

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RENATA DE NAZARÉ VILAS BÔAS

Avaliação da atividade de antioxidantes naturais na síntese de  
monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu durante o curso de reações  
descontínuas e contínuas

Lorena  
2014

RENATA DE NAZARÉ VILAS BÔAS

Avaliação da atividade de antioxidantes naturais na síntese de monoglicérides via glicerólise do óleo de babaçu durante o curso de reações descontínuas e contínuas

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientadora: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena  
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação  
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”  
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Vilas Bôas, Renata de Nazaré

Avaliação da atividade de antioxidantes naturais na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu durante o curso de reações descontínuas e contínuas. / Renata de Nazaré Vilas Bôas. – Versão original. - 2014.

87 p: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

Orientadora: Heizir Ferreira de Castro.

1. Antioxidantes 2. Glicerólise 3. Lipase 4. Monoglicerídeos 5. Óleo de babaçu.  
I. Título. II. Castro, Heizir Ferreira de, orient.

577.152 - CDU

## ***Dedicatória***

*A Deus que me dotou de razão, inteligência e vontade,  
caracteres peculiares de sua natureza imortal.*

*Ao meu querido Anjo da Guarda, meu zeloso protetor, por me guiar  
e orientar a minha inspiração na conclusão em mais esta etapa.*

*A minha querida Mãe Hélia pelo carinho, apoio incondicional e presença em mais esta etapa.  
Mãe é com você com quem divido a conquista deste título!!!*

*A minha querida irmã mais velha Profa. Dra. Regiane pelo carinho,  
apoio incondicional e por sempre me incentivar aos estudos desde os meus  
primeiros dias de aula. Você sempre foi meu maior modelo nos estudos!!!*

*Aos meus queridos Avôs Nita e João José que mesmo  
como anjos sempre estiveram presentes em meu coração.*

*Obrigada a vocês por serem os maiores Mestres em minha vida!!!*

*Aos meus queridos irmãos, eternos companheiros e amigos inseparáveis, Regilane, Reginaldo e  
Regina pelo apoio, preocupação e presença em mais esta etapa.  
A presença de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.*

*Aos meus queridos sobrinhos Alissa, Mateus, Guilherme, Diogo e Davi  
por tornarem as minhas idas aos feriados em casa mais feliz.*

*Ao meu Pai Sebastião Batista, que sempre transmitiu a honestidade, a força e a importância de se  
aprender a trabalhar. Elementos fundamentais para a conclusão deste trabalho.*

*A minha querida Tia Cida pelas suas orações nos meus momentos longe de casa. Orações que  
foram de grande importância no meu período de moradia longe de casa.*

*Ao meu cunhado Prof. Dr. Jackson Antônio Barbosa por ter sempre se colocado à disposição em  
ajudar desde a minha primeira matrícula na Universidade.*

## AGRADECIMENTOS

A elaboração de um trabalho só é possível com a existência de uma equipe. Deixo aqui registrado o meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que participaram. **MUITO OBRIGADA!**

A minha orientadora Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho, pela competência em orientar, pelos seus valiosos ensinamentos, dedicação, apoio constante durante a realização deste trabalho e por ser um exemplo de profissionalismo.

A Profa. Dra. Larissa de Freitas, pelas valiosas contribuições e ensinamentos na realização deste trabalho. Obrigada também pela amizade e ótima convivência.

Ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, pelas sugestões e contribuições neste trabalho.

Ao grupo de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Prof. Pedro, Profa. Larissa, Profa. Patrícia, William, Daniel, Ana Letícia, Heitor, Lucas R., Lucas M., Juan, Ana Karine, Weriton e Annie pela ajuda, amizade, momentos de descontração e ótima convivência.

Aos alunos do laboratório: Eduardo, Lainy, Bruno, Bruna, Martim, Angela, Kevin, Tomas, Guilherme, Aline, Pedro e Filipe pela amizade e pela disposição em ajudar.

Aos colegas da Pós-Graduação pela amizade e companheirismo durante a realização das disciplinas e nos encontros de finais de semana.

Aos professores que ministraram as disciplinas da pós-graduação, Figueiredo, Marivone, Heizir, Luis Claudio e João Batista, pelos ensinamentos e oportunidades dos trabalhos desenvolvidos.

Ao Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

## RESUMO

VILAS BÔAS, R. N. **Avaliação da atividade de antioxidantes naturais na síntese de monoglicerídeos via glicerólise do óleo de babaçu durante o curso de reações descontínuas e contínuas**, 2014. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

O efeito de diferentes agentes antioxidantes naturais lipossolúveis (óleo de copaíba, manteiga de tucumã, manteiga de cacau, óleo de buriti e especiarias como orégano, tomilho branco, alecrim, sálvia sclarea, cravo talo e cananga) foi determinado na síntese enzimática de monoglicerídeos (MAG) a partir da glicerólise do óleo de babaçu, tomando como parâmetro de comparação os resultados alcançados na reação isenta de estratégia antioxidante (controle negativo) e sob atmosfera inerte (controle positivo). As reações foram conduzidas em reatores operando em regime descontínuo e contínuo usando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA como catalisador. O melhor desempenho em reatores descontínuos foi obtido usando N<sub>2</sub> no meio reacional (60 % MAG) seguido do óleo de buriti (57,6 % MAG) e manteiga de cacau (56,6 % MAG). Entretanto, a incorporação do óleo de buriti no meio reacional alterou o perfil de formação de monoglicerídeos, ocasionando elevada concentração de monoleína. Tomando por base esses resultados, selecionou-se a manteiga de cacau como agente antioxidante para a condução dos testes em fluxo contínuo. Nesse contexto, visando estabelecer maior homogeneidade do meio reacional e alcançar rendimentos elevados de MAGs, foram realizados testes em reator de leito fixo em fluxo contínuo, sob atmosfera inerte, variando-se a proporção entre óleo e glicerol no meio de alimentação. Os resultados obtidos nesta série de experimentos demonstraram forte influência da razão molar dos materiais de partida na síntese de MAGs e o melhor desempenho foi obtido empregando a razão molar intermediária (1:9), que proporcionou a formação de 31,5 % de MAGs e produtividade de 52,2 mg<sub>MAGs</sub>/g<sub>amostra</sub>.h. Testes empregando manteiga de cacau como agente antioxidante foram efetuados e desempenhos similares daqueles obtidos em atmosfera inerte foram obtidos, confirmando o efeito benéfico da utilização da manteiga de cacau no meio de alimentação como agente antioxidante. Isto sugere que a manteiga de cacau inibiu ou reduziu a oxidação do óleo de babaçu durante a síntese de MAGs, indicando a possibilidade de substituição da atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) na reação. Análises espectrofotométricas dos produtos de oxidação primários (hidroperóxidos e dienos conjugados) e secundários (aldeídos e cetonas) validaram a eficiência da manteiga de cacau como agente antioxidante da matéria-prima lipídica durante todo o processo contínuo.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, Glicerólise, Lipase, Monoglicerídeos, Óleo de babaçu.

## ABSTRACT

VILAS BÔAS, R. N. **Evaluation of the activity of natural antioxidants in the synthesis of monoglycerides by glycerolysis of babassu oil during the course of discontinuous and continuous reactions**, 2014. 87p. Dissertation (Master of Science) — Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

The effects of several natural antioxidants (copaiba oil, buriti oil, cocoa butter, tucuman butter, oregano, white thyme, rosemary, salvia sclarea, carnation stem and cananga) were assessed in the enzymatic synthesis of monoglycerides (MAG) from the glycerolysis of babassu oil. The reactions were catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on SiO<sub>2</sub>-PVA and the assays carried out in batch and continuous runs. Results were compared with those attained in the control reactions (without any strategy to avoid oxidation and under inert atmosphere), and the best approach was tested in a continuous packed bed reactor. The best performance was achieved using N<sub>2</sub> in the reaction medium (60 % of MAG) followed by buriti oil (57.6 % of MAG) and cocoa butter (56.6 % of MAG), preventing the oxidation of babassu oil in batch reaction. However, the incorporation of buriti oil in the medium influenced the MAG profile, leading to the largest formation of monoolein, unlike other runs. Based on these results, cocoa butter was chosen as antioxidant agent to carry out the assays under continuous flow. Therefore, aiming to establish greater homogeneous reaction media and to attain high MAGs yields, assays were performed in packed bed reactor under continuous flow, in inert atmosphere, varying the proportional of babassu oil and glycerol in the feed media. The results obtained in this set of runs demonstrated a strong influence of molar ratio between starting materials in the synthesis of MAGs and the best performance was achieved using the intermediate molar ratio (1:9), which afforded the formation of 31.5% of MAGs and productivity of 52.2 mg<sub>MAGs</sub>/g<sub>sample</sub>·h. Tests using cocoa butter as antioxidant were made and similar results were attained, confirming the beneficial effect of using cocoa butter in the feed medium as an antioxidant agent. This suggests that the cocoa butter inhibited or reduced babassu oil oxidation during synthesis of MAGs, indicating the possibility of replacing the inert atmosphere (N<sub>2</sub>) in the reaction. Spectrophotometric analysis of the primary oxidation products (conjugated dienes and hydroperoxides) and secondary (aldehydes and ketones) validated the efficiency of cocoa butter as an antioxidant agent of lipid a continuous process. Thereby, among the nine tested antioxidant agents, cocoa butter was the most effective in both systems, since it not interfere in the MAG profile and also reduced the cost of the process.

**Keywords:** Antioxidants, Glycerolysis, Lipase, Monoglycerides, Babassu oil.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 3.1-</b> Ilustração da estrutura química de diferentes acilgliceróis parciais.....	24
<b>Figura 3.2</b> - Obtenção de monoglicerídeos por hidrólise ou alcoólise por via enzimática.	25
<b>Figura 3.3</b> - Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos	26
<b>Figura 3.4</b> – Esquema da reação de obtenção de MAGs por glicerólise enzimática.....	27
<b>Figura 3.5</b> - Ilustração do meio reacional utilizado na glicerólise enzimática .....	27
<b>Figura 3.6</b> - Reações catalisadas por lipases.....	32
<b>Figura 3.7</b> - Representação estrutural: (1) triglicerídeo, (2) ácido graxo e (3) glicerol.....	40
<b>Figura 3.8</b> – Estrutura de uma molécula de glicerol .....	41
<b>Figura 3.9</b> – Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100) período 2005–2011 .....	42
<b>Figura 3.10</b> - Esquema da auto-oxidação do linoleato de alquila, R representa grupo alquil .....	44
<b>Figura 3.11</b> - Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reactores (a) leito fixo (PBR - <i>Packed bed reactor</i> ), (b) leito fluidizado (FBR - <i>Fluidized bed reactor</i> ), (c) batelada tanque agitado (BSTTR - <i>Batch stirred tank reactor</i> ) e (d) contínuo tanque agitado (CSTR - <i>Continuous stirred-tank reactor</i> ) .....	49
<b>Figura 4.1</b> - Esquema experimental das reações descontínuas: 1 - reator de vidro; 2 - banho para controle de temperatura; 3 - entrada de água; 4 - saída de água; 5 - saída do produto .....	53
<b>Figura 4.2</b> – Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fixo: 1 - coluna; 2 - reservatório de alimentação; 3 - bombas peristálticas; 4 - saída do produto; 5 - banho para controle de temperatura; 6 - entrada de água; 7 - saída de água ...	54
<b>Figura 5.1</b> – Principais etapas desenvolvidas neste trabalho .....	59
<b>Figura 5.2</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) nas reações de glicerólise de óleo de babaçu, sob diferentes condições: (a) controle negativo, (b) atmosfera inerte (controle positivo), na presença de antioxidantes (c) óleo de copaíba, (d) manteiga de tucumã, (e) manteiga de cacau, (f) óleo de buriti.....	61
<b>Figura 5.3</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) nas reações de glicerólise de óleo de babaçu empregando diferentes antioxidantes: (a) orégano, (b) tomilho branco, (c) alecrim, (d) sálvia sclarea, (e) cravo talo, (f) cananga .....	62
<b>Figura 5.4</b> - Perfil de formação dos diferentes monoglicerídeos a partir da glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada empregando óleo de buriti e manteiga de cacau como agentes antioxidantes (6h de reação).....	65
<b>Figura 5.5</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:3) sob atmosfera inerte .....	66
<b>Figura 5.6</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:6) sob atmosfera inerte .....	66



<b>Figura 5.7</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:9) sob atmosfera inerte .....	67
<b>Figura 5.8</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:12) sob atmosfera inerte .....	67
<b>Figura 5.9</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:15) sob atmosfera inerte .....	68
<b>Figura 5.10</b> – Perfil de formação de monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu catalisada por lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO <sub>2</sub> -PVA empregando substrato na razão molar 1:9 (óleo/glicerol) sob atmosfera inerte (○) e na presença de manteiga de cacau como agente antioxidante (●).....	70
<b>Figura 5.11</b> - Perfil de formação de monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu catalisada por lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO <sub>2</sub> -PVA empregando substrato na razão molar 1:15 (óleo/glicerol) sob atmosfera inerte (○) e na presença de manteiga de cacau como agente antioxidante (●).....	71
<b>Figura 5.12</b> - Mecanismo da ação de agentes antioxidantes na matéria-prima lipídica .....	74

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Exemplos de monoglicerídeos e suas principais aplicações .....	23
<b>Tabela 3.2</b> – Exemplos de estudos sobre a glicerólise enzimática descritos na literatura ..	29
<b>Tabela 3.3</b> – Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes .....	31
<b>Tabela 3.4</b> – Aplicações industriais de lipases.....	34
<b>Tabela 3.5</b> - Especificação da lipase de <i>B. cepacia</i> .....	38
<b>Tabela 3.6</b> - Diferentes aplicações para a lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada.....	39
<b>Tabela 3.7</b> - Composição dos agentes antioxidantes (compostos principais).....	46
<b>Tabela 4.1</b> - Propriedades catalíticas da lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO <sub>2</sub> -PVA .	52
<b>Tabela 4.2</b> - Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos MAGs.....	56
<b>Tabela 4.3</b> - Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos DAGs ....	56
<b>Tabela 4.4</b> - Condições de operação estabelecidas no método de dosagem dos TGAs ....	57
<b>Tabela 5.1</b> – Seletividade de formação de monoglicerídeos a partir de reações de glicerólise de óleo de babaçu usando lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO <sub>2</sub> -PVA.....	64
<b>Tabela 5.2</b> – Produtividade na formação de monoglicerídeos nas reações de glicerólises contínuas do óleo de babaçu empregando diferentes razões molares.....	69
<b>Tabela 5.3</b> – Comparação dos resultados obtidos empregando manteiga de cacau e atmosfera inerte na síntese enzimática de monoglicerídeos a partir da glicerólise do óleo de babaçu .....	71
<b>Tabela 5.4</b> – Valores médios dos coeficientes de absorção ( <i>E</i> ) dos produtos de oxidação primários (POP) e secundários (POS) obtidos na glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada em SiO <sub>2</sub> -PVA .....	72

## ABREVIACOES E SÍMBOLOS

<b>MAG</b>	Monoglicerídeos
<b>DAG</b>	Diglicerídeos
<b>TAG</b>	Triglicerídeos
<b>POP</b>	Produtos de oxidação primária
<b>POS</b>	Produtos de oxidação secundária
<b>GRAS</b>	Generally Regarded as Safe
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration – USA
<b>SiO<sub>2</sub>-PVA</b>	Polissiloxano-lcool polivinílico
<b>EPA</b>	cido eicosapentaenoico
<b>DHA</b>	cido docosahexanóico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
3.1. Monoglicérides (MAG) .....	23
3.1.1. Propriedades e funcionalidades de MAG .....	24
3.1.2. Obtenção de monoglicérides por via enzimática .....	24
3.2. Lipases .....	30
3.2.1. Propriedades das lipases .....	30
3.2.2. Reações catalisadas por lipases.....	31
3.2.3. Fontes de lipases .....	33
3.2.4. Aplicações de lipases .....	33
3.2.5. Vantagens e desvantagens da utilização de lipases .....	35
3.2.6. Uso de lipases imobilizadas .....	36
3.3. Lipase microbiana de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	37
3.3.1. Aspectos gerais da lipase de <i>B. cepacia</i> .....	37
3.3.2. Especificidade da lipase de <i>B. cepacia</i> .....	38
3.3.3. Imobilização da lipase de <i>B. cepacia</i> .....	38
3.4. Matérias-primas para reação de glicerólise .....	40
3.4.1. Óleos vegetais .....	40
3.4.2. Glicerol .....	41
3.5. Oxidação de óleos e gorduras .....	42
3.6. Antioxidantes .....	44
3.7. Controle da oxidação lipídica no curso de reações enzimáticas .....	47
3.8. Reatores enzimáticos .....	49
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
4.1. Materiais .....	51
4.1.1. Biocatalisador .....	51
4.1.2. Materiais de partida .....	51
4.1.3. Antioxidantes .....	51
4.1.4. Outros reagentes .....	51
4.2. Metodologia experimental .....	52
4.2.1. Imobilização da lipase no suporte.....	52
4.2.2. Síntese de monoglicérides por glicerólise descontínua do óleo de babaçu .....	52
4.2.3. Glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo.....	53
4.2.4. Separação dos produtos formados nas reações de glicerólise.....	55
4.3. Métodos de análises .....	55
4.3.1. Atividade hidrolítica .....	55
4.3.2. Teor de umidade .....	55
4.3.3. Dosagem de glicérides por cromatografia gasosa.....	55
4.3.4. Análise espectroscópica dos produtos oxidados (primários e secundários) .....	57
4.4. Cálculos .....	58

4.4.1. Cálculo de produtividade de monoglicerídeos.....	58
4.4.2. Cálculo da seletividade para a formação de monoglicerídeos .....	58
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
5.1. Seleção do agente antioxidante na condução da glicerólise do óleo de babaçu .....	60
5.2. Influência da relação molar entre óleo e glicerol na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo .....	65
5.3. Reação de glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo em fluxo contínuo utilizando manteiga de cacau como agente antioxidante .....	70
5.4. Análise dos produtos oxidados (primários e secundários) obtidos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu .....	72
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Monoglicerídeos são surfatantes não iônicos, que possuem o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration-USA*), sendo amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de cosméticos, por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos. São basicamente monoésteres formados por ácidos graxos e glicerol e dependendo da orientação das moléculas duas formas isoméricas podem existir (FREITAS et al., 2008).

Com o crescente interesse das indústrias alimentícias na manufatura por produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, a substituição da rota química pela enzimática na produção de monoglicerídeos (MAG) apresenta-se como uma alternativa promissora. Neste processo são utilizadas condições amenas de temperatura (40-70°C), evitando a ocorrência de reações paralelas de polimerização e alterações *trans* nas moléculas, resultando em produtos de melhor qualidade e menor consumo de energia. Além disso, é possível explorar tanto a seletividade quanto a especificidade das enzimas, possibilitando a síntese de produtos que não poderiam ser obtidos pela rota química convencional (FREITAS et al., 2008; FERREIRA-DIAS et al., 2001).

Entre as abordagens investigadas para a síntese enzimática de MAGs, a glicerólise de óleos e gorduras catalisada por lipases em sistema isento de solvente, a pressão atmosférica e baixas temperaturas, têm atraído interesse tanto na área acadêmica como também no setor industrial. O processo é considerado um método alternativo prático para a produção de monoglicerídeos e diglicerídeos, devido a possibilidade de separação dos produtos finais por destilação à vácuo e possibilidade de recuperação e reciclagem das enzimas imobilizadas (FREITAS et al, 2008).

Entretanto, nas reações que envolvem modificação enzimática de óleos e gorduras um rígido controle deve ser efetuado para evitar oxidação do substrato. Como é de conhecimento, óleos e gorduras são susceptíveis a oxidação em função da sua composição e vários compostos gerados por este processo, como hidroperóxidos e produtos secundários, podem causar uma inativação significativa na atividade catalítica das lipases (PIROZZI, 2003).

Em trabalhos desenvolvidos anteriormente visando a síntese enzimática de MAGs, elevadas concentrações foram obtidas em processo conduzido sob atmosfera inerte (FREITAS et al. 2009 a,b), sendo esta a estratégia mais indicada para evitar a oxidação do

substrato em reações mediadas por lipases (AGUEDO et al., 2009; NUNES et al., 2009). No entanto, esse sistema acarreta um custo adicional ao processo, visto ser necessária a inserção de uma linha contínua de gás nitrogênio durante todo o período de síntese. Portanto, o estudo de alternativas para a substituição do nitrogênio, como por exemplo, a utilização de compostos naturais como agentes antioxidantes, é bastante atraente para tornar o processo enzimático competitivo industrialmente.

No presente trabalho foram selecionados compostos de origem vegetal como óleo de copaíba, óleo de buriti, manteiga de cacau, manteiga de tucumã, orégano, tomilho branco, alecrim, sálvia sclarea, cravo talo e cananga, visando verificar o poder antioxidativo destes agentes na síntese de MAG.

Copaíba é uma das espécies amazônicas mais conhecidas e utilizadas pelas populações tradicionais por possuir ação cicatrizante e anti-inflamatória, sendo considerado um antibiótico natural. O buriti é uma árvore originária do Brasil, possuindo uma composição rica em ácidos graxos, elevado teor de carotenóides e vitamina A. A manteiga de cacau é um derivado de grande importância em função de sua composição química e características físicas, sendo plenamente utilizada em preparações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. A manteiga de tucumã é rica em ômega 3, 6 e 9, possui elevado teor graxo e vitaminas A e E em sua composição. As especiarias: orégano, tomilho branco, alecrim, sálvia sclarea, cravo talo e cananga possuem elevado poder antioxidante devido à presença de ácido fenólico. Adicionalmente, possui propriedades antimicrobianas contra bactérias como a *Listeria monocytogenes* (INOVAM BRASIL, 2013).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver uma rota viável para a produção de monoglicerídeos por reações de glicerólise do óleo de babaçu, oleaginosa abundante no Brasil, utilizando lipases imobilizadas como catalisadores e agentes antioxidantes de origem vegetal. As sínteses de monoglicerídeos foram catalisadas pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA. Esta preparação de lipase foi selecionada em função dos resultados promissores obtidos por este sistema imobilizado, conforme descrito na literatura (FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2010). A motivação para utilização do óleo de babaçu está no fato desta oleaginosa além de apresentar baixo custo, possuir uma rica composição em ácidos graxos saturados (cerca de 80%) e não competir diretamente com a cadeia alimentícia (SUAREZ et al., 2009).

## 2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes agentes antioxidantes naturais lipossolúveis na síntese enzimática de monoglicerídeos (MAGs), via glicerólise do óleo de babaçu, empregando lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz híbrida de SiO<sub>2</sub>-PVA, visando evitar a oxidação do óleo vegetal (deteriorização da matéria-prima) durante a síntese, bem como promover a formação de MAGs de forma sustentável. Considerando estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante à execução das seguintes etapas:

1. Obtenção de dados experimentais referentes à glicerólise do óleo de babaçu em regime descontínuo empregando diferentes agentes antioxidantes de origem vegetal, comparando a sua capacidade antioxidativa com sistemas reacionais controles, sob atmosfera inerte (controle positivo) e isento de estratégia para evitar a oxidação lipídica (controle negativo);
2. Selecionar o composto natural com atividade antioxidante satisfatória para aplicação na síntese contínua em reator de leito fixo e avaliar o desempenho obtido com sistema reacional operando em atmosfera inerte (controle positivo);
3. Otimizar as condições operacionais referentes a glicerólise contínua, visando controlar a oxidação lipídica e aumentar a produção de MAG, avaliando-se a formação dos produtos de oxidação (primário e secundário).



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Monoglicerídeos (MAG)

Monoglicerídeos (MAGs) são produzidos industrialmente por glicerólise química dos óleos e gorduras a uma temperatura elevada de 210 – 240°C, empregando catalisadores alcalinos inorgânicos. O produto produzido por esta estratégia tem vários inconvenientes como baixo rendimento, sabor de queimado e cor escura (MAJID; CHEIRSILP, 2012). Devido às desvantagens do processo convencional, o uso de enzimas como catalisador, apresenta-se com um potencial elevado na busca de alternativas ao método clássico. Nesses processos a utilização de condições reacionais brandas que implica em baixo consumo energético, e à seletividade da enzima lipase que de forma integrada resulta em produtos de melhor qualidade, torna a produção de MAG viável. O produto obtido por esse método é uma mistura contendo 35-60% monoacilgliceróis, 35-50% de diacilgliceróis, triacilgliceróis 1-20%, 1-10% ácidos graxos livres, e sais de metais alcalinos. Na Tabela 3.1 são sumarizados diferentes tipos de monoglicerídeos e algumas de suas principais aplicações:

**Tabela 3.1** – Exemplos de monoglicerídeos e suas principais aplicações.

Monoglicerídeo	Aplicação
Monoglicerídeos dos ácidos EPA* e DHA** Monopentadecanoato de glicerila	Previnem efeitos danosos em pessoas que possuem desordens vasculares. Tratamento de cabelos.
Monocaprina	Possui propriedades antivirais, bacteriana e microbiana sendo utilizadas em emulsões para mucosa bucal, reduzindo os prejuízos causados por bactérias que se alojam entre a gengiva e os dentes.
Monolaurina	Possui propriedades antivirais, bacteriana, protozoal e microbiana.
Monooleína	Utilizada como sistema de liberação de drogas, carreador farmacêutico e emulsificante.
Monoacetato de glicerila	Pode melhorar a qualidade das gorduras, como por exemplo, a margarina.
Monolactato de glicerila	Usado na manufatura de bolos, sobremesas e cremes industriais.
Monosuccinato de glicerila	Usado como agente modificador de massas e emulsificantes na manufatura de bolos industriais.
Monocitrato de glicerila	Emulsificante hidrofílico, usado na manufatura de margarinas e produtos lácteos. É também utilizado como estabilizante de emulsões para maioneses e molhos.

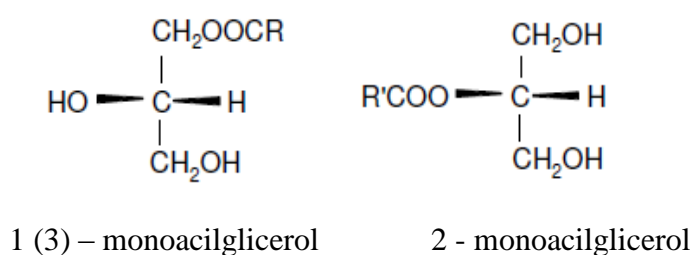
\*EPA= ácido eicosapentaenoico. \*\*DHA= ácido docosahexanóico. Fonte: (FREITAS, 2009).

Entre as rotas para a obtenção de monoglicerídeos, as reações enzimáticas empregando glicerol em esterificações (glicerol e ácidos graxos) e glicerólises (glicerol e óleos vegetais) possuem relevância adicional no atual contexto de prioridades nacionais, em função da produção de biodiesel, a qual tem este poli-álcool como subproduto (FREITAS et al., 2009).

### 3.1.1. Propriedades e funcionalidades de MAG

Monoglicerídeos, monoésteres de glicerol, são moléculas constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica, apresentando, portanto, propriedades tensoativas e emulsificantes (ZHENG; CHEN; SHEN, 2008). São compostos não iônicos e moléculas anfifílicas, apresentando grupamentos hidroxilas livres do glicerol, proporcionando características hidrófilas, enquanto que a cadeia de acila fornece características lipofílicas (Figura 3.1) (MCCLEMENTS, 1998).

Devido às quantidades relativamente elevadas de ácidos graxos (caráter hidrofóbico) em misturas de MAG + DAG, a dispersão em água é bastante limitada (KROG, 1997). No entanto, MAGs são mais dispersivos em água, tornando MAGs puros capazes de interagir com a água, em estruturas bem definidas, conhecidas como mesofases (BOYLE, 1997). Este comportamento exclusivo do monoglicerídeo em água resulta em diferentes condições: como a concentração de MAG, temperatura, comprimento de ácidos graxos, grau de saturação e isomeria (KROG, 1997).



**Figura 3.1-** Ilustração da estrutura química de diferentes acilgliceróis parciais. Fonte: MCCLEMENTS, 1998.

### 3.1.2. Obtenção de monoglicerídeos por via enzimática

Três metodologias são descritas para a obtenção de monoglicerídeos por catálise enzimática empregando a enzima lipase: (1) hidrólise ou alcoólise de triglicerídeos, (2) glicerólise de triglicerídeos e (3) esterificação de glicerol com ácidos graxos. O primeiro

método fornece 2-MAG, enquanto o segundo método usualmente fornece uma mistura de monoglicerídeos, na qual o 1(3) MAG é o composto predominante, geralmente obtido com um rendimento elevado (BORNSCHEUER, 1995).

### Método 1: Hidrólise ou Alcoólise

A hidrólise contínua de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos e glicerol é o processo padrão utilizado em escala industrial. As gorduras são hidrolisadas em tratamento contracorrente com vapor em elevadas temperaturas e pressões (LI; WARD, 1993). Hidrólises enzimáticas usando lipases não específicas oferecem um processo alternativo para a produção de ácidos graxos em condições moderadas. Vários métodos estão descritos na literatura, incluindo reações na presença ou na ausência de solventes orgânicos. Para obtenção de MAG por hidrólise enzimática, é necessário o controle da reação para evitar uma hidrólise completa. A maneira mais fácil de alcançar esse propósito é a aplicação de lipases 1,3-específicas resultando em 2-MAG (Figura 3.2) (BORNSCHEUER, 1995).

O principal problema na reação de hidrólise é o baixo rendimento em MAG, pois são produzidos dois mols de ácido graxo livre por mol de MAG, e a migração do grupo acila (da posição 2 para a posição 1(3) do glicerol) deve ser suprimida (HOLMBERG; ÖSTERBERG, 1988). Por outro lado, a reação de alcoólise pode ser realizada na presença de solventes apolares, reduzindo a velocidade de migração do grupo acila. Por esta razão, a alcoólise de triacilgliceróis fornece rendimentos mais elevados (75-97%) que a hidrólise.

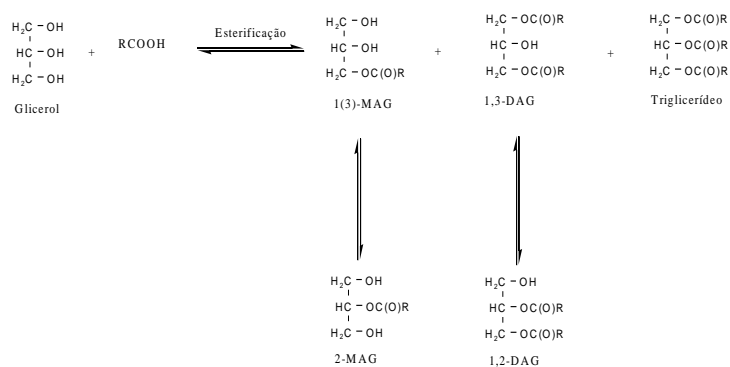


**Figura 3.2** - Obtenção de monoglicerídeos por hidrólise ou alcoólise por via enzimática. Fonte: (BORNSCHEUER, 1995).

Adicionalmente as reações de alcoólise são mais rápidas por não ocorrer mudança do pH durante a reação e também porque a lipase não sofre inibição dos ácidos graxos livres. A adição do álcool em excesso desloca o equilíbrio para a formação de monoglicerídeos (BORNSCHEUER, 1995).

## Método 2: Esterificação do glicerol com ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos

A esterificação também produz monoglicerídeos sem desperdiçar o ácido graxo, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG e TAG, conforme a especificidade da lipase (Figura 3.3).



**Figura 3.3** - Possíveis produtos formados na esterificação do glicerol com ácidos graxos. Fonte: (BORNSCHEUER, 1995).

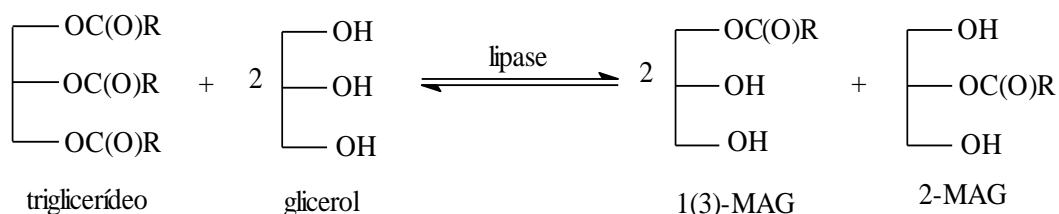
Na esterificação do glicerol com ácidos graxos utilizando lipases 1,3-específicas, o glicerol pode ser esterificado na posição 1 ou 3, podendo formar 1(3) MAG e 1,3 DAG (diglicerídeo). Quando lipases não específicas são empregadas, o glicerol pode ser esterificado em qualquer posição, podendo formar 1(3) e 2 MAG, 1,3 e 1,2 DAG e TAG (triglicerídeo). Deve-se levar em consideração que ainda pode ocorrer a migração do grupo acila, ocasionando mudanças de posições desse grupo na molécula do glicerol (BORNSCHEUER, 1995).

Para deslocar a reação para a formação de monoglicerídeos, diversas estratégias são usadas para remover água ou álcool, como por exemplo, redução de pressão ou uso de agentes dessecantes (MILLQVIST - FUREBY et al., 1996). A influência do tamanho da cadeia dos ácidos graxos na reação de esterificação com glicerol tem sido estudada por diversos grupos (TSUJISAKA et al., 1997).

## Método 3: Glicerólise enzimática

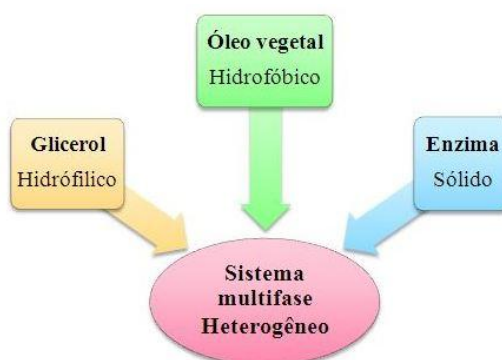
A glicerólise enzimática catalisada por lipases oferece uma variedade de benefícios comparada com a glicerólise química, em função das melhorias do processo (redução de energia e resíduos) e da qualidade do produto, o que a torna ambientalmente favorável (KAEWTHONG; H-KITTIKUN, 2004). Nesse método, o álcool utilizado é o glicerol que promove a conversão total dos três ácidos graxos (Figura 3.4), empregando lipases tanto

específicas como não-específicas. Na prática, as reações promovem a migração do grupo acila de tal forma que se estabelece um equilíbrio da concentração dos produtos formados na razão de 9:1 (1(3) MAG e 2-MAG) (FREITAS et al., 2008).



**Figura 3.4** – Esquema da reação de obtenção de MAGs por glicerólise enzimática. Fonte: FREITAS et al., 2008.

Na síntese de MAG via glicerólise empregando lipase imobilizada, o óleo compreende uma fase hidrofóbica, o glicerol uma fase hidrofílica, e a enzima constitui uma fase sólida (Figura 3.5). Neste sistema, uma importante limitação é a baixa miscibilidade entre os substratos presentes no meio reacional, devido a grande diferença de polaridade entre eles (PAWONGRAT; XU; H-KITTIKUN, 2007). No entanto, durante o progresso da reação, os monos e diglicerídeos produzidos podem atuar como emulsionantes das fases hidrofóbica e hidrofílica, melhorando o contato entre os dois substratos e, portanto, aumentando as taxas de conversão. Com base nestas considerações, a reação de glicerólise pode ser realizada empregando apenas glicerol e óleo, como substratos, sem a necessidade de utilizar solventes ou aditivos (FELTES et al., 2013).



**Figura 3.5** - Ilustração do meio reacional utilizado na glicerólise enzimática. Fonte adaptada: (KAEWTHONG; H-KITTIKUN, 2004).

Kruger et al. (2011) estudaram a reação de glicerólise do óleo de oliva e constataram que razões molares elevadas entre glicerol/óleo podem ocasionar velocidade reacional inicial baixa, provavelmente devido à elevada viscosidade do meio reacional causada pela grande quantidade de glicerol, dificultando a transferência de massa. Isto pode ser explicado pela aderência do glicerol no suporte da enzima. Este fenômeno está relacionado com as alterações que envolvem a transferência de massa, a formação de aglomerados e da "camada" de glicerol ao redor da enzima, dificultando a catálise enzimática e possibilitando a desativação da enzima. Além disso, a partir de uma determinada concentração de enzima, podem ocorrer limitações de homogeneidade do meio pela formação de aglomerados, o que afetaria também a transferência de massa, pela dificuldade de contato entre o meio reacional e o sítio ativo da enzima (KRUGER et al., 2011).

Na Tabela 3.2 apresenta-se um resumo de algumas das principais publicações em glicerólise, com o objetivo de ter-se uma visão geral dos estudos já realizados para a produção de emulsificantes a partir da reação de glicerol com óleos vegetais.

**Tabela 3.2** – Exemplos de estudos sobre a glicerólise enzimática descritos na literatura.

<b>Óleo vegetal (razão molar G:O)</b>	<b>Condições da reação</b>	<b>Catalisador</b>	<b>Solvente orgânico</b>	<b>Surfatante</b>	<b>Tempo de reação (h)</b>	<b>MAG (% m/m)</b>	<b>Referência</b>
Óleo de soja (8:1)	70°C, 300 rpm, 3,5% de água	Novozym 435 (2% em relação ao óleo)	isento	-	24	24,3	Fregolente et al. (2009)
Óleo de oliva (6:1)	70°C, 600 rpm	Novozym 435 (9% em relação ao meio reacional)	isento	Triton-X 100 (15%)	6	31,1	Valério et al. (2009)
Óleo de oliva (2:1)	70°C, 600 rpm	Novozym 435 (7,5% em relação ao meio reacional)	isento	Tween 65 (16%)	2	17,6	Valério et al. (2010)
Óleo de camélia (6:1)	50°C, 180 rpm	Novozym 435	<i>terc</i> -butanol	-	24	65	Zeng et al. (2010)
Óleo de oliva (9:1)	55°C, 600 rpm	Novozym 435 (10 a 15% em relação ao meio reacional)	<i>terc</i> -butanol	-	12	73	Kruger et al. (2011)
Óleo de palma (0,8:1)	45°C, 300 rpm	Lipase PS ( <i>Pseudomonas</i> sp.) (50% em relação ao meio reacional)	<i>terc</i> -butanol e hexano (1:1)	-	24	74,3	Majid; Cheirsilp (2012)
Óleo de peixe (1:2)	55°C, 600 rpm	Lipozyme® RM IM (10% em relação ao meio reacional)	isento	Tween 65 (10%)	48	75	Santos et al. (2013)
Óleo de babaçu (15:1)	50°C, 150 rpm	Lipase <i>B. cepacia</i> (10% em relação ao meio reacional)	isento	Lecitina de soja (100 ppm em relação ao meio reacional)	12	45	Freitas et al. (2013)

## 3.2. Lipases

Lipases (E.C.3.1.1.3) são definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Pertencem à classe de hidrolases que atuam sobre as ligações ésteres carboxílicos e hidrolisam, preferencialmente os triglicerídeos em diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol (BOUAID et al., 2007).

A diferenciação entre lipases e esterases tem sido relatada em função da diferença de especificidade 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 éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (SALAMEH; WIEGEL, 2007). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER et al., 1994).

As lipases podem ser de origem animal (hepática, pancreática e gástrica), de origem microbiana (bacteriana, fúngica e de levedura), ou vegetal, com variações nas suas propriedades catalíticas (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010). Este grupo de enzimas é muito eficiente para catalisar não só a hidrólise, mas também reações de esterificação e transesterificação envolvendo ésteres insolúveis em água (REIS et al., 2009). Esta versatilidade faz da lipase uma enzima muito útil para aplicações potenciais na alimentação, detergente, produtos farmacêuticos, artigos em couro, têxteis, cosméticos, e indústrias de papel (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009).

### 3.2.1. Propriedades das lipases

Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas à temperatura ambiente. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo que as lipases microbianas, de forma geral, são mais estáveis termicamente que as originárias de outras fontes.

A termoestabilidade é uma das características requeridas para enzimas com potencial para aplicação industrial, como as lipases, uma vez que muitos processos empregam temperaturas em torno de 50°C (KAMINI et al., 2000). Para tanto, é de fundamental importância o estudo da temperatura e pH ótimos, além de outros parâmetros



que são decisivos no dimensionamento de um processo enzimático (MALDONADO, 2006).

Existe uma diversidade muito grande de lipases que podem ser obtidas a partir de microrganismos e estas podem apresentar características muito distintas entre si (Tabela 3.3). Há lipases que tem sua atividade ótima em pH ácido, outras atuam próximo à neutralidade e, ainda há aquelas ditas alcalinas. Geralmente, a maioria das lipases fúngicas apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade ao pH que oscila entre 6,0 e 8,0 (FREIRE et al., 1997).

**Tabela 3.3** – Propriedades bioquímicas de lipases de diferentes fontes.

Propriedade	Fonte de lipase				
	<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')

Fonte: FREITAS et al., 2006.

Em relação à temperatura ótima também há uma ampla gama de lipases atuando em várias faixas de temperatura. Os valores ótimos de atividade e estabilidade, em geral, situam-se na faixa de 30 a 40 °C, com exceção das lipases provenientes de fungos termofílicos, que são estáveis em temperaturas superiores a 55 °C (MALDONADO, 2006).

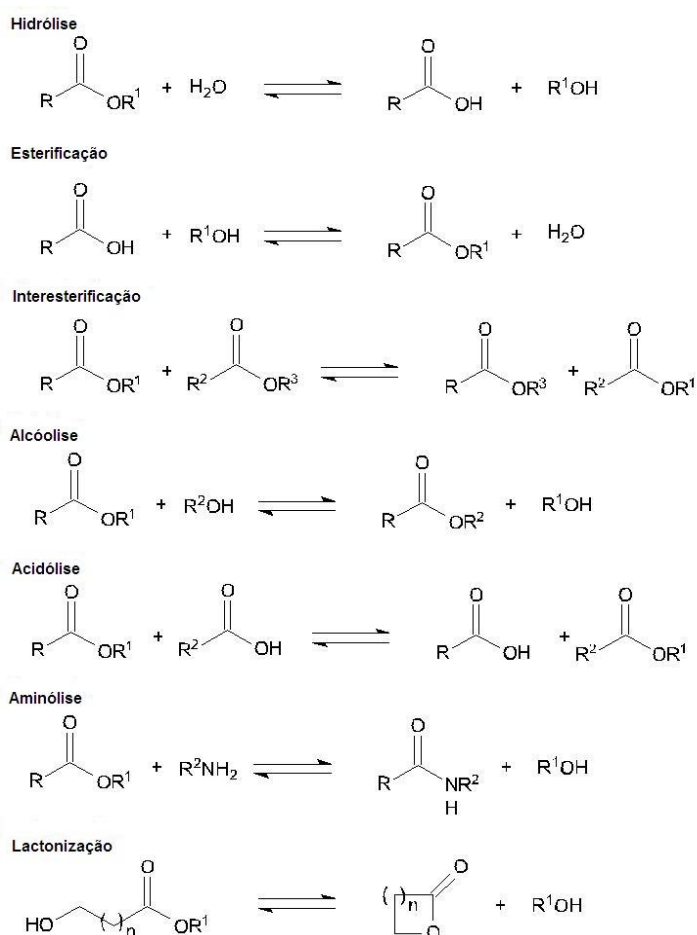
O número de lipases disponíveis vem aumentando desde 1980, sendo utilizadas como biocatalisadores industriais devido às suas propriedades tais como, biodegradabilidade, especificidade e alta eficiência catalítica (VERMA; KANWAR, 2008).

### 3.2.2. Reações catalisadas por lipases

Embora a função natural das lipases seja clivar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), liberando diacilgliceróis, monoalcilgliceróis e ácidos graxos, estas enzimas são também capazes de catalisar a reação

reversa sob determinadas condições, formando ésteres a partir de álcoois e ácidos carboxílicos.

As reações que envolvem lipases podem ser fortemente influenciadas pelas modificações das condições reacionais, alterando o equilíbrio termodinâmico em favor de uma das rotas. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (DE CASTRO et al., 2004). O mecanismo é similar para todas as reações mediadas por hidrolases. É formado um complexo acil-enzima, seguida da subsequente liberação dos produtos finais. O favorecimento do tipo de reação depende de alguns parâmetros, tais como, seleção de solvente, hidratação da enzima, tempo de reação, tipo e concentração do substrato (PERSSON et al., 2002). A Figura 3.6 ilustra os diferentes tipos de reações que podem ser catalisadas por lipases.



**Figura 3.6** - Reações catalisadas por lipases.  
Fonte: (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

### 3.2.3. Fontes de lipases

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os microrganismos, embora estas também sejam produzidas por eucariotos superiores (plantas e animais). Tanto microrganismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias, incluindo-se os actinomicetos), são produtores de lipases microbianas (MESSIAS et al., 2011).

Lipases obtidas a partir de fungos são especialmente valorizadas, visto que são normalmente produzidas extracelularmente, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação além de que a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (JAEGER et al., 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases, e conseqüentemente as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii* e *Penicillium roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK).

Por outro lado, o rápido crescimento celular das bactérias em relação aos fungos é uma das vantagens citadas das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER et al., 1999). Apesar de pouco exploradas em escala industrial, várias lipases produzidas por vegetais foram purificadas e estudadas quanto às suas características bioquímicas e quanto a potenciais aplicações na biotransformação de lipídeos (MUKHERJEE, 1994).

### 3.2.4. Aplicações de lipases

Lipases tem uma ampla aplicação industrial como no setor alimentício, laticínios, indústrias de chá, cosméticos, produtos farmacêuticos, agroquímicos, formulação de detergentes, indústria de couro e em vários processos de biorremediação, como ilustrado na Tabela 3.4 (PATIL; CHOPDA; MAHAJAN, 2011). São as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica, sendo mais de 20% utilizadas nas biotransformações. Estão na terceira posição em vendas, perdendo apenas para as proteases e amilases (JAYAPRAKASH; EBENEZER, 2010).

**Tabela 3.4** – Aplicações industriais de lipases.

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Aplicação</b>
Alimentos	Hidrólise seletiva dos óleos e gorduras presentes em diversos alimentos.	Na indústria de laticínios, as lipases são muito utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores.  Lipases 1,3-específicas são empregadas na hidrólise de triglicerídeos para a obtenção de monoglicerídeos, que são utilizados como emulsificantes.
Detergentes	Capacidade de catalisar a hidrólise de óleos e/ou gorduras de composição distintas.	Emprego de lipases como componente funcional na formulação de detergentes.
Óleos e gorduras	Modificação enzimática de óleos.	Surfatantes (monoglicerídeos), enriquecimento de óleos vegetais e animais com ácidos graxos poli-insaturados.
Fármacos e química fina	As características de região, enantio e quimiosseletividade das lipases permitem a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos.	Produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores.  Produção de (R)-feniletilmetoxiamida (composto intermediário para a obtenção de fármacos e pesticidas).
Tratamento de efluentes	Aceleração na biodegradação.	Tratamento de resíduos domésticos, limpeza de tubulações de esgoto, biodegradação de polímeros, biodegradação de lamas de perfuração de poços de petróleo.
Combustíveis	Transesterificação de triglicerídeos com alcoóis de cadeia curta.	Produção de biodiesel.

Fonte: (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

As lipases são empregadas na fabricação de alimentos para liberar os ácidos graxos presentes nestes produtos por meio de hidrólise seletiva dos óleos e gorduras existentes no alimento. Dependendo do comprimento da cadeia de carbono e do grau de insaturação, o ácido graxo livre fornece ao alimento cores, sabores e aromas não usuais, desempenhando

um papel importante nas propriedades físico-químicas, sensoriais e nutricionais de muitos produtos (FREIRE; CASTILHO, 2008).

O uso de lipases como compostos funcionais na formulação de detergentes é responsável pela venda de 1000 toneladas dessa enzima por ano, cerca de 32% da venda total de lipase. As principais características são: a estabilidade sob as condições de lavagem (pH entre 10 e 11 e temperatura entre 30 a 60°C), a resistência aos outros componentes da formulação (tal como sulfonatos de alquilbenzeno) e especificidade de substrato baixa, isto é, uma capacidade para hidrolisar as gorduras com várias composições (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

As indústrias químicas farmacêuticas têm utilizado lipases em seus processos produtivos, visto que sua regio-, enantio-, e quimiosseletividade permitem a utilização destas enzimas para a resolução de misturas racêmicas e para a remoção de alguns compostos (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

A utilização de lipase na produção de biodiesel tem mostrado resultados promissores nos últimos anos. Empregando-se a via enzimática, o glicerol pode ser facilmente removido sem a necessidade de um processo de separação complexo. Além disso, óleos contendo elevados teores de ácidos graxos livres, também podem ser utilizados como matéria-prima, sendo completamente convertidos em ésteres de alquila por esterificação. A escolha da melhor fonte da enzima e substrato e a otimização das condições operacionais, tais como seleção do solvente, temperatura, teor de água, ácidos graxos livres, viscosidade do meio reacional e tipo de biorreator, pode determinar o sucesso do processo (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

### **3.2.5. Vantagens e desvantagens da utilização de lipases**

A utilização de lipases e de enzimas de um modo geral em escala industrial, apresenta diversas vantagens em relação à catálise química (VILLENEUVE, 2007). Dentre elas, pode-se citar a sua elevada seletividade (químio-, régio- e enantioseletividade); a redução de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentícia; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais, as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes, além de serem “ambientalmente favoráveis” (FABER, 2004).

Entretanto, algumas desvantagens podem limitar a utilização plena destes biocatalisadores, incluindo o elevado custo de purificação, a possibilidade de causar

alergias, a instabilidade da sua estrutura (após isolamento do meio de cultivo), bem como sensibilidade às condições reacionais. As enzimas podem ser inibidas por substâncias que estão presentes no meio reacional, desnaturadas por solventes orgânicos ou por temperaturas relativamente elevadas (FABER, 2004). Muitos métodos têm sido propostos a fim de minimizar estes inconvenientes, sendo um deles a imobilização de enzimas em suportes sólidos.

### **3.2.6. Uso de lipases imobilizadas**

A estratégia mais utilizada para minimizar as desvantagens do uso das lipases é empregá-la na forma imobilizada. Na imobilização a enzima é quimicamente ou fisicamente ligada a um "suporte" ou ainda aprisionada em uma matriz na qual o substrato pode difundir-se através desta (BELLOT et al., 2001).

Lipases imobilizadas em suportes sólidos são de fácil separação, permitindo assim a sua reutilização em bateladas consecutivas. O empacotamento da enzima imobilizada numa coluna para processamento contínuo também é facilitado, além da imobilização ter um efeito estabilizador para utilização por longo prazo à temperaturas elevadas (NAKAOKI et al., 2005). Para reações de esterificação, por exemplo, num sistema de ácido láurico em iso-octano foi constatado um aumento de 51 vezes na atividade hidrolítica, quando a lipase foi empregada na forma imobilizada em comparação com a sua forma livre (GOTO et al., 2005).

A imobilização do biocatalisador sem perda de sua atividade por um determinado período de tempo pode assegurar sua utilização repetida ou seu uso prolongado em reatores contínuos, resultando em economia nos processos industriais. Assim, a utilização de enzimas imobilizadas pode diminuir o custo do processo, facilitar a recuperação dos produtos, melhorar a operação em reatores e minimizar a produção de efluentes. Além disso, o processo de imobilização pode alterar as propriedades enzimáticas, resultando em biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas, dependendo do tipo de imobilização e da enzima (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Diversos procedimentos para a imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos, objetivando reduzir a perda de atividade catalítica na etapa de imobilização e, conseqüentemente, diminuir o custo do processo pelo uso mais efetivo da atividade catalítica retida na matriz de imobilização. Para minimizar essas desvantagens, torna-se

necessário um conhecimento integrado de alguns parâmetros (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009):

- Propriedades do suporte (porosidade, natureza química, hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, estabilidade química e mecânica, tamanho da partícula);
- Natureza da enzima (tamanho da molécula, flexibilidade conformacional necessária à catálise, presença de regiões hidrofóbicas, presença de regiões hidrofílicas, estabilidade nas condições de imobilização);
- Fatores específicos relativos ao sistema (meio reacional, limitações difusionais, inibição enzimática, precipitação de produtos, viscosidade da mistura, termodinâmica reacional).

### **3.3. Lipase microbiana de *Burkholderia cepacia***

Para a realização do presente trabalho, a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA foi selecionada em função dos inúmeros relatos promissores obtidos por este sistema imobilizado (FREITAS et al., 2007; FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010; FREITAS et al., 2010). Os itens 3.3.1 e 3.3.2 apresentam algumas características específicas desta lipase, bem como sua aplicação em diferentes sistemas enzimáticos.

#### **3.3.1. Aspectos gerais da lipase de *B. cepacia***

A espécie bacteriana de *Pseudomonas cepacia* renomeada de *Burkholderia cepacia* (REETZ; JAEGER, 1998) é uma bactéria gram-negativa produtora de lipases com características de alta estabilidade e atividade. A lipase produzida por cepas de *B. cepacia* possuiu uma grande estabilidade em solventes orgânicos e elevado grau de enantiosseletividade (JAEGER et al., 1997).

Esta lipase é comercializada pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) e disponibilizada em duas formas: solúvel em água em pó fino (Lipase PS "Amano" SD) e na forma imobilizada, projetada especificamente para uma fácil recuperação (Lipase PS "Amano" IM). As especificações dessas enzimas são apresentadas na Tabela 3.5.

Além disso, as lipases produzidas pelo gênero *Pseudomonas* possuem características de catálise especiais, como termoestabilidade e enantiosseletividade. Por

exemplo, cepas de *B. cepacia* destacam-se por serem utilizadas na produção industrial de lipases empregadas em síntese de compostos quirais, relevantes para as indústrias farmacêuticas e químicas (AMANO ENZYME INC., 2013).

**Tabela 3.5** - Especificação da lipase de *B. cepacia*.

<b>Produto</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Temperatura ótima</b>	<b>Especificação</b>
<b>Lipase PS “Amano” SD</b> ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	7.0	50°C	>23.000 U/g
<b>Lipase PS “Amano” IM</b> ( <i>Burkholderia cepacia</i> )	7.0	50°C	>500 U/g

Fonte: (AMANO ENZYME INC., 2013).

### 3.3.2. Especificidade da lipase de *B. cepacia*

Grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos (especificidade de substrato), em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acila em questão (GUPTA, GUPTA; RATHI, 2004).

Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais, podendo ser específicas com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato (DE CASTRO et al, 2004). A lipase de *B. cepacia* é classificada como não específica, catalisando a hidrólise completa de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, de um modo aleatório, mono e diacilgliceróis sendo produtos intermediários.

### 3.3.3. Imobilização da lipase de *B. cepacia*

A Tabela 3.6 ilustra alguns exemplos da utilização da lipase de *B. cepacia* imobilizada em diferentes tipos de suporte, empregando técnicas de imobilização diferenciadas, assim como diferentes aplicações para estes derivados imobilizados.



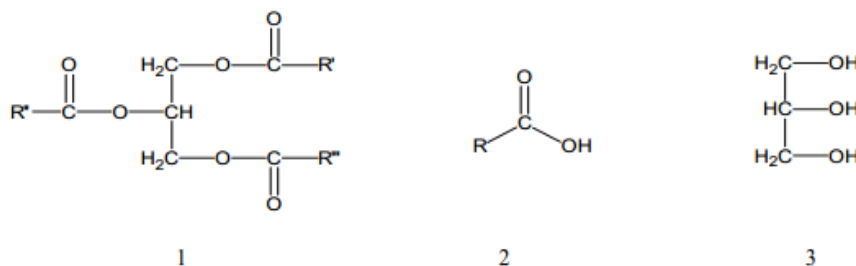
**Tabela 3.6** - Diferentes aplicações para a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada.

<b>Suporte/Tipo de Imobilização</b>	<b>Finalidade e Principais Resultados</b>	<b>Referência</b>
Accurel EP 100 (adsorção)	Comparação da atividade em solvente orgânico, ( <i>n</i> -heptano) da enzima livre, encapsulada em micelas reversas e imobilizada. A enzima imobilizada foi duas vezes mais ativa que a livre e cinco vezes mais ativa que a encapsulada. A otimização da síntese do oleato de etila forneceu um rendimento de 100% em 3h de reação. A enzima foi reutilizada 11 vezes sem perdas de atividade.	Salum et al., (2008).
Encapsulação em matriz sol-gel e ligação cruzada com glutaraldeído	Aplicação em reações contendo solventes orgânicos. A atividade da enzima aumentou (174%) após a imobilização por ligação cruzada.	Hara et al., (2008).
Hidrogel – beidellite $\text{Na}_x(\text{Al}_2)(\text{Si}_4-x\text{Al}_x)\text{O}_{10}(\text{OH},\text{F})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Adsorção)	Verificação da influência de diferentes composições dos íons do suporte na imobilização da enzima. A atividade específica (quantificada na transesterificação do acetato de vinila com <i>n</i> -octanol) foi maior para os suportes com baixa concentração de alumínio e sódio.	Secundo et al., (2008).
Celite (adsorção)	Síntese do biodiesel a partir do óleo de pinhão manso. As condições operacionais que atingiram 98% de rendimento foram: 50°C, 4-5% (m/m) de água em 8h, 10% de enzima em relação a massa do óleo (0,5g), razão molar óleo:álcool 1:4. A enzima foi reutilizada por 4 vezes sem perdas de atividade.	Shah; Gupta, (2007).
Sílica aerogel com fibras de quartzo secas pela técnica do CO <sub>2</sub> supercrítico (encapsulação)	Estudos de imobilização e aplicação na transesterificação do óleo de girassol com acetato de metila. A enzima imobilizada no gel contendo 40% de metiltrimetoxisilano apresentou resultados satisfatórios.	Orçaire et al., (2006).
Toyonite 200 M em condições ácidas, Celite, Amberlite (adsorção)	Comparação de imobilização em diferentes suportes. A imobilização da enzima em Toyonite 200M apresentou maior seletividade na adsorção de lipases que os demais suportes.	Kamori et al., (2000).
Sol-gel $\text{CH}_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ com nanoestrutura de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (encapsulação)	Atividade da enzima aumentou 300% após a imobilização (dosagem pela esterificação do ácido láurico com <i>n</i> -octanol em isoctano).	Reetz et al., (1998).
SiO <sub>2</sub> -PVA (álcool polivinílico polissiloxano) (Ligação covalente)	O derivado imobilizado foi 17 vezes mais estável do que a lipase livre, mostrando que este procedimento estabilizou termicamente a enzima.	Da Rós et al., (2010)

### 3.4. Matérias-primas para reação de glicerólise

#### 3.4.1. Óleos vegetais

Óleos e gorduras são formados por diversos compostos simples. Quimicamente são ésteres. O componente alcoólico é invariavelmente o glicerol e o componente ácido é formado pelos ácidos monocarboxílicos não ramificados (ácidos graxos).



**Figura 3.7** - Representação estrutural: (1) triglicerídeo, (2) ácido graxo e (3) glicerol.

Os óleos vegetais possuem de uma a seis insaturações (ligações duplas) na cadeia carbônica e são líquidos à temperatura ambiente. Além de triacilgliceróis, os óleos contêm vários componentes em menor proporção, como mono e diglicerídeos (importantes como emulsionantes); ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante); proteínas, esteróis e vitaminas. Por possuírem um número maior de insaturações, expressam menor ponto de fusão e são líquidos à temperatura ambiente (MORETTO; FETT; GONZAGA, 2002).

A maioria dos ácidos graxos de óleos comestíveis possui uma cadeia carbônica de 16 a 18 carbonos, embora o óleo de coco contenha um alto grau de ácido láurico (12 átomos de carbono). As gorduras láuricas, como por exemplo, o óleo de babaçu é muito importante industrialmente, visto que ao contrário de outras gorduras saturadas, essas gorduras têm temperatura de fusão baixa e bem definida. No Brasil as principais fontes de gorduras láuricas são os óleos de coco, palmiste e de babaçu (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006).

Atualmente, encontram-se no Brasil, vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, onde a floresta úmida cede lugar à vegetação típica dos cerrados. São os estados de Maranhão, Piauí e Tocantins que concentram as maiores extensões de matas onde predominam os babaçus, formando muitas vezes e espontaneamente, agrupamentos

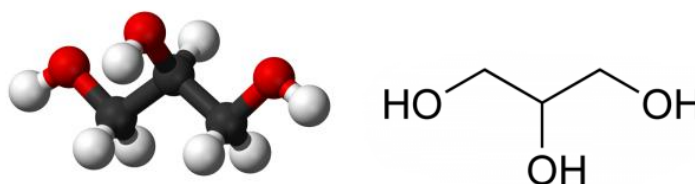
homogêneos, bastante densos e escuros, tal a proximidade entre os grandes coqueiros (ALBIERO et al., 2007).

Apesar da extraordinária potencialidade do babaçu, medida pela dimensão de ocorrência já disponível e nobreza das varias aplicações já testadas, a exploração do coco de babaçu ainda é realizada, em grande parte do nordeste, de forma artesanal, no entanto, ressalta-se que já se dispõe de equipamentos para a quebra automática do coco de babaçu, com a separação de seus constituintes (ALBIERO et al., 2007).

O óleo de babaçu, no Brasil, tem sido usado principalmente na fabricação de produtos de higiene e limpeza. O seu emprego na indústria de alimentos, principalmente a margarina, aparece como secundário. Há, no entanto, um interesse em desenvolver mercados e novas alternativas para uso do óleo de babaçu (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006).

### 3.4.2. Glicerol

O glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos, tendo como nomenclatura oficial (IUPAC) 1,2,3-propanotriol (Figura 3.8). É um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica. O nome glicerol deriva da palavra grega glykys, doce (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).



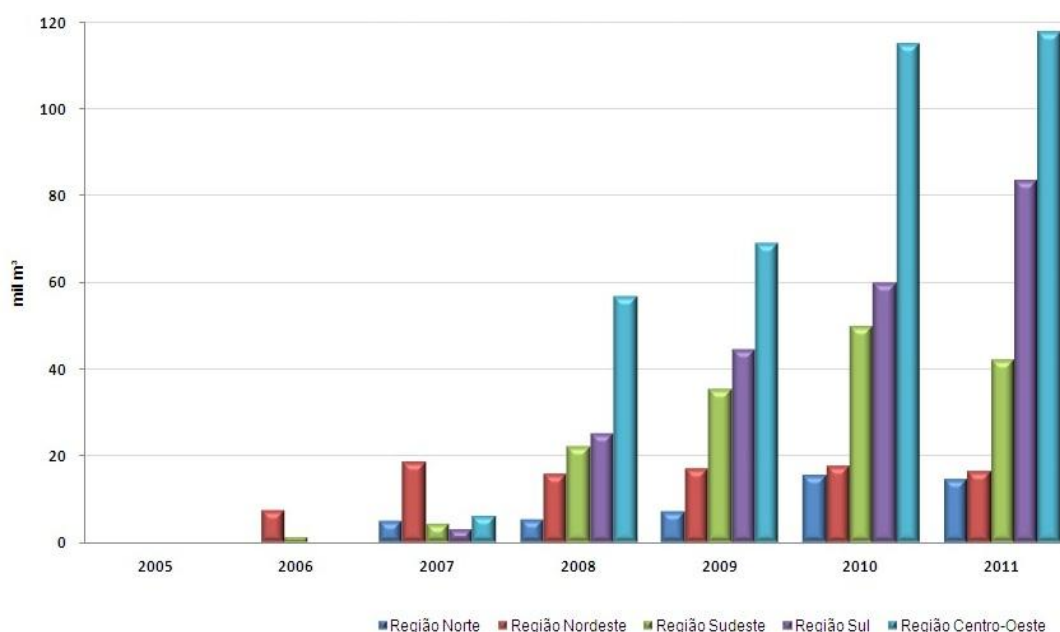
**Figura 3.8** – Estrutura de uma molécula de glicerol.

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio (forças intermoleculares). De acordo com a literatura, e a partir de métodos empregando a densidade funcional, existem 126 isômeros conformacionais para o glicerol (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011).

O aumento da produção de biodiesel influenciou notavelmente o mercado de glicerol devido à geração de excesso do glicerol bruto, subproduto da produção de biodiesel, que é produzido em cerca de 10 % (m/m) durante o processo. O mercado

mundial de biodiesel é estimado em 37 bilhões de galões até 2016, com um crescimento médio anual de 42%, o que significa que cerca de 4 bilhões de litros de glicerol bruto será produzido (FAN; BURTON; ZHOU, 2010). A geração do glicerol na produção de biodiesel nas grandes regiões do Brasil no período entre 2005 a 2011 está ilustrada na Figura 3.9.

A abundância e o preço atrativo do glicerol tornam este subproduto uma fonte química atraente para derivar compostos comerciais de valor agregado. Muitos pesquisadores mostraram forte interesse nesta área e relataram a potencialidade da utilização do glicerol como matéria-prima para obtenção de ácido cítrico, ácido láctico, hidrogênio, etanol, entre outros (FAN; BURTON; ZHOU, 2010).



**Figura 3.9** – Glicerina gerada na produção de biodiesel (B100) período 2005–2011. Fonte: (ANP/SPP, 2013).

### 3.5. Oxidação de óleos e gorduras

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores ou odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para consumo. Além de provocar outras alterações que podem afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, podem também influenciar na integridade e segurança dos alimentos, pela formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

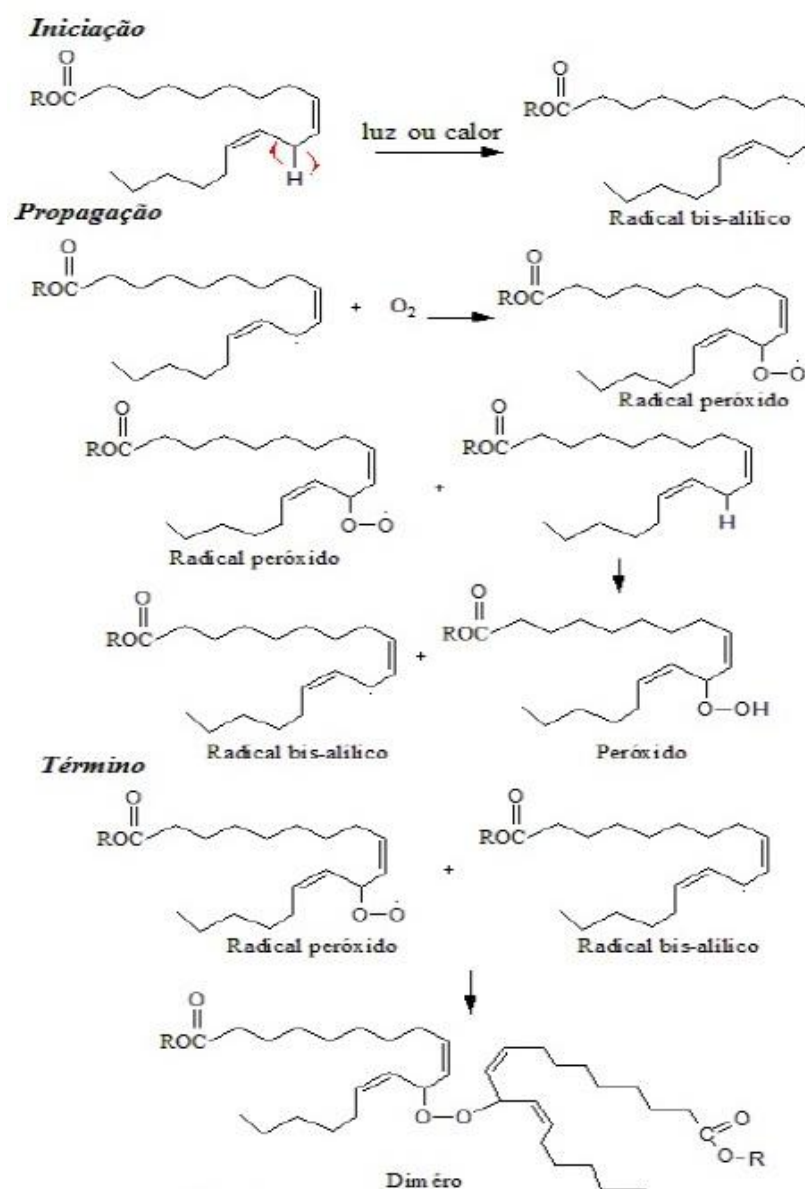
Os lipídeos podem ser oxidados por diferentes mecanismos:

- Reações hidrolíticas: catalisadas pelas lipase ou pela ação de calor e umidade, com a formação de ácidos graxos livres.
- Oxidação enzimática: ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poli-insaturados catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada, formando peróxidos e hidroperóxidos.
- Fotooxidação: esse mecanismo é promovido pela radiação de ultravioleta (UV) na presença de fotossensibilizadores (ex. clorofila) que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível que gera o oxigênio no estado “singlete”. Este reage com as ligações duplas formando hidroperóxidos e que por degradação posterior originam aldeídos, alcoóis e hidrocarbonetos.
- Autooxidação: é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras. A autooxidação dos lipídeos está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: *Iniciação, Propagação e Término* (Figura 3.10) que leva à formação de produtos estáveis de oxidação (produtos secundários do processo de oxidação). Para evitar esse processo, é necessário diminuir a incidência dos fatores que o favorecem como: diminuir os níveis de energia (temperatura e luz), evitar o contato com oxigênio e bloquear a formação de radicais livres por meio de antioxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006).

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica dos óleos, gorduras e alimentos gordurosos, são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes.

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados. Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deteriorização das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para o consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor e no sabor, compatibilidade com o produto e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento, e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Dentre os antioxidantes mais utilizados nas indústrias de alimentos podem ser citados os sintéticos: BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (propil galato) e TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona) e naturais: tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (RAMALHO; JORGE, 2006).



**Figura 3.10** - Esquema da auto-oxidação do linoleato de alquila, R representa um grupo alquil.

Fonte: (RODRIGUES FILHO, 2009).

### 3.6. Antioxidantes

De maneira geral, os antioxidantes podem ser definidos como uma família heterogênea de moléculas naturais, que presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (DE OLIVEIRA et al., 2009).

Os principais antioxidantes vegetais são as vitaminas C e E, carotenóides e compostos fenólicos, especialmente flavonóides. Óleos essenciais são compostos

aromáticos responsáveis pela fragrância de muitas plantas, e atualmente vêm despertando grande interesse nas pesquisas, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos causados por agentes oxidantes e microrganismos, que causam prejuízos nas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos (SOUZA et al., 2011). No entanto, na indústria de alimentos, alguns antioxidantes sintéticos ainda são muito utilizados, tais como compostos fenólicos, butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tercbutil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG).

Estudos relacionados com a toxicologia desses compostos demonstram efeito carcinogênico em experimentos realizados com animais. Desta forma, o uso destas substâncias como antioxidante é cada vez mais restrito em vários países, comprovando a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que visam buscar novos produtos naturais destinados a esta finalidade, que permitiram a substituição ou associação dos compostos sintéticos que reduz assim a quantidade de antioxidantes sintéticos em alimentos (ANDRADE et al., 2012).

Ebrahimabadi et al., (2010) demonstraram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Stachys inflata* e de seus constituintes majoritários como linalol e  $\alpha$ -terpineol. Extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*, Labiatae) também tem recebido considerável atenção na indústria de alimentos, visto que demonstrou poder antioxidante semelhante ao encontrado pelo BHT e superior aos do antioxidante sintético BHA. Comercialmente, tem sido usado em combinação com tocoferóis, observando-se associação entre o alecrim e o  $\alpha$ -tocoferol (DE OLIVEIRA et al., 2009).

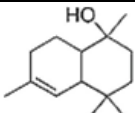
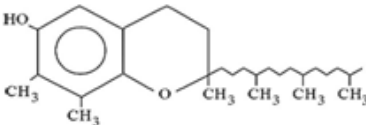
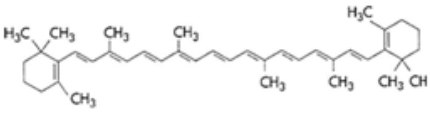
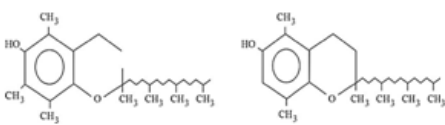
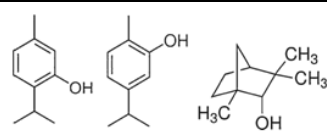
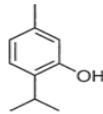
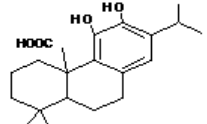
Os óleos essenciais têm demonstrado eficiência no retardamento do processo de oxidação de lipídios. Por essa razão, os óleos essenciais estão ganhando mais atenção, pelo seu *status* relativamente seguro e ampla aceitação por parte dos consumidores. Os óleos essenciais são uma rica fonte de polifenóis reconhecidos como antioxidantes mais fortes do que tocoferóis. Estes últimos estão presentes na maioria dos óleos vegetais, mas são instáveis durante o processo de aquecimento (QUIRONGA et al., 2013).

Em geral, a maioria dos estudos relata redução na estabilidade oxidativa de óleos e gorduras modificados em comparação com a fonte de óleo inicial. Muitos fatores desempenham um papel vital na estabilidade oxidativa de gorduras e óleos modificados, entre os quais podem ser citados: os métodos de produção (rota química ou enzimática), os métodos de purificação, as fontes de óleos ou a presença de antioxidantes durante a produção. Do mesmo modo, a estrutura molecular do triglicerídeo, tais como a composição

de ácido graxo, distribuição posicional de ácidos graxos no glicerol, bem como a interação de ambos os fatores, são parâmetros igualmente importantes que influenciam a estabilidade das gorduras e óleos estruturados (ADHIKARI et al., 2012).

A Tabela 3.7 ilustra o potencial antioxidante de diferentes óleos essenciais e uma variedade de compostos vegetais que apresentam características antioxidantes em função da sua composição química.

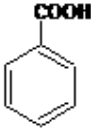
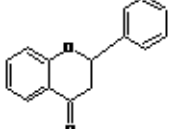
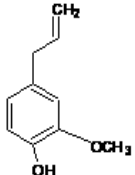
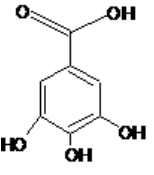

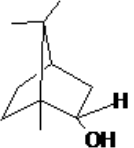
**Tabela 3.7** – Composição dos agentes antioxidantes (compostos principais).

<b>Antioxidante</b>	<b>Composição</b>	<b>Estrutura do componente principal</b>
Óleo de copaíba	Sesquiterpenos (cadinol e $\beta$ -cariofileno) Diterpenos [ácido copálico (C20: 2)]	 Cadinol
Manteiga de cacau	Mirístico, esteárico, ácido oleico e esteróis ( $\beta$ -sitosterol) a, b, c-tocoferol	 $\gamma$ -tocoferol
Manteiga de tucumã	Ácido láurico e oléico $\beta$ -caroteno	 $\beta$ -caroteno
Óleo de buriti	Ácido mirístico e oléico $\alpha$ e $\beta$ -tocoferol	 $\alpha$ - tocoferol $\beta$ - tocoferol
Orégano	Ácidos fenólicos Terpenóides (carvacrol, timol e álcool $\beta$ -fenchilo)	 Timol Carvacrol Álcool $\beta$ -fenchilo
Tomilho branco	Terpenos ( $\gamma$ -terpineno, p-cimeno e timol)	 Timol
Alecrim	Flavonóides, ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos (ácido carnósico e carnosol)	 Ácido carnósico

(continua)



**Tabela 3.7** – Composição dos agentes antioxidantes (compostos principais).

<b>Antioxidante</b>	<b>Composição</b>	<b>Estrutura do componente principal</b>
Sálvia sclarea	Ácidos fenólicos (ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas) e Flavonóides (flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas e antocianidinas)	  Ácido benzóico      Flavanonas
Cravo talo	Eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, taninos e esteróis	  Eugenol      Tanino
Cananga	$\beta$ -cariofileno, acetato de benzila, álcool benzílico, farnesol, $\alpha$ -terpineol, borneol, acetato de geranilo, salicilato de metila, benzaldeído, safrol, linalol, eugenol, isoeugenol, limoneno e outros componentes menores	 Farnesol  Borneol

### 3.7. Controle da oxidação lipídica no curso de reações enzimáticas

Nos processos envolvendo reações enzimáticas para modificação dos óleos e gorduras, deve-se levar em consideração o processo oxidativo que essas matérias-primas lipídicas estão sujeitas, em função dos lipídios serem constituídos por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. A maior parte destes compostos é oxidável em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006). Os peróxidos são compostos considerados substâncias nocivas, podendo ser cancerígenas, causar arteriosclerose e acelerar o envelhecimento e quando presente no meio reacional interferem de maneira negativa na atuação da enzima (OHTA, YAMANE, SHIMIZU, 1989).

Para controlar a oxidação da matéria-prima, geralmente as reações são conduzidas sob atmosfera inerte com inserção de uma linha contínua de gás (nitrogênio ou argônio) durante todo o período de síntese. Alternativamente, a substituição do gás inerte, por

agentes antioxidantes, tem sido proposta para tornar o processo enzimático competitivo industrialmente.

Na literatura, entretanto, relatos da utilização de antioxidantes para inibir a oxidação de matéria-prima, bem como estudos para determinar os possíveis efeitos dos antioxidantes sobre a atividade da enzima, são escassos.

Especificamente com relação a glicerólise enzimática, destaque pode ser dado aos resultados reportados por Ohta, Yamane, Shimizu (1989), relacionando o índice de peróxido da matéria-prima com a atividade lipolítica da lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Esses autores concluíram que valores superiores 5 meq/kg afetavam de maneira marcante a atuação da lipase em reações de glicerólise e recomendam o uso de estratégias para evitar a oxidação da matéria-prima.

XU et al., 2005 adotando como modelo de estudo a reação de acidólise do óleo de peixe e ácido caprílico catalisada pela enzima Lipozyme, estudaram a ação de nove diferentes antioxidantes e concluíram que todos os antioxidantes foram capazes de reduzir os radicais livres e formação de peróxido, tornando o meio reacional favorável a atuação da enzima.

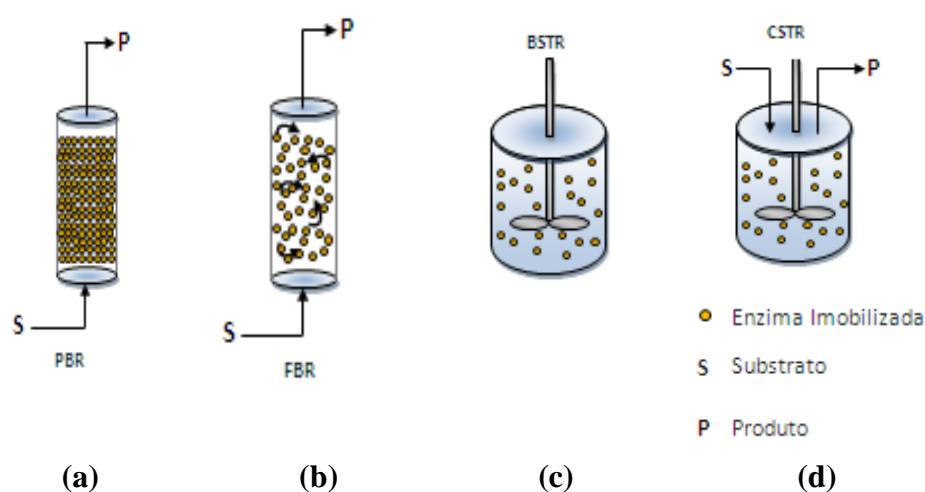
Por outro lado, alguns antioxidantes podem atuar como inibidores da ação enzimática bloqueando o acesso de substratos ao centro ativo da enzima, como observado para o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e tocoferol usados como antioxidantes durante o curso da reação de glicerólise enzimática do óleo de babaçu, conforme constatado por Freitas et al 2013. Segundo esses autores, a ação antioxidante desses compostos foi insatisfatória, sendo observada baixa concentração em MAGs, bem como reversibilidade da reação de forma bem acentuada. Adicionalmente, foi verificada alteração do perfil de formação dos glicerídeos, com formação preferencial de diglicerídeos em detrimento dos monoglicerídeos. Este fato foi associado à inibição exercida por esses dois compostos (BHT e tocoferol) sob a atuação da lipase empregada no sistema operacional.

Desta forma, verifica-se que não existe consideração teórica suficiente para prever o efeito positivo ou negativo de antioxidantes na atividade da enzima e a resposta direta ou desempenho geral tem de ser testado na prática, sendo este um dos objetivos do presente projeto.

### 3.8. Reatores enzimáticos

O biorreator é considerado como o “coração” do processo biotecnológico, visto que é o equipamento em que os substratos são convertidos nos produtos desejados pela atuação de microrganismos, células ou enzimas. Vários tipos de biorreatores são atualmente utilizados em laboratório ou em escala industrial.

As configurações de reatores enzimáticos mais comumente utilizados são: reatores de leito fixo, reatores de leito fluidizado e reatores de tanque agitados operando em regime descontínuo ou contínuo (Figura 3.11).



**Figura 3.11** - Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (a) leito fixo (PBR - *Packed bed reactor*), (b) leito fluidizado (FBR - *Fluidized bed reactor*), (c) batelada tanque agitado (BSTR - *Batch stirred tank reactor*) e (d) contínuo tanque agitado (CSTR - *Continuous stirred-tank reactor*).

Fonte: (FERNANDES, 2010).

O reator com agitação operando em regime descontínuo (BSTR- *Batch stirred tank reactor*) é composto por um tanque com agitação, sem qualquer reciclo ou dispositivo acoplado, restringindo a operação em forma descontínua, ou seja, enquanto se realiza a reação, não há fluxo de entrada ou saída do reator (FOGLER, 2005; FERNANDES, 2010).

Nesses reatores, a agitação é realizada por meios mecânicos (por exemplo, magnético e impulsores submersos), evitando a existência de gradientes de temperatura e concentração. A enzima imobilizada é separada no final do meio de reação por filtração ou centrifugação. A utilização desse tipo de reator é notada em pequenas escalas, para teste de novos processos, para fabricação de produtos de alto valor agregado e para processos de

difícil redimensionamento em operações contínuas. É vantajoso por ter conversões elevadas, que podem ser obtidas devido aos longos intervalos de tempo. Estes reatores são fáceis de operar e normalmente requerem um conjunto muito limitado de equipamentos auxiliares. No entanto, apresentam desvantagens, como: elevado custo de trabalho por processo, variabilidade de produtos a cada batelada e dificuldade de produção em grande escala, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e são susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (FOGLER, 2005; ZANIN; MORAES, 2004; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996).

Desta forma, os biorreatores de leito fixo tornaram-se os mais utilizados para condução de processos enzimáticos, devido ao baixo custo de manutenção, facilidade de operação, escalonamento, controle automático, baixa força de cisalhamento, e, conseqüentemente, o impedimento da quebra de partículas dos biocatalisadores. São os mais frequentemente utilizados para lipases imobilizadas além de serem empregados continuamente em escala comercial, de modo a minimizar o trabalho e custos indiretos (HALIM; KAMARUDDIN; FERNANDO, 2009).

Em reatores de leito fixo, geralmente utiliza-se uma proporção mais elevada de enzima-substrato que resulta em uma maior taxa de reação, sendo necessário um tempo mínimo de contato entre enzima e substrato para atingir uma conversão satisfatória (YANG et al., 2005).

Esta configuração de biorreator consiste em uma coluna cilíndrica que suporta um leito empacotado do biocatalisador no qual os substratos entram ascendente/descendente e os produtos são recolhidos na outra extremidade do reator de forma contínua. Atenção especial deve ser dada às partículas sólidas deste biocatalisador que precisam ter dimensões adequadas, a fim de controlar a queda de pressão através da passagem do fluxo de alimentação. Uma desvantagem no reator de leito fixo é a dificuldade de controle de temperatura em seu interior, devido à menor difusão e o “grau” de empacotamento do biocatalisador (FOGLER, 2005).

Os biorreatores de leito fixo são usados para tratamento de águas residuais, biocombustíveis e produtos farmacêuticos (BALTARU; GALACTION; CASCAVAL, 2009).

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais**

#### **4.1.1. Biocatalisador**

Todos os experimentos foram realizados empregando uma preparação comercial de lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* manufaturada pela Amano Farmacêutica (Nagoya, Japão), adquirida na forma de extrato enzimático em pó da Sigma-Aldrich e posteriormente imobilizada em matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (SiO<sub>2</sub>-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). A matriz apresenta as seguintes propriedades: diâmetro médio de poros de 22,91 Å, área de superfície (BET) de 461,00 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> e volume de poros de 0.275 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> (SANTOS et al., 2008).

#### **4.1.2. Materiais de partida**

Como materiais de partida foram utilizados: glicerol (Merck), óleo de babaçu (Mundo dos Óleos) com uma composição aproximada em ácidos graxos de 0,22% de Ácido Caprónico, 3,18% de Caprílico, 3,21% de Cáprico, 45,35% de Láurico, 15,14% de Mirístico, 0,04% de Pentadecanóico, 8,37% de Palmítico, 0,05% de Palmitoléico, 0,05% de Margárico, 2,39% de Esteárico, 16,35% de Oléico, 4,94% de Linoléico, 0,26% de Linolênico, 0,15% de Araquídico, 0,12% de Eicosenóico, 0,11% de Behênico, 0,09% de Lignocérico.

#### **4.1.3. Antioxidantes**

Como agentes antioxidantes naturais foram utilizados: Manteiga de Cacau (Nestlé), Óleo de Buriti (Inovan), Óleo de Copaíba (Inovan), Manteiga de Tucumã (Inovan), Óleos essenciais de Orégano, Tomilho Branco, Alecrim, Sálvia Sclarea, Cravo Talo e Cananga (Ferquima).

#### **4.1.4. Outros reagentes**

Outros reagentes utilizados foram: solventes (acetona - Synth, etanol – Nuclear, hexano – Quimex, ácido acético glacial - Synth), álcool polivinílico (Across), HCl (Isolar), epícloridrina (Sigma), polietilenoglicol (Synth - MM 1500), Tetraetilortossilicato (Sigma –

Aldrich). Os padrões utilizados (mono, di e triglicerídeos) foram adquiridos da empresa AccuStandard, com exceção da trioleína, adquirida da CHEM SERVICE.

## 4.2. Metodologia experimental

### 4.2.1. Imobilização da lipase no suporte

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO<sub>2</sub>-PVA) foi sintetizado e ativado com epícloridrina, conforme metodologia descrita por Da Rós et al. (2010). A imobilização da lipase consistiu do contato da enzima com o suporte (250 mg/g suporte) juntamente com solução aquosa de 5mg/ mL de polietilenoglicol (MM 1500), por um período de 24 h a 4°C. A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo e o sistema imobilizado lavado com hexano. A atividade hidrolítica do derivado imobilizado foi da ordem 1800 ± 120 U/g suporte. A massa específica do sistema imobilizado determinada segundo metodologia adotada por Freitas et al. (2010) foi de 1,865 g.mL<sup>-1</sup>.

A Tabela 4.1 apresenta as propriedades catalíticas da lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA estabelecidas por Da Rós et al (2010).

**Tabela 4.1** - Propriedades catalíticas da lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA.

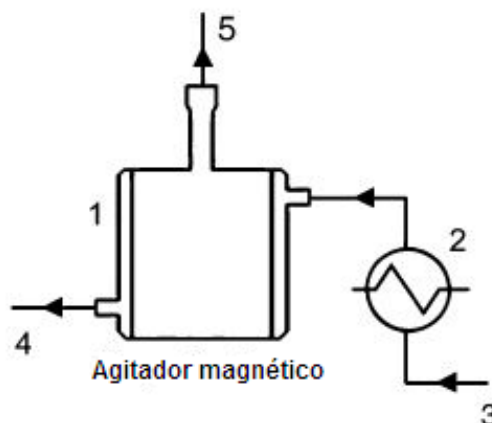
Parâmetro	Valor
Temperatura ótima, °C	40-60
pH ótimo	8,5
Tempo de meia vida (t <sub>1/2</sub> ) à 60°C, (h)	6,24
Constante de desativação térmica (Kd), (h <sup>-1</sup> )	0,11
Parâmetros cinéticos Km (mM)	1883
Vmax (U/g)	3873

Fonte: Da Rós et al. (2010).

### 4.2.2. Síntese de monoglicerídeos por glicerólise descontínua do óleo de babaçu

As reações de glicerólise em regime descontínuo foram realizadas em reatores de vidro cilíndricos (100 mL) contendo óleo de babaçu e glicerol, numa razão molar fixa de 15:1 (glicerol/óleo de babaçu), como anteriormente estabelecido por Freitas et al, 2009. Nas misturas foram adicionadas 5% (m/m) de antioxidante e incubadas com lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA na proporção de 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional. As reações foram conduzidas por um período máximo de 12 h, com agitação magnética (150 rpm) na temperatura de 50 °C. A atmosfera

inerte, quando utilizada, foi garantida pela inserção de um ponto de  $N_2$  em uma das entradas do reator, impedindo a exposição do meio reacional ao ar (presença de  $O_2$ ) (Figura 4.1). O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação, para quantificação dos produtos formados por cromatografia de fase gasosa.



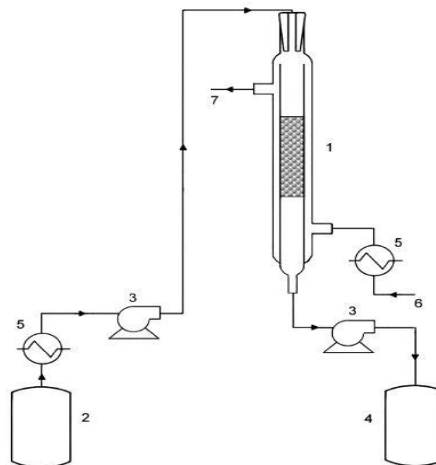
**Figura 4.1** - Esquema experimental das reações descontínuas: 1 - reator de vidro; 2 - banho para controle de temperatura; 3 - entrada de água; 4 - saída de água; 5 - saída do produto.

#### 4.2.3. Glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo

A Figura 4.2 apresenta o esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios, composto de uma coluna de vidro encamisada com capacidade nominal de 10 mL (diâmetro interno= 15 mm, comprimento = 55 mm) e conexões. O substrato constituído de misturas de óleo de babaçu e glicerol nas seguintes razões molares: 1:3, 1:6, 1:9, 1:12 e 1:15 foi mantido em um frasco de alimentação, e alimentado por meio de uma bomba peristáltica (SJ-1211-Atto), com fluxo descendente na vazão fixa de 0,017 mL/min. A temperatura do sistema foi mantida constante (50 °C) e controlada por um banho termostático.

Foram efetuados 7 experimentos. Para os experimentos de 1 a 5 o reator foi operado sob a atmosfera inerte garantida pela inserção de um ponto de  $N_2$  em uma das entradas do reator, impedindo a exposição do meio reacional ao ar (presença de  $O_2$ ). Nos experimentos 6 e 7 o meio reacional foi suplementado com 5% (m/m) do agente antioxidante previamente selecionado nos testes descontínuos (seção 4.2.2). Em cada experimento a coluna foi empacotada com 7,0 g do derivado imobilizado e em seguida

estabilizada pela recirculação do substrato através da coluna por um período equivalente a 3 tempos espaciais. Esta metodologia também permitiu a eliminação de bolhas de ar formadas durante a etapa do empacotamento da coluna. As amostras foram recolhidas e estocadas a -2 °C, até a realização das análises cromatográficas, conforme descrito no item 4.3.3. Os resultados foram expressos em porcentagens mássicas dos produtos obtidos: monos, dis e triglicerídeos.



**Figura 4.2** – Esquema experimental das reações contínuas realizadas em reator de leito fixo: 1 - coluna; 2 - reservatório de alimentação; 3 - bombas peristálticas; 4 - saída do produto; 5 - banho para controle de temperatura; 6 - entrada de água; 7 - saída de água.

Em todos os experimentos o tempo espacial foi fixado em 6h e calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 4.1 a 4.3:

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (4.1)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisado } r} \quad (4.2)$$

$$V_{\text{catalisado } r} = \frac{w}{\rho} \quad (4.3)$$

em que:  $\tau$  = é o tempo espacial (min),  $V$  = volume útil do reator (mL),  $v_0$  = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL/min),  $V_{\text{reator}}$  = volume total do reator,  $V_{\text{catalisador}}$  = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator,  $w$  = peso do catalisador seco (g),  $\rho$  = densidade cristalina do biocatalisador seco (g/mL).



#### **4.2.4. Separação dos produtos formados nas reações de glicerólise**

As reações foram finalizadas adicionando-se à cada grama de amostra do meio reacional, uma mistura de 9 mL de clorofórmio e 2,5 mL de ácido acético glacial, com homogeneização por 10 min sob agitação constante. Em seguida, o conteúdo foi transferido para uma proveta de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. Posteriormente, o conteúdo da proveta foi transferido para um funil de decantação e mantido em repouso para a separação das fases (AOCS, 2004). A fase aquosa (contendo também glicerol) foi descartada e a fase orgânica foi concentrada em rota evaporador (Fisaton 801) a 70 °C por 20 min.

### **4.3. Métodos de análises**

#### **4.3.1. Atividade hidrolítica**

A atividade hidrolítica da enzima imobilizada foi determinada pela reação de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). As condições de incubação da hidrólise foram: pH 7,0 (tampão fosfato) e temperatura de 37°C. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de produto por minuto de reação (U), nas condições do ensaio. As atividades foram expressas em (μmoles/g.min), sendo que grama refere-se à massa de biocatalisador.

#### **4.3.2. Teor de umidade**

Os teores de água nos suportes puro e ativado, bem como nos sistemas imobilizados foram medidos diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Marte ID 50).

#### **4.3.3. Dosagem de glicerídeos por cromatografia gasosa**

As concentrações de monos, dis e triglicerídeos foram determinadas por cromatografia de fase gasosa, utilizando-se uma coluna capilar (CPSil 5CB: 10 m X 0,25 mm X 0,12 μm, Varian), temperaturas do detector e injetor de 300 °C, fluxo da coluna de 2 mL/min (o gás de arraste utilizado foi o nitrogênio), pressão da coluna de 10 psi, split de 1:20, atenuação = 1, temperatura de 80 °C no momento da injeção, variando-se a rampa de aquecimento para cada método de análise. As amostras foram diluídas em hexano/acetato

de etila (1:1) em seguida 1  $\mu$ L de cada amostra foi injetada no cromatógrafo. Os métodos foram construídos e ativados de acordo com o programa Galaxie Chromatography Data System. As condições estabelecidas para quantificação dos mono, di e triglicerídeos são apresentadas nas Tabelas 4.2 a 4.4 (FREITAS, 2006).

**Tabela 4.2** – Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos MAGs.

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 320°C numa taxa de 20°C/ min, mantendo-se constante por 2 min, totalizando 15 min de análise.	Ionizador	Vaporizador
		300°C	300° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	Tetradecano	3,13	20,77
2	Monocaprina	5,73	12,45
3	Monolaurina	6,75	12,03
4	Monomiristina	7,66	12,70
5	Monopalmitina	8,54	12,42
6	Monooleína	9,22	6,13

**Tabela 4.3**-Condições de operação estabelecidas do método de dosagem dos DGAs.

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
Temperaturas	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 3 min até 320°C numa taxa de 15°C/min, mantendo-se constante por 6 min, totalizando 25 min de análise.	Ionizador	Vaporizador
		300°C	300° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	Tetradecano	5,10	20,77
2	Dicaprina	13,90	11,78
3	Dilaurina	15,71	13,42
4	Dimiristina	17,32	11,78
5	Dipalmitina	18,76	13,09
6	Dioleína	20,19	8,51

**Tabela 4.4-**Condições de operação estabelecidas no método de dosagem dos TGAs.

Padrão Interno (PI): Tetradecano			
<b>Temperaturas</b>	Coluna CP Sil 5CB (Varian) Rampa de aquecimento 80°C por 1 min até 320°C numa taxa de 25°C/min, mantendo-se constante por 30 min, totalizando 45 min de análise.	Ionizador 300°C	Vaporizador 300° C
Gás de arraste: Hidrogênio, Split na razão de 1:20 e Atenuação = 1			
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)
1	Tetradecano	2,87	22,33
2	Tricaprina	10,09	16,67
3	Trilaurina	11,58	15,20
4	Trimiristina	14,97	13,46
5	Tripalmitina	23,67	14,62

#### 4.3.4. Análise espectroscópica dos produtos oxidados (primários e secundários)

A presença de produtos de oxidação primária (POP - hidroperóxidos conjugados) e produtos de oxidação secundária (POS - aldeídos e cetonas) foi avaliada por espectrofotometria no UV (ultravioleta) a  $\lambda = 232$  nm e  $\lambda = 268, 270$  e  $272$  nm, respectivamente.

A amostra foi diluída em isooctano e transferida (3 mL) para uma cubeta de quartzo, sendo realizada a leitura da absorbância nos comprimentos de onda definidos. Os valores medidos ficaram entre 0,1 a 1,0. Para as amostras que apresentaram leituras fora da faixa estabelecida, foi necessária a repetição da análise empregando soluções mais concentradas ou mais diluídas. Para a análise dos POS, selecionou-se o maior valor de absorbância obtido entre os três comprimentos de onda (268, 270 e 272nm). Os valores de absorbância foram expressos em termos de Absorção específica (absorção de 1g de amostra em 100 mL de solvente para um percurso óptico de 1cm), denominado de  $E$  (Coeficiente de Absorção) e foram obtidos de acordo com a Equação 4.4, descrita por Rodrigues (2011).

$$E = \frac{A}{C \times L} \quad (4.4)$$

Em que:

$E$ = Coeficiente de absorção;

$A$ = Absorbância no respectivo comprimento de onda;

$C$ = Concentração da amostra expressa em g/100 mL de isooctano;

$L$ = Caminho óptico em cm.

## 4.4. Cálculos

### 4.4.1. Cálculo de produtividade de monoglicerídeos

Os valores de produtividade obtidos nas glicerólises do óleo de babaçu foram determinados empregando-se a Equação 4.5.

$$P = \frac{C}{\tau} \quad (4.5)$$

em que:  $P$  = é a produtividade ( $\text{mg}_{\text{MAGs}}/\text{g}_{\text{amostra}} \cdot \text{h}$ ),  $C$  = é a concentração em mg de MAGs por grama de amostra,  $\tau$  = é o tempo espacial da reação.

### 4.4.2. Cálculo da seletividade para a formação de monoglicerídeos

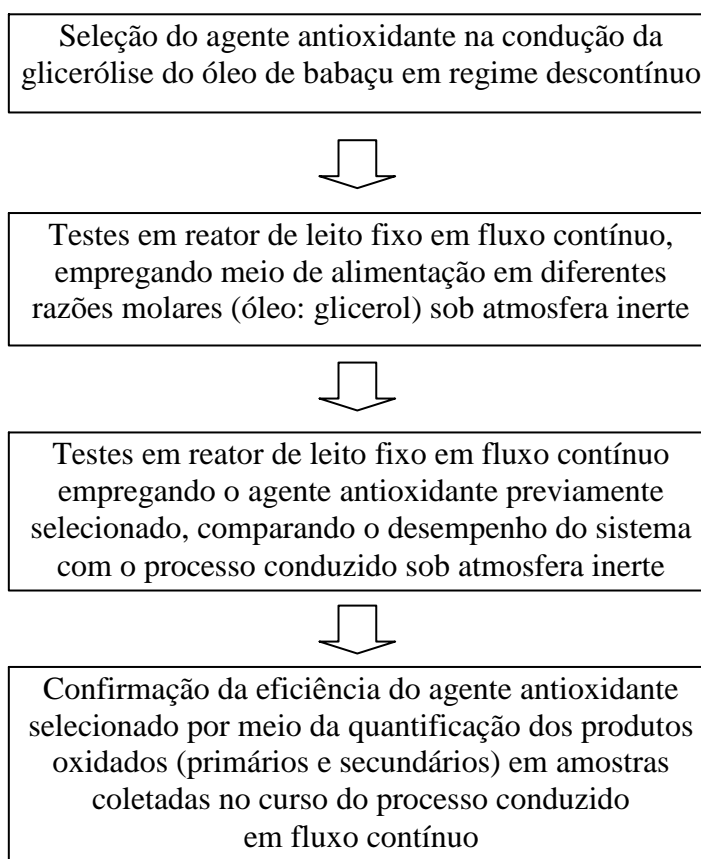
Os valores de seletividade obtidos nas glicerólises do óleo de babaçu foram determinados empregando-se a Equação 4.6.

$$\% \text{ Seletividade } = \frac{\% \text{ MAG}}{\% \text{ MAG} + \% \text{ DAG} + \% \text{ TAG}} \quad (4.6)$$

em que: % MAG = é a quantidade de monoglicerídeos formada na reação, %DAG = é a quantidade de diglicerídeos formada na reação e %TAG é a quantidade de triglicerídeos restantes na reação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do trabalho experimental foi iniciado com os testes de seleção do agente antioxidante para conduzir a reação de glicerólise do óleo de babaçu em reatores operando em regime descontínuo. Em seguida, testes em reatores de leito fixo em fluxo contínuo, sob atmosfera inerte, foram realizados visando estabelecer a razão molar adequada entre o óleo de babaçu e glicerol para maximizar a formação de MAG. Testes em fluxo contínuo foram efetuados em reator de leito fixo empregando o agente antioxidante selecionado e os resultados comparados com os dados obtidos em atmosfera inerte. A eficácia do agente antioxidante no processo de síntese de MAGs foi confirmada por análises espectroscópicas dos produtos oxidados (primários e secundários). As principais etapas desenvolvidas neste trabalho podem ser visualizadas na Figura 5.1.



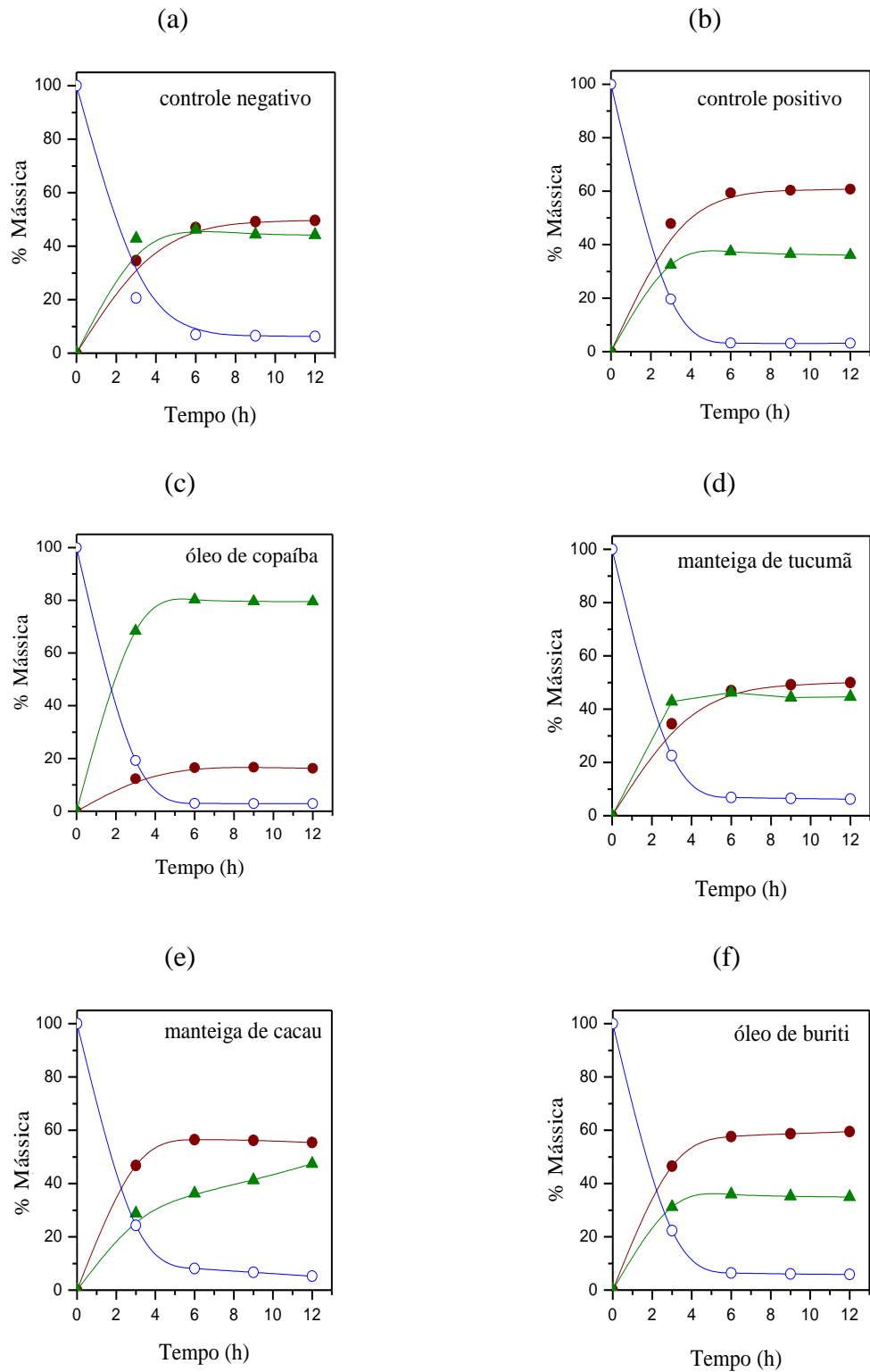
**Figura 5.1** – Principais etapas desenvolvidas neste trabalho.

### 5.1. Seleção do agente antioxidante na condução da glicerólise do óleo de babaçu

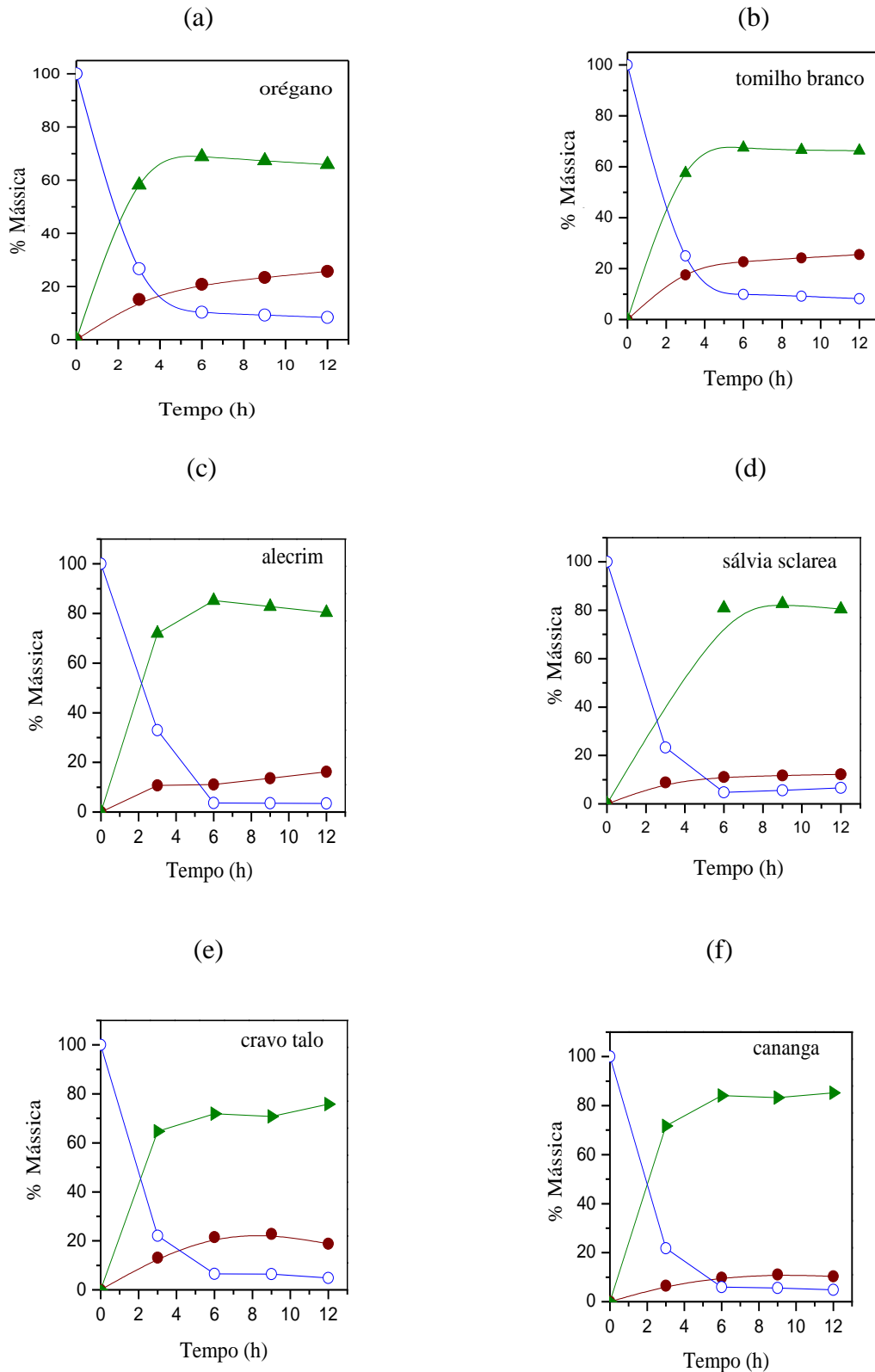
Diferentes reações de glicerólise foram realizadas, tais como: i) isenta de qualquer artifício para impedir a oxidação da matéria-prima (Controle negativo); ii) empregando atmosfera inerte (Controle positivo) e iii) utilizando diferentes agentes antioxidantes, visando estudar a influência destas estratégias na síntese de monoglicérides a partir do óleo de babaçu. O progresso dessas sínteses está ilustrado nas Figuras 5.2 (a-f) e 5.3 (a-f).

A Figura 5.2(a) ilustra o perfil de formação de mono, diglicéride e o consumo de triglicéride no controle negativo, na qual verifica-se a formação de cerca de 44% de MAGs em 12h de reação. O perfil da reação conduzida em atmosfera inerte, mostrado na Figura 5.2(b) (Controle positivo), indica que esta estratégia foi altamente eficiente elevando a formação de MAGs para cerca de 57% no mesmo tempo reacional. Esses dados comprovam resultados descritos na literatura (AGUEDO et al., 2009; AGUEDO et al., 2008; BALCÃO; MALCATA, 1997), sendo esta estratégia a mais utilizada para evitar a oxidação de óleos e gorduras, garantindo desta maneira, que a síntese enzimática ocorra sem interferência ou inibição por alterações das condições reacionais. Porém, a inserção de linha de gás inerte (nitrogênio) durante o progresso da reação representa um custo adicional ao processo. Uma alternativa, ainda pouco explorada, é baseada na adição de agentes antioxidantes naturais ao meio reacional.

De acordo com a Figura 5.2(c) o emprego do óleo de copaíba como fonte de agente antioxidante, interferiu no mecanismo de ação da enzima porque desviou a rota para maior formação de DAG em detrimento da formação de MAG (valor máximo alcançado de 16% de MAG ao final da reação). A baixa concentração de MAG pode ser justificada pela presença de compostos resinólicos que perfazem cerca de 55-60% do óleo de copaíba (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009), favorecendo a formação de diglicérides. Adicionalmente a incorporação desse óleo ao substrato pode ter influenciado na velocidade reacional em função da modificação da viscosidade do meio, interferindo na transferência de massa entre as fases líquida (substrato) e sólida (enzima).



**Figura 5.2** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) nas reações de glicerólise de óleo de babaçu, sob diferentes condições: (a) controle negativo, (b) atmosfera inerte (controle positivo), na presença de antioxidantes (c) óleo de copaíba, (d) manteiga de tucumã, (e) manteiga de cacau, (f) óleo de buriti.



**Figura 5.3** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) nas reações de glicerólise de óleo de babaçu empregando diferentes antioxidantes: (a) orégano, (b) tomilho branco, (c) alecrim, (d) sálvia sclarea, (e) cravo talo, (f) cananga.



A utilização da manteiga de tucumã foi efetiva como agente antioxidante (Figura 5.2d) e favoreceu a formação de cerca de 50% de MAGs em 6h de reação. Este resultado foi similar ao encontrado no controle negativo (Figura 5.2a) que forneceu cerca de 44% de MAG no mesmo tempo reacional. Este pequeno acréscimo na formação de monoglicerídeos pode estar relacionado com a diminuição da oxidação da matéria-prima lipídica durante a reação devido à presença das vitaminas A e E na composição da manteiga de tucumã.

A manteiga de cacau (Figura 5.2e) e o óleo de buriti (Figura 5.2f) foram os agentes antioxidantes mais eficientes, pois favoreceram a formação mais elevadas de monoglicerídeos (55-58% de MAGs em apenas 6h de reação). O resultado obtido utilizando manteiga de cacau pode ser atribuído à presença de elevados teores de flavonóides, tais como (-)-epicatequina, catequina e procianidina (RAMIRO-PUIG; CASTELL, 2009). Quanto ao óleo de buriti, os resultados podem ser creditados ao fato deste óleo apresentar em sua composição elevado teor de tocoferóis totais, que possuem como papel principal o sequestro de radicais livres (RIBEIRO, 2008).

As Figuras 5.3 (a-f) ilustram que a atuação das especiarias (orégano, tomilho branco, alecrim, sálvia sclarea, cravo talo e cananga) como agentes antioxidantes, foi insatisfatória, sendo verificada uma alteração da atuação da enzima, com formação preferencial de diglicerídeos (60-85%) e baixa concentração de MAG (10-25%).

A Tabela 5.1 sumariza a influência dos diferentes antioxidantes na seletividade da reação para formação de monoglicerídeos, considerando o tempo reacional de 6h. Em todos os ensaios foi constatado elevado consumo de triglicerídeos (90-97%) com formação de monoglicerídeos (10 - 59%), dependendo da estratégia testada. Verifica-se ainda que as formações mais elevadas de MAGs foram alcançadas empregando-se atmosfera inerte, óleo de buriti e manteiga de cacau, em ordem decrescente.

Dentre os testes realizados fica evidente que a utilização da atmosfera inerte foi a estratégia que apresentou o melhor desempenho para a formação de MAGs, provavelmente porque o N<sub>2</sub> inibiu a oxidação da matéria-prima lipídica sem interferir no mecanismo de ação da lipase favorecendo o alcance do valor mais elevado de seletividade para a formação desse glicerídeo (57%). Tanto o óleo de buriti como a manteiga de cacau forneceram desempenhos similares, entretanto o óleo de buriti apresentou limitações, visto que sua incorporação no meio reacional alterou o perfil de formação de monoglicerídeos em função de sua composição em ácidos graxos rica em ácido oleico.

**Tabela 5.1** –Seletividade de formação de monoglicerídeos a partir de reações de glicerólise de óleo de babaçu usando lipase *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA.

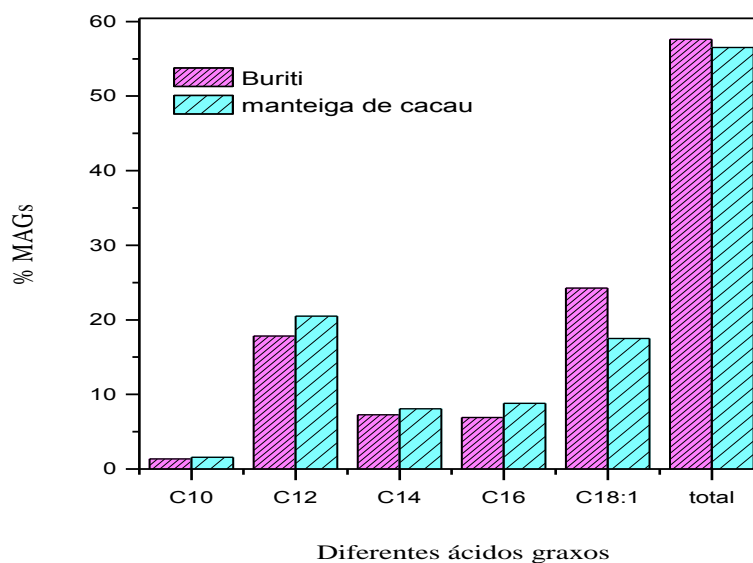
<b>Estratégia</b>	<b>MAG (%)</b>	<b>DAG (%)</b>	<b>TAG (%)</b>	<b>Seletividade<sup>a</sup> (%)</b>
<b>Controle negativo</b>	46,9	46,2	6,9	46,9
<b>Controle positivo</b>	60,0	36,8	3,2	60,0
<b>Óleo de buriti</b>	57,6	31,2	6,4	57,6
<b>Manteiga de cacau</b>	56,5	36,3	8,1	56,5
<b>Manteiga de tucumã</b>	46,2	46,2	6,9	46,2
<b>Cravo talo</b>	22,8	70,7	6,5	22,8
<b>Tomilho branco</b>	22,7	67,5	9,9	22,7
<b>Orégano</b>	20,8	68,8	10,3	20,8
<b>Óleo de copaiba</b>	16,5	80,2	3,0	16,5
<b>Alecrim</b>	11,1	85,3	3,6	11,1
<b>Sálvia sclarea</b>	11,1	85,0	3,9	11,1
<b>Cananga</b>	10,0	83,9	6,1	10,0

<sup>a</sup> Valores calculados em 6h de reação.

MAG – monoglicerídeos, DAG – diglicerídeos, TAG – triglicerídeos.

No Apêndice A são apresentadas as composições em ácidos graxos do óleo de buriti e manteiga de cacau. A elevada concentração de ácido oleico (62 - 67%) presente no óleo de buriti pode ter interferido no perfil de formação dos monoglicerídeos, como pode ser verificado na Figura 5.4. Considerando que o óleo de babaçu contém cerca de 45% de ácido láurico (componente mais expressivo neste óleo), esperava-se que houvesse uma maior formação de monolaurina. No entanto, a presença do óleo de buriti alterou o perfil de formação dos monoglicerídeos, uma vez que foi observada maior produção de monooleína, diferentemente ao verificado no teste realizado com a manteiga de cacau.

Cabe-se ressaltar que, para um composto ser considerado um antioxidante, deve comportar-se de forma inerte ao meio reacional. Desta forma, a manteiga de cacau foi selecionada como agente antioxidante mais efetivo para utilização nas reações de glicerólise do óleo de babaçu.

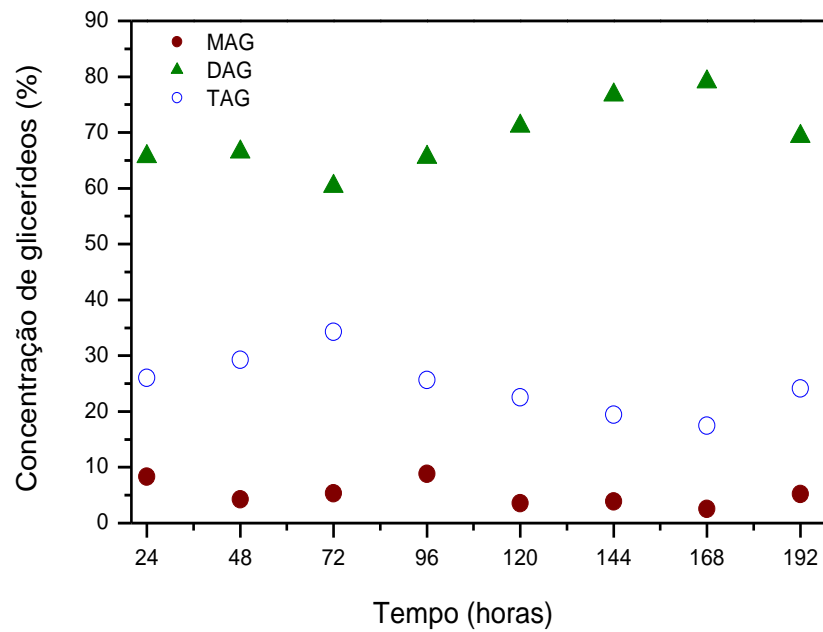


**Figura 5.4** - Perfil de formação dos diferentes monoglicerídeos a partir da glicerólise do óleo de babaçu catalisada pela lipase *B. cepacia* immobilizada empregando óleo de buriti e manteiga de cacau como agentes antioxidantes (6h de reação).

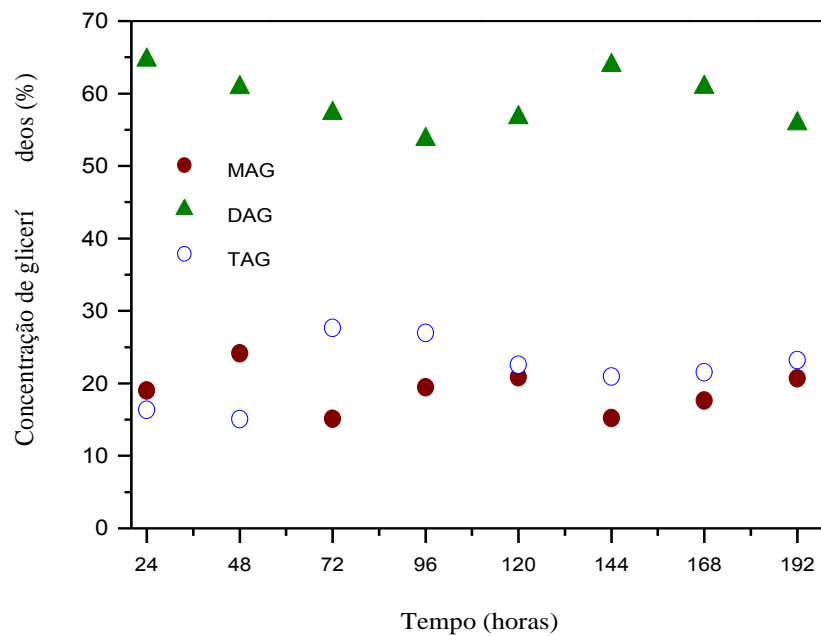
## 5.2. Influência da relação molar entre óleo e glicerol na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu em reator de leito fixo

Como a reação de glicerólise catalisada por lipase immobilizada consiste em um sistema de três fases (óleo, glicerol e enzima), a miscibilidade do meio reacional, essencial para uma eficaz catálise enzimática, é um dos obstáculos a ser superado no processo. Além disso, sabe-se que para deslocar o equilíbrio da glicerólise no sentido da formação de monoglicerídeos, deve-se aumentar a concentração de glicerol, ou seja, utilizar excesso desse álcool. Nesse contexto, visando estabelecer maior homogeneidade do meio reacional e alcançar elevados rendimentos de MAGs, foram realizados testes em reator de leito fixo em fluxo contínuo, variando-se a razão molar da mistura óleo: glicerol entre 1:3 a 1:15. Os resultados obtidos nesta série de experimentos são apresentados nas Figuras 5.5 a 5.9, ressaltando que todos os experimentos foram conduzidos, sob atmosfera inerte, por 8 dias.

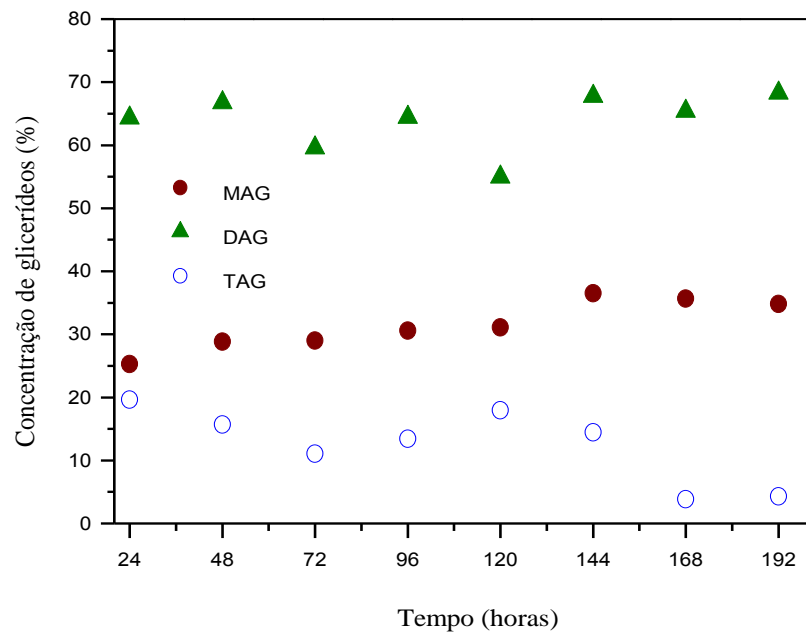
De acordo com os dados apresentados, constata-se que a síntese de MAGs foi fortemente influenciada pela razão molar dos materiais de partida. Observa-se que em todos os testes realizados, independentemente da proporção dos materiais de partida, houve produção de MAGs, apresentando formação média de  $5,2 \pm 0,8\%$ ,  $19,0 \pm 1,1\%$ ,  $31,5 \pm 1,4\%$ ,  $24,4 \pm 1,9\%$  e  $23,0 \pm 1,1$ , respectivamente, para os substratos contendo óleo e glicerol nas razões molares de 1:3, 1:6, 1:9, 1:12 e 1:15.



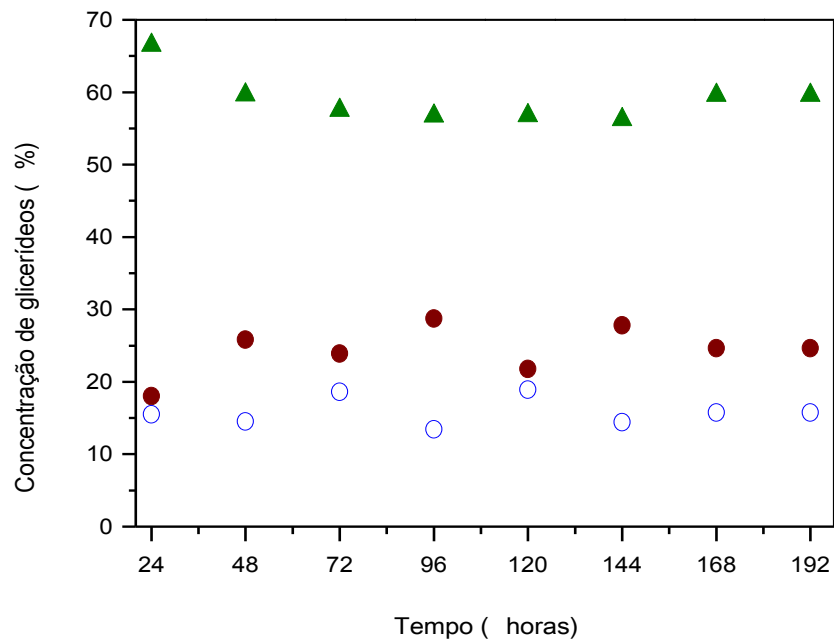
**Figura 5.5** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:3) sob atmosfera inerte.



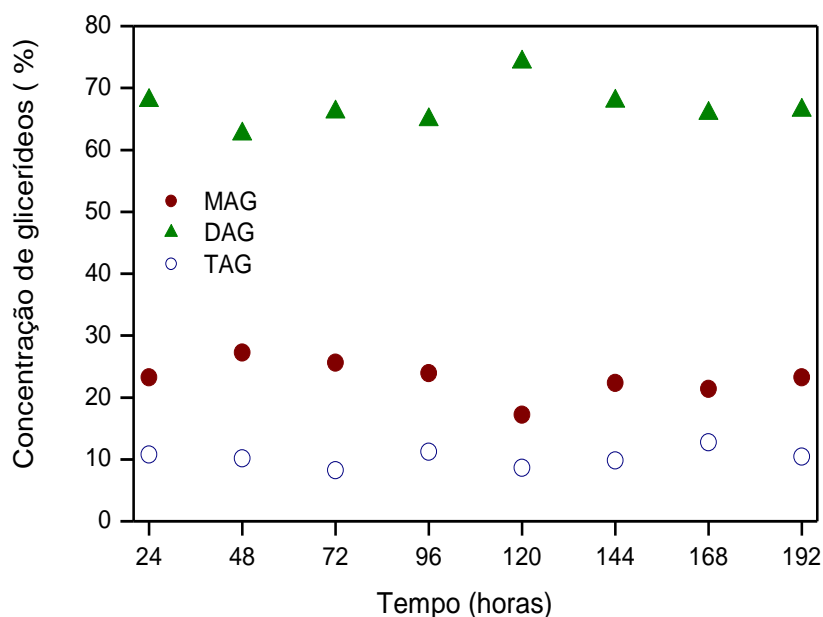
**Figura 5.6** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:6) sob atmosfera inerte.



**Figura 5.7** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:9) sob atmosfera inerte.



**Figura 5.8** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:12) sob atmosfera inerte.



**Figura 5.9** - Perfil de formação de monoglicerídeos (●), diglicerídeos (▲) e consumo de triglicerídeos (○) na reação enzimática de glicerólise de óleo de babaçu (razão molar óleo /glicerol 1:15) sob atmosfera inerte.

As baixas concentrações de MAGs constatadas para substratos contendo óleo e glicerol nas razões molares de 1:3 e 1:6 podem ser creditadas a quantidade insuficiente de glicerol no meio reacional para deslocar o equilíbrio da reação para formação do produto desejado. Nas Figuras 5.5 e 5.6, também pode se observar a ocorrência de desvio da rota enzimática favorecendo a formação de DAGs em detrimento aos MAGs além do menor consumo de TAGs (concentrações residuais superiores a 20% foram obtidas). Esta evidência corrobora com os resultados descritos por Cheirsilp; Kaewthong; H-kittikun (2007), que demonstraram que baixas concentrações de glicerol fornecem altas taxas de produção de diglicerídeos, mas baixos rendimentos de monoglicerídeos.

Por outro lado, o rendimento em MAGs foi claramente favorecido pelo aumento da concentração de glicerol no meio reacional, resultando na formação de cerca de 31,5% empregando misturas na razão molar óleo:glicerol de 1:9. Além disso, nessa reação foi verificado que o sistema experimental manteve-se estável sem grandes oscilações, confirmando que o excesso do álcool favorece a formação dos monoglicerídeos. Esse resultado pode ser justificado pela melhor homogeneidade do meio reacional, reduzindo os problemas de transferência de massa do substrato e conseqüentemente, facilitando a ação da lipase na interface polar-apolar (MARTINELLE et al., 1995).

Entretanto, quando se utilizou um grande excesso de glicerol (razão molar 1:12 e 1:15) houve decréscimo na formação de MAGs da ordem de 20%. Dois fatores podem ter influenciado estes resultados: i) a homogeneidade do meio reacional e ii) a possível aderência do glicerol ao suporte da enzima (KRUGER et al., 2011). Ambos os fatores podem ter dificultado a transferência de massa do sistema reacional, acarretando a ineficiência da catálise enzimática, ou seja, o excesso de glicerol no meio reacional pode ter dificultado o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, resultando numa velocidade de reação mais baixa, conforme relatado por Valério, 2009.

A Tabela 5.2 mostra a influência das diferentes razões molares entre o óleo e glicerol na produtividade de monoglicerídeos.

**Tabela 5.2** – Produtividade na formação de monoglicerídeos nas reações de glicerólises contínuas do óleo de babaçu empregando diferentes razões molares.

<b>Razão molar óleo:glicerol</b>	<b>MAG (%)</b>	<b>DAG (%)</b>	<b>TAG (%)</b>	<b>Produtividade (mg<sub>MAGs</sub>/g<sub>amostra</sub>·h)</b>
<b>RM 1:3</b>	5,5±0,8	69,3±2,2	24,8±1,8	9,17
<b>RM 1:6</b>	19,0±1,1	59,2±1,3	21,7±1,5	31,67
<b>RM 1:9</b>	31,5±1,4	63,9±1,7	12,5±2,8	52,50
<b>RM 1:12</b>	24,4± 1,9	59,6± 1,7	12,5±2,0	40,67
<b>RM 1:15</b>	23,0±1,1	66,5±1,2	10,2±0,6	38,33

MAG – monoglicerídeos, DAG – diglicerídeos, TAG – triglicerídeos.

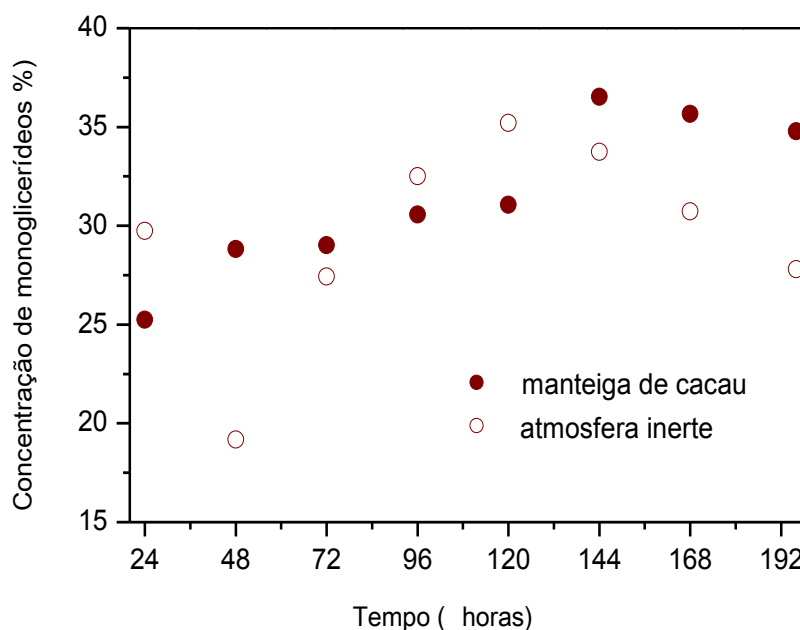
É possível ainda verificar que a razão molar que apresentou a maior formação de MAGs (1:9), também foi a que apresentou o valor mais elevado de produtividade de 52,50 mg<sub>MAGs</sub>/g<sub>amostra</sub>·h para a formação desse glicerídeo, comprovando a adequação dessa condição experimental.

Desta forma para validar a seleção da manteiga de cacau como agente antioxidante, testes comparativos do desempenho da reação de glicerólise foram efetuados sob duas condições operacionais: empregando misturas que favoreceram a obtenção de elevados teores de MAGs (razão molar de 1:9) e empregando misturas que favoreceram elevado consumo de TAGs (razão molar de 1:15).

### 5.3. Reação de glicerólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo em fluxo contínuo utilizando manteiga de cacau como agente antioxidante

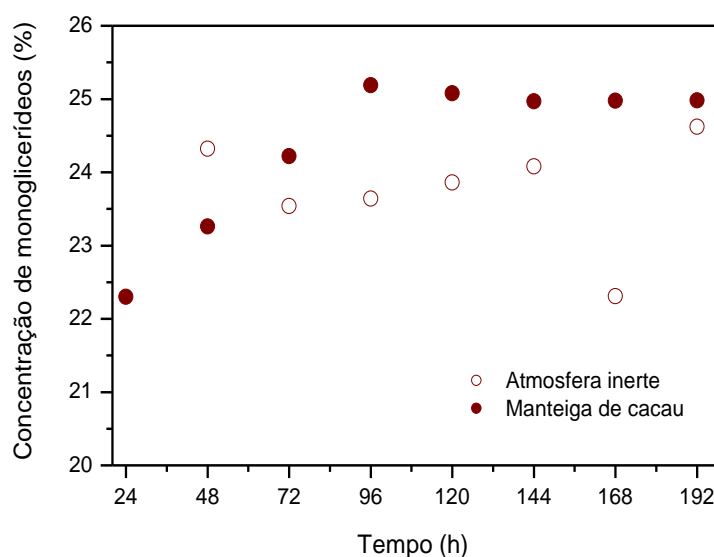
Reações de glicerólise em reator de leito fixo em fluxo contínuo utilizando manteiga de cacau como agente antioxidante foram realizadas, de acordo com metodologia descrita em 4.2.3. O reator foi empacotado com cerca de 7,0g (massa seca) de lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA e em seguida alimentado numa vazão volumétrica descendente de 0,017 mL/min. A manteiga de cacau foi adicionada ao meio de alimentação na proporção de 5% em relação a massa total dos reagentes.

Os resultados obtidos em termos de formação de monoglicerídeos empregando manteiga de cacau e atmosfera inerte como estratégias para controlar a oxidação da matéria-prima estão apresentados nas Figuras 5.10 e 5.11.



**Figura 5.10** – Perfil de formação de monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu catalisada por lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA empregando substrato na razão molar 1:9 (óleo/glicerol) sob atmosfera inerte (○) e na presença de manteiga de cacau como agente antioxidante (●).





**Figura 5.11** - Perfil de formação de monoglicerídeos na glicerólise contínua do óleo de babaçu catalisada por lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA empregando substrato na razão molar 1:15 (óleo/glicerol) sob atmosfera inerte (○) e na presença de manteiga de cacau como agente antioxidante (●).

Os valores obtidos nos testes efetuados empregando manteiga de cacau foram similares daqueles obtidos nos processos conduzidos sob atmosfera inerte (Tabela 5.3), sugerindo que em ambos os casos, ocorreu redução dos peróxidos previamente existentes no óleo de babaçu.

**Tabela 5.3** – Comparação dos resultados obtidos empregando manteiga de cacau e atmosfera inerte na síntese enzimática de monoglicerídeos a partir da glicerólise do óleo de babaçu.

Estratégia		% MAGs <sup>b</sup>	% DAGs <sup>b</sup>	% TAGs <sup>b</sup>
RM 1:9 <sup>a</sup>	Atmosfera inerte	31,54	63,94	12,52
	Manteiga de cacau	30,53	61,18	8,29
RM 1:15 <sup>a</sup>	Atmosfera inerte	23,09	66,98	10,20
	Manteiga de cacau	22,77	66,99	10,24

<sup>a</sup> Razão molar entre óleo e glicerol (O:G).

<sup>b</sup> Valores médios na formação de mono, di e triglicerídeos nas reações de glicerólises.

Isto sugere que a manteiga de cacau inibiu a oxidação da matéria-prima lipídica sem interferir no mecanismo de ação da lipase favorecendo o alcance de valores elevados de MAGs, confirmando os dados obtidos nos testes conduzidos em regime descontínuo e indicando a possibilidade de substituir com sucesso a inserção de linha de gás (nitrogênio) para evitar a oxidação da matéria-prima graxa na síntese de monoglicerídeos.

#### **5.4. Análise dos produtos oxidados (primários e secundários) obtidos na reação de glicerólise contínua do óleo de babaçu**

Para confirmar a eficiência da manteiga de cacau como agente antioxidante do óleo de babaçu os produtos de oxidação primários (POP) e secundários (POS) foram determinados durante o curso da glicerólise contínua sob duas condições operacionais: na presença e ausência da manteiga de cacau. Produtos de oxidação primários são os hidroperóxidos e dienos conjugados, enquanto os produtos secundários são formados por aldeídos, cetonas e ácidos graxos de cadeia curta (RODRIGUES, 2011).

Para a realização desta análise, amostras foram coletadas ao longo do processo e submetidas a leituras em espectrofotômetro ( $\lambda = 232, 268, 270$  e  $272$  nm), de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues (2011). A Tabela 5.4 mostra os valores médios dos coeficientes de absorção obtidos.

**Tabela 5.4** – Valores médios dos coeficientes de absorção (*E*) dos produtos de oxidação primários (POP) e secundários (POS) obtidos na glicerólise contínua do óleo de babaçu empregando lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO<sub>2</sub>-PVA.

<b>Sistema operacional</b>	<b>Produtos de oxidação primária (<i>E</i>)</b>	<b>Produtos de oxidação secundária (<i>E</i>)</b>
<b>Presença de antioxidante no meio de alimentação</b>	0,012	0,004
<b>Ausência de antioxidante no meio de alimentação</b>	0,018	0,010

Analisando a Tabela 5.4 nota-se que a presença da manteiga de cacau no meio de alimentação permitiu a manutenção de baixos valores tanto para os produtos primários como secundários. Verifica-se, entretanto uma elevação na formação de ambos os produtos de oxidação, quando o processo foi conduzido na ausência de antioxidante sugerindo oxidação da matéria-prima lipídica.

Os menores valores de POP constatados no período no qual a manteiga de cacau estava presente no meio reacional foram resultantes da redução dos radicais livres

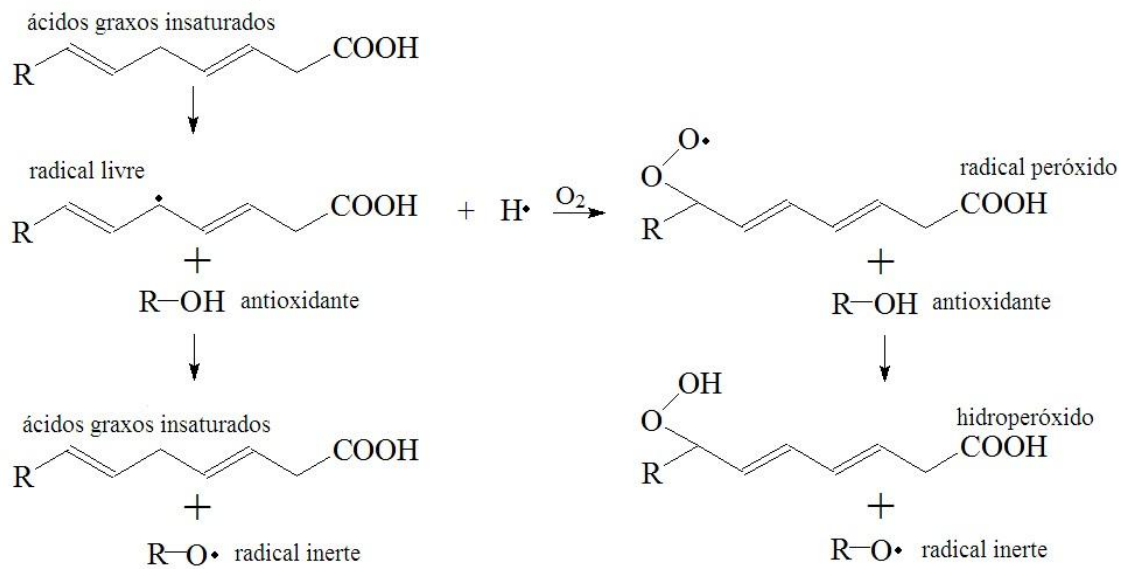
previamente existentes no óleo vegetal, visto que estes podem ser formados a partir da exposição à luz e/ou calor (cisão homolítica).

Além disso, quando a matéria-prima contém radicais peróxidos, o antioxidante atua formando hidroperóxidos, os quais são mais estáveis que os radicais peróxidos, diminuindo a possível formação dos produtos de oxidação secundários originados na etapa de terminação da reação radicalar (formada pela interação entre radicais peróxidos, radicais livres ou radical peróxido com radical livre). Este fato pode ser observado na Tabela 5.4 a qual compara os valores médios dos coeficientes de absorção  $E$  para produtos secundários obtidos na presença da manteiga de cacau foi 60% inferior.

O mecanismo de ação de um agente antioxidante, esquematizado na Figura 5.12, pode ser atribuído a transferência dos hidrogênios das hidroxilas presentes na manteiga de cacau (polifenóis e tocoferol) para a matéria-prima lipídica (atuando nos radicais presentes) dificultando a reação dos ácidos graxos (presentes na composição dos triglicerídeos) com  $O_2$  do ambiente e conseqüentemente inibindo a formação dos produtos primários e secundários (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Ressalta-se também que mesmo que a matéria-prima lipídica apresente baixo teor de oxidação (baixo índice de peróxido) no decorrer de uma reação química, o grau de oxidação pode ser aumentado, devido à etapa de propagação, o que pode culminar com maior formação de radicais peróxidos e hidroperóxidos (Figura 5.12). Por este motivo, a presença de um composto que atue como antioxidante no meio reacional é de importante interesse, visto que inibe a etapa de propagação.

Com relação ao tipo de agente antioxidante, considera-se que quanto maior a quantidade de hidroxilas presentes em sua composição, maior será a probabilidade do hidrogênio desse grupamento “ligar-se” aos radicais formados na etapa de iniciação, e reduz conseqüentemente a formação dos produtos de oxidação durante o processo.



**Figura 5.12** - Mecanismo da ação de agentes antioxidantes na matéria-prima lipídica.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que embora tenha ocorrido uma variação nos valores de  $E$  na ausência e presença da manteiga de cacau no meio reacional, esta não foi muito expressiva. Isto pode ser explicado em função da matéria-prima utilizada, que apresenta baixo grau de insaturação (inferior a 20%) sendo praticamente composta por ácidos graxos saturados (47% de ácido láurico), que são menos susceptíveis a oxidação, comparados aos ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos insaturados apresentam em sua cadeia carbônica ligações  $\pi$ , que são mais instáveis e conseqüentemente mais suscetíveis à oxidação, o que ocasiona uma maior formação de peróxidos.

## 6. CONCLUSÕES

Modificações enzimáticas de óleos e gorduras requerem o uso de estratégias para evitar a oxidação dos materiais de partida, sendo recomendado o uso de atmosfera inerte. Entretanto, a inserção de linha de gás inerte (nitrogênio) durante o progresso da reação representa um custo adicional ao processo. Uma alternativa, ainda pouco explorada, é baseada na adição de agentes antioxidantes naturais no meio reacional, como adotado na indústria de alimentos que incorpora em seus produtos diversos tipos de compostos antioxidantes. Em reações enzimáticas de glicerólise, somente recentemente, a adição de agentes antioxidantes no meio reacional vem sendo proposta como estratégia para evitar a oxidação da matéria-prima lipídica. Neste trabalho foi investigado o efeito de diferentes agentes oxidantes no controle da oxidação do meio reacional em processos conduzidos em regime descontínuo e fluxo contínuo. Os resultados obtidos demonstraram que:

- Entre os nove antioxidantes testados em reator descontínuo, foi possível selecionar a manteiga de cacau como alternativa ao emprego da atmosfera inerte, visto que a sua utilização no meio reacional não interferiu no perfil dos produtos formados.
- Nos testes contínuos em reator de leito fixo, empregando diferentes razões molares entre óleo/glicerol, sob atmosfera inerte, constatou-se que a razão molar entre óleo e glicerol foi um fator seletivo para as reações de glicerólises enzimáticas, na qual valores mais elevados de glicerol favoreceram a formação de MAGs, enquanto valores mais baixos favoreceram a formação de DAGs. Estes resultados podem ser ainda fundamentados na capacidade do glicerol em deslocar o equilíbrio da reação, favorecendo um determinado produto, pela homogeneidade do sistema reacional e pelos fenômenos causados pela aderência do glicerol no suporte da enzima. O melhor desempenho nos testes contínuos empregando diferentes razões molares foi obtido empregando substratos na razão molar óleo de babaçu: glicerol de 1:9, atingindo 31,5% de MAGs e produtividade de  $52,5 \text{ mg}_{\text{MAGs}}/\text{g}_{\text{amostra}}\cdot\text{h}$ .
- Desempenhos similares foram obtidos para os sistemas operacionais conduzidos em fluxo contínuo empregando manteiga de cacau como agente antioxidante em relação aos testes conduzidos sob atmosfera inerte. Isto sugere que a manteiga de cacau inibiu ou reduziu a oxidação do óleo de babaçu durante a síntese de MAGs, indicando a possibilidade de substituição da atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) na reação.

- O efeito benéfico da manteiga de cacau como agente antioxidante foi ainda verificado por meio da quantificação dos produtos de oxidação primários (hidroperóxidos e dienos conjugados) e secundários (aldeídos e cetonas), confirmando a eficiência da manteiga de cacau como agente antioxidante da matéria-prima lipídica.
- Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a viabilidade de sintetizar monoglicérides de forma sustentável, substituindo o emprego da atmosfera inerte no meio reacional (nitrogênio gasoso) por compostos de origem vegetal, visando inibir a oxidação da matéria-prima lipídica. Além de simplificar o aparato experimental, esta estratégia reduz os custos adicionais advindos da utilização de uma linha contínua de N<sub>2</sub> para manter atmosfera inerte.

## REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, P.; HU, P.; YAFEI, Z. Oxidative stabilities of enzymatically interesterified fats containing conjugated linoleic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 11, p. 1961-1970, 2012.
- AGUEDO, M.; GIET, J.; HANON, E.; LOGNAY, G.; WATHELLET, B.; DESTAIN, J.; BRASSEUR, R.; VANDENBOL, M.; DANTHINE, S.; BLECKER, C.; WATHELET, J. Calorimetric study of milk fat/rapeseed oil blends and their interesterification products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 376-385, 2009.
- AGUEDO, M.; HANON, E.; DANTHINE, S.; PAQUOT, M.; LOGNAY, G.; THOMAS, A.; VANDENBOL, M.; THONART, P.; WATHELET, J.; BLECKER, C. Enrichment of anhydrous milk fat in polyunsaturated fatty acid residues from linseed and rapeseed oils through enzymatic interesterification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1757-1765, 2008.
- ALBIERO, D.; MACIEL, A. J. S.; LOPES, A. C.; MELLO, C. A.; GAMERO, C. A. Proposta de uma máquina para colheita mecanizada de babaçu (*Orbignya phalerata Mart.*) para a agricultura familiar. **Acta Amazônica**, v.37, n. 3, p.337-346, 2007.
- AMANO ENZYME Inc., Disponível em: <[www.amano-enzyme.co.jp](http://www.amano-enzyme.co.jp)>. Acesso em 15/03/2013.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5<sup>th</sup> ed. Champaign: AOCS Press, 2004.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10.07.2013.
- BALTARU, R.; GALACTION, A.; CASCAVAL, D. Bioreactors of "basket" type with immobilized biocatalysts. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> WSEAS International Conference on Biomedical Electronics and Biomedical Informatics, p. 238-243, 2009.
- BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 161-169, 1997.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 392-416, 1996.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15-29, 2010.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, P. L. Glicerol: um breve histórico e aplicação em síntese estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, E.; MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 362-369, 2001.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 369-380.

BOUAID, A.; APARICIO, J.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Synthesis of a green biosolvent: Isopropyl esters. A statistical approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 533-538, 2007.

BOYLE, E. Monoglycerides in food systems: current and future uses. **Journal of Food Technology**, v. 51, 8, p. 52-59, 1997.

CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. **Biochemistry Engineering Journal**, 35, n.1, p. 71-80, 2007.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A., SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508-5516, 2010.

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

DE OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.

EBRAHIMABADI, A. H.; EBRAHIMABADI, E. H.; DJAFARI-BIDGOLI, Z.; KASHI, F. J.; MAZOOCHI, A.; BATOOLI, H. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v.119, n.2, p.452-8, 2010.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry: A Textbook**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2004.

FAN, X.; BURTON, R.; ZHOU, Y. Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review. **The Open Fuels and Energy Science Journal**, v. 3, p. 17-22, 2010.

FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, D.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L. The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 17-35, 2013.



FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; DA FONSECA, M. M. R. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.11, n.4-6, p.699–711, 2001.

FOGLER, H. S. **Elements of chemical reaction engineering**, 4<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2005. 1080p.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELA, C. B. Produção de monoglicérides e diglicérides via glicérolise enzimática e destilação molecular. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1539 – 1543, 2009.

FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BON, E. P. S; SANT'ANNA JR.; G. L. Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n.1, p. 6-12, 1997.

FREIRE, G. D. M.; CASTILHO, F. L. Lipases em Biotálise. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro, Interciência, 2008.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos polinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. **Revista Científica Multidisciplinar da Fundação Educacional de Barretos**, v. 1, n. 1, p. 50-60, 2006.

FREITAS, L. **Seleção de rota enzimática para a produção de monoglicérides empregando lipase imobilizada em matriz híbrida obtida pela técnica sol-gel**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: Influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.18, n.7, p.1360-1366, 2007.

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

FREITAS, L. **Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para a produção enzimática de monoglicérides**. 2009. 155 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Departamento de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp). **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1068-1074, 2009a.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BAREZA, M. V.; DE CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese

enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009b.

FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; ZANIN, G.M.; DE CASTRO, H.F. Packed-bed reactor running on babassu oil and glycerol to produce monoglycerides by enzymatic route using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 372-381, 2010.

FREITAS, L.; DORS, G.; CARNEIRO, B. C.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Strategies to inhibit the lipid oxidation in the enzymatic synthesis of monoglycerides. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, 2013.

GOTO, M.; HATANAKA, C.; GOTO, M. Immobilization of surfactant-lipase complexes and their high heat resistance in organic media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 91-94, 2005.

GUPTA, R.; GUPTA, N; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

HALIM, S. F. A.; KAMARUDDIN, A. H.; FERNANDO, W. J. N. Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 710-716, 2009.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HARA, P.; HANEFELD, U.; KANERVA, L. T. Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 50, p. 80-86, 2008.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEE, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HOLMBERG, K., OSTERBERG, E. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 9, p. 1544-1548, 1998.

INOVAM BRASIL. Disponível em: <http://www.inovam.com.br>. Acesso: 1. 05.2013.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Review**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; SCHNEIDER, B.; ROSENAU, F.; WERNER, M.; LANG, D.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 3, p. 3-12, 1997.

JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAYAPRAKASH, A.; EBENEZER, P. Investigation on extracellular lipase production by *Aspergillus japonicus* isolated from the paper nest of *Ropalidia marginata*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p.113-117, 2010.

KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 218-222, 2004.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H- KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm oil with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1525-1530, 2005.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 4, p. 317-324, 2000.

KAMORI, M.; HORI, T.; YAMASHITA, Y.; HIROSE, Y.; NAOSHIMA, Y. Immobilization of lipase on a new inorganic ceramics support, toyonite, and the reactivity and enantioselectivity of the immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 269-274, 2000.

KROG, N. Food Emulsifiers. In: **Lipid technologies and applications**, ed. Gunstone, F.D., New York: Marcel Dekker, 1997, p. 521-534.

KRUGER, R. L.; SYCHOSKI, M.; BALEN, M.; NINOW, J. L.; CORAZZA, M. L. Estudo da glicerólise enzimática na produção de mono e diacilgliceróis utilizando óleo de oliva. **RECEN - Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 3, p. 331-351, 2011.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000. Cap. 5, p. 74-98.

Li, Z. Y.; WARD, O. P. Lipase-catalysed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty-acid concentrate in organic-solvent. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 8, p. 745-748, 1993.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 463-470, 2006.

MAJID, N; CHEIRSILP, B. Optimal conditions for the production of monoacylglycerol from crude palm oil by an enzymatic glycerolysis reaction and recovery of carotenoids from the reaction product. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 793–800, 2012.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARTINELLE M, HOLMQUIST M, HULT K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 272-276, 1995.

MCCLEMENTS, D. J. Lipid-Based Emulsions and Emulsifiers. **Food Lipids**, Eds. Akoh, C. C.; Min, D. B. Marcel Dekker USA, p. 55-88, 1998.

MESSIAS, J. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.

MILLQVIST-FUREBY, A., ADLERCREUTZ, P., MATTIASSON, B. Glyceride synthesis in a solvent-free system, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p.1489-1495, 1996.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L.V. **Introdução à ciência de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 2002. 255p.

MUKHERJEE, K. D.; HILLS, M. J. Lipases from plants. **Lipases: Their structure, biochemistry and application**, p. 49-75, 1994.

NAKAOKI, T.; MEI, Y.; MILLER, L. M.; KUMAR, A.; KALRA, B.; MILLER, M. E.; KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.; GROSS, R. A. *Candida antarctica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: effects of immobilization matrices on polymerization kinetics & molecular weight. **Industrial Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 126-134, 2005.

NUNES, G. F. M.; PAULA, A. V.; DE CASTRO, H. F.; SANOS, J. C. Desempenho da lipase de *Aspergillus niger* na interesterificação da gordura de leite com óleo de soja. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17, 2009, Natal.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 106-113, 2006.

ÖĞÜTÇÜ, H.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; ŞAHİN, F.; BARIŞ, O.; GÜLLÜCE, M. Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* C.A.Mey. and *Salvia sclarea* L. **Turkish Journal of Biology**, v. 32, p. 181-192, 2008.

OHTA, Y.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Inhibition and inactivation of lipase by fat peroxide in the course of batch and continuous glycerolysis of fat by lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1885-1890, 1989.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

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

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PIMENTEL, S. A.; KUMAGAI, E. E.; CARUSO, M. S. F.; TAKEMOTO, E.; TAVARES, M. Composição de ácidos graxos e tocoferóis em óleos especiais. In: II Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2005, Varginha – MG.

PIROZZI, D. Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 608-613, 2003.

QUIROGA, P.R.; GROSSO, N.R.; LANTE, A.; LOMOLINO, G.; ZYGADLO, J.A.; NEPOTE, V. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 642-649, 2013.

RAJENDRAN, A; PALANISAMY, A; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.1, p. 207-219, 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMIRO-PUIG, E.; CASTELL, M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 07, p. 931-940, 2009.

REETZ, M. T.; JAEGER, K. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 3-14, 1998.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.

RIBEIRO, B. D. **Aplicação de tecnologia enzimática na obtenção de  $\beta$ -caroteno a partir de óleo de buriti (*Mauritia vinifera*)**. 2008. 119p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

RODRIGUES FILHO, M. G. **Cardanol e eugenol modificados**: uso como antioxidante no processo oxidativo do biodiesel de algodão. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009, Exame de Qualificação.

RODRIGUES, J. M. M. Produção enzimática de lipídeos estruturados, ricos em ácidos gordos polinsaturados  $\omega$ -3, em reator de alta pressão. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 61, p. 253-283, 2007.

SALUM, T.F.C.; BARON, A.M.; ZAGO, E.; TURRA, V.; BARATTI, J.C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from *Burkholderia cepacia* strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, p. 197-203, 2008.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52-53, p.49-57, 2008.

SANTOS, J. S.; DORS, G.; OLIVEIRA, D.; MONTE BLANCO, S. F. M.; OLIVEIRA, J. V.; FURIGO JÚNIOR, A.; NINOW, J. L. Glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial de *Rhizomucor miehei* em meio com surfactante de grau alimentício. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 46-51, 2013.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1-3, p. 350-361, 2008.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v.39, p. 4067-4079, 2010.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-9, p.745-757, 1999.

SOUZA, S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, J.; MALLEt, A. C. T.; NELSON, D. L. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.13, n.4, p.456-466, 2011.

SUAREZ, P. A.; SANTOS, A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, M. B. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 768-775, 2009.

TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Glyceride synthesis by 4 kinds microbial lipase, **Biochimica and Biophysica Acta**, v.489, n.3, p.415-422, 1977.

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

VALÉRIO, A.; KRUGER, R. L.; NINOW, J. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis olive oil in surfactant system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8350 - 8356, 2009.

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 805-812, 2010.

VERMA, M. L.; KANWAR, S.S. Properties and application of poly (methacrylic acid-cododecyl methacrylate-cl-N, Nmethylene bisacrylamide) hydrogel immobilized *Bacillus cereus* MTCC 8372 lipase for the synthesis of geranyl acetate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 837-846, 2008.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

WATANABE, T.; SUGIURA, M.; SATO, M.; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 637-643, 2005.

XU, J. H.; ZHOU, R.; BORNSCHEUER, U. T. Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 6, p. 415-422, 2005.

XU, X.; TIMM-HEINRICH, M.; NIELSEN, N.S.; PORSGAARD, T.; JACOBSEN, C. Effects of antioxidants on the lipase-catalyzed acidolysis during production of structured lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 7-8, p. 464-468, 2005.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1475-1481, 2005.

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

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4. p. 35-85.

ZENG, F.; YANG, B.; WANG, Y.; WANG, W.; NING, Z.; LI, L. Enzymatic production of monoacylglycerols with camellia oil by the glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 531-537, 2010.

ZHENG, Y.; CHEN, X.; SHEN, Y. Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 5253-5277, 2008.

## APÊNDICE A

**Tabela 1** – Composição de ácidos graxos do óleo de buriti e manteiga de cacau (%).

Composição de ácidos graxos	Óleo de buriti	Manteiga de cacau
C14:0	-	0,1
C16:0	15,9	25-27
C16:1	0,5	0,1-0,3
C17:0	-	0,1
C18:0	1,3	31-37
C18:1	79,4	31-35
C18:2	1,5	2,8-4,0
C18:3	0,8	0,1
C20:0	0,1	0,2-1,0
C20:1	0,3	-

Fonte: PIMENTEL et al. 2005; FIRESTONE, 2006.