,11	7,80	19,96	19,55	±0,41
	1,18	7,96	19,15		
24	1,14	9,84	24,63	23,60	±1,03
	1,27	10,06	22,57		

**Ensaio 41:** 50 mL de emulsão  
2,0 % de enzima LPP  
0,08% de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	1,27	0,22	-	-	-
0,25	1,25	5,56	12,44	12,46	±0,02
	1,22	5,44	12,47		
0,50	1,23	7,08	16,25	15,98	±0,27
	1,31	7,30	15,71		
1	1,15	7,58	18,68	18,81	±0,14
	1,30	8,69	18,95		
2	1,29	9,13	20,09	19,92	±0,17
	1,43	9,95	19,74		
4	1,10	10,00	25,95	24,49	±1,46
	1,40	11,32	23,03		
6	1,38	11,70	24,17	24,32	±0,16
	1,35	11,59	24,48		
24	1,31	14,26	31,17	30,54	±0,63
	1,51	15,78	29,91		

**Ensaio 40:** 50 mL de emulsão  
3,0 % de enzima LPP  
0,08% de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	1,10	0,18	-	-	-
0,25	0,96	5,76	16,98	17,53	±0,55
	1,06	6,76	18,08		
0,50	1,23	8,77	20,27	19,54	±0,73
	1,12	7,42	18,80		
1	1,07	8,06	21,44	21,97	±0,53
	0,97	7,66	22,50		
2	1,06	9,83	26,51	25,81	±0,70
	1,14	10,02	25,10		
4	1,10	10,28	26,72	27,21	±0,49
	1,04	10,07	27,70		
6	1,11	11,03	28,44	27,81	±0,63
	1,19	11,31	27,18		
24	1,20	14,34	34,30	34,64	±0,35
	1,01	12,31	34,99		



**Ensaio 39:** 50 mL de emulsão  
1,0 % de enzima LPP  
0,08% de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	1,16	0,18	-	-	
0,25	1,06	3,40	8,88	8,92	±0,03
	1,17	3,78	8,95		
0,50	1,13	4,33	10,70	10,69	±0,01
	1,28	4,90	10,69		
1	1,01	5,53	15,48	15,23	±0,25
	1,13	5,99	14,97		
2	0,99	6,86	19,71	17,51	±2,21
	0,97	5,25	15,30		
4	1,01	6,67	18,77	18,61	±0,15
	1,06	6,89	18,46		
6	1,04	7,55	20,67	20,34	±0,34
	1,06	7,45	20,00		
24	1,10	8,50	22,03	21,66	±0,38
	1,77	13,22	21,28		

**Ensaio 38:** 50 mL de emulsão  
2,0 % de enzima LPP  
0,0 de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	0,88	0,16	-	-	
0,25	1,00	4,06	11,29	11,37	±0,08
	1,13	4,65	11,45		
0,50	1,07	6,00	15,79	15,56	±0,23
	1,06	5,78	15,34		
1	0,99	6,30	17,99	17,96	±0,02
	1,01	6,41	17,94		
2	1,23	8,27	19,04	18,52	±0,52
	1,20	7,64	18,00		
4	1,10	7,33	18,86	18,63	±0,23
	1,60	10,41	18,40		
6	1,04	8,08	22,08	21,44	±0,64
	1,18	8,65	20,80		
24	1,52	13,56	25,43	25,83	±0,40
	1,44	13,24	26,23		

**Ensaio 37:** 50 mL de emulsão  
3,0 % de enzima LPP  
0,0 de NaCl

Tempo (h)	Massa amostra (g)	Volume KOH (mL)	Hidrólise (%)	Médias	Desvio
0	0,85	0,16	-	-	-
0,25	1,22	5,68	13,00	13,46	±0,46
	1,11	5,52	13,92		
0,50	1,03	6,01	16,43	16,21	±0,22
	1,04	5,91	15,99		
1	1,03	6,34	17,36	17,54	±0,18
	0,86	5,40	17,72		
2	1,00	7,49	21,25	21,16	±0,09
	0,93	6,91	21,07		
4	0,79	7,52	27,15	24,91	±2,24
	0,96	7,66	22,67		
6	1,20	11,05	26,25	23,75	±2,49
	1,58	11,84	21,26		
24	1,29	13,02	28,82	30,13	±1,31
	1,17	12,86	31,44		

### Resumo dos experimentos

Experimento	Enzima (%)	NaCl (%)	Agitação	Tempo (h)	Hidrólise (%)	Desvio
45	1,0	0	Magnética	24	23,18	±0,19
44	3,0	0,04	Magnética	24	31,35	±0,08
43	2,0	0,04	Magnética	24	27,22	±0,39
42	1,0	0,04	Magnética	24	23,60	±1,03
41	2,0	0,08	Magnética	24	30,54	±0,63
40	3,0	0,08	Magnética	24	34,64	±0,35
39	1,0	0,08	Magnética	24	21,66	±0,38
38	2,0	0,08	Magnética	24	25,83	±0,40
37	3,0	0	Magnética	24	30,13	±1,31

## **Apêndice 8.6. Lista de divulgação dos resultados**

Este trabalho deu origem a diversas publicações em diferentes meios de divulgação, como a seguir listadas:

BUENO, T.; VIEIRA, F. C. V.; PIERRE, C. T.; CASTRO, H. F. (2004). Comparação das propriedades bioquímicas e cinéticas de lipases empregando como substrato diferentes óleos vegetais. IV Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação, Anais (CD ROM, pp. 4).

BUENO, T.; FREITAS, L.; CASTRO, H.F. (2005). Seleção de preparações comerciais de lipase para a hidrólise enzimática do óleo de soja. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Anais, (CD ROM, pp. 7).

PIERRE, C. T.; VIEIRA, F. C. V.; BUENO, T.; CASTRO, H. F. (2005). Definição das variáveis significativas na hidrólise enzimática do óleo algodão visando a produção do ácido linoleico. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, SINAFERM, Anais, (CD ROM, pp. 7).

BUENO, T., FREITAS, L.; CASTRO, H. F. (2005). Influência da adição de cloreto de sódio na hidrólise enzimática do óleo de soja empregando lipase pancreática, II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Anais, (CD ROM, pp.5).