



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

**MARIA MANUELA CAMINO FELTES**

**PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E  
DIACILGLICERÓIS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS  
ÔMEGA-3 A PARTIR DA GLICERÓLISE  
ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

**Florianópolis/SC  
Janeiro de 2011**



**MARIA MANUELA CAMINO FELTES**

**PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E  
DIACILGLICERÓIS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS  
ÔMEGA-3 A PARTIR DA GLICERÓLISE  
ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora de Oliveira

**Florianópolis/SC  
Janeiro de 2011**



**PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E  
DIACILGLICERÓIS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS  
ÔMEGA-3 A PARTIR DA GLICERÓLISE  
ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE PEIXE**

**MARIA MANUELA CAMINO FELTES**

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

Florianópolis, 10 de janeiro de 2011.

---

Prof. Jorge Luiz Ninow, D. Sc.  
Orientador

**Comissão Julgadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Débora de Oliveira, D. SC.  
Co-Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Nadia Krieger, D. Sc.

---

Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, D. Sc.

---

Prof. Marcos Lúcio Corazza, D. Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Jane Mara Block, D. Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antônio, D. Sc.



Dedico este trabalho à minha família.

À minha avó e minha mãe,  
exemplos de coragem, força e amor.

Ao Alessandro, minha paixão.

Em especial ao meu pai amado,  
Eng° Armando Feltes (*in memoriam*).  
Meu herói, meu amigo.  
Saudades eternas.





*Ah, que ninguém me dê piedosas intenções!  
Ninguém me peça definições!  
Ninguém me diga: "vem por aqui"!  
A minha vida é um  
vendaval que se soltou.  
É uma onda que se levantou.  
É um átomo a mais que se animou...  
Não sei por onde vou,  
Não sei para onde vou.  
- Sei que não vou por aí!*

Trecho de "Cântico Negro",  
do poeta português  
José Régio (1901-1969).



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

A todos que colaboraram para a concretização deste trabalho, em especial:

À CAPES, pelas bolsas concedidas no Brasil e na França.

Ao Prof. Jorge, pela orientação, amizade, pelo apoio em todas as situações e por ter apostado neste projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Débora, pela orientação, amizade, confiança, por estar sempre aberta a sugestões e discussões, e por ter viabilizado, em conjunto com o Prof. José Vladimir de Oliveira, a realização de parte deste trabalho na URI - Campus de Erechim.

À Prof<sup>a</sup>. Jane, pela amizade, pelas sugestões e discussão dos resultados, por ter viabilizado a realização de análises na UNICAMP e pelo auxílio em diversas situações.

Aos membros da banca, por terem contribuído para o enriquecimento do trabalho.

A todos os professores que participaram da minha formação.

Aos funcionários do EQA.

Aos professores Agenor Furigo Junior, Willibaldo Schmidell Neto, Helen Treichel e Barbeta, pelas contribuições ao longo do trabalho.

Ao Químico João Correia, que nunca deixou de contribuir com seu vasto conhecimento.

À Novozymes e à OmegaProtein, pelas amostras para a realização desta pesquisa.

À minha prima Maria Beatriz Morel e seu marido, Pierre, pelos momentos inesquecíveis durante minha estada na França e por todo o carinho.

Aos queridos e sinceros amigos de longa data que sempre comemoram as minhas vitórias e me incentivaram frente aos desafios.

Aos amigos que adquiri durante a carreira acadêmica.

À Dani Farias, pela amizade para a vida inteira.

À Fran Dalcanton, pela amizade verdadeira, pelos conselhos e por estar sempre presente, mesmo quando um oceano nos separava!

À Gisa, pela amizade, parceria e boas idéias.

À Adriana Slongo, que sempre se fez presente, apesar da distância.

À Lu e ao Anderson, que, apesar de não terem participado diretamente deste trabalho, compartilharam comigo o dia-a-dia do laboratório, sempre com companheirismo, responsabilidade, bom humor, jovialidade. Adoro vocês!

A todos do ENGEBIO: Denise, Bia, Morgana, Jaci, Déia Tremarin, Kelin, Mélodi, Letícia, Kellen, Ana Paula, Sabrina, Rosana, Rose Marie, Amanda, Renata, Riveli, Siannah, Américo, Robson, Franciello, Bruna Müller, Camila, Marcinha, Chalana, Andréia, Silmara, Lauren, Bruna, Vinicius, Daniel, Willian, e tantas outras pessoas queridas que trabalharam no lab! As conversas, viagens e experiências compartilhadas, os almoços e cafés deixaram a vida acadêmica mais animada! Aos professores Gláucia e Miguel.

Meus agradecimentos à “Seleção do CIRAD”, especialmente a Pierre Villeneuve, por ter supervisionado meu trabalho durante o estágio em seu laboratório, e a Bruno Baréa, por ter me ajudado muito durante os experimentos. Eu agradeço igualmente a Georges Piombo, Michel Pina, Nathalie Barouh, Jérôme Lecomte, Karim, Christelle, Marlène, Kathy, Clara, Livie, Ana Cristina. J’espère qu’on se rencontre bientôt!

À equipe do projeto Emulsificantes, recém-formado no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO): Francisca, Joanna, Felipe, Henrique.

Aos demais colegas e amigos que conheci durante a pós-graduação e por quem tenho carinho; entre eles: Cris Pilissão, Rosane Martins, Rosane Beber, Bianca Sens, Fran Schmidt.

Aos brasileiros que conheci em Montpellier e que tornaram mais alegres os dias longe do nosso país... Em especial à Delaine, Regina, Renata, Bruno, Paulo. À Joice (Toulouse) pelas viagens! À Ioiô, pela acolhida calorosa com a “porti” em Saint-Etienne! Aos meus “colocs” Ségo, Violaine, Alexandre e Felipe, por terem tentado me animar nos momentos de muito trabalho, de saudades e de dúvidas...

Aos colegas do laboratório da URI, em especial à Karina e ao Lindo.

Ao Alessandro, paixão da minha vida, por me motivar e apoiar, com muito amor e bom humor. Te amo! Hoje e sempre!!!

À minha família: mãe, vó, mana e sobrinhas. Amo vocês!!!

A todos vocês, meu reconhecimento e carinho!  
Manu

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi apresentar novas informações experimentais para a obtenção de emulsificantes (monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis) por meio da glicerólise de óleo de peixe em diferentes sistemas (livre de solvente e de surfactante, na presença de *tert*-butanol ou contendo surfactante de grau alimentício), utilizando-se a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 como catalisador. Entre os surfactantes testados (Tween 60, Tween 65, Tween 80 e lecitina de soja), o Tween 65 foi escolhido para o aprofundamento do estudo no meio contendo este aditivo, com o intuito de melhorar o contato entre os substratos imiscíveis (óleo e glicerol) e a enzima. Análises prévias verificaram, entretanto, que a lipase testada pode agir sobre todos os surfactantes avaliados. Nas reações de glicerólise testadas, o efeito de parâmetros de processo relevantes (concentração de enzima, temperatura, proporção molar de glicerol e óleo, proporção de solvente, concentração de surfactante) para a produção dos emulsificantes desejados foi avaliado em todos os meios reacionais. Para todos os sistemas, as condições da glicerólise mostraram-se importantes para a obtenção dos produtos desejados. Apesar de a reação de glicerólise ter sido viável em meio livre de solvente e de surfactante, foi necessário um longo tempo de reação (24h) para a obtenção de quantidades satisfatórias de mono- (25,93% m/m) e diacilgliceróis (38,24% m/m). Estes teores foram obtidos em reação conduzida a 70°C em banho-maria do tipo Dubnoff, com 5% de lipase (em massa, em relação ao total de substratos) e com a proporção molar de glicerol e óleo de 1:1. Foi possível produzir 43,30% e 43,10% de diacilgliceróis em meios contendo, respectivamente, 1:1 (v/v) de *tert*-butanol e 5% (m/m em relação ao total de substratos) de Tween 65. As reações para os dois sistemas foram conduzidas a 70°C, durante 2h sob agitação mecânica, utilizando-se a proporção molar de glicerol:óleo de 1:1 e 15% de lipase (m/m). Este estudo descreveu a viabilidade da produção de monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis enriquecidos em EPA e DHA, utilizando-se diferentes meios reacionais.

*Palavras-chave:* lipase, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, óleo de peixe, ácidos graxos ômega-3



## ABSTRACT

The aim of this study was to present new experimental information concerning the production of emulsifiers (monoacylglycerols and/or diacylglycerols) by means of glycerolysis of fish oil in different reaction systems (solvent-free and surfactant-free, with *tert*-butanol or with a food grade surfactant), by using the lipase Novozym<sup>®</sup> 435 as catalyst. After a screening of different surfactants (Tween 60, Tween 65, Tween 80 and soy lecithin), Tween 65 was chosen for further studies for the system containing this additive, in order to improve the contact between the immiscible substrates (glycerol and oil) and the enzyme. Previous analyses indicated, however, the lipase can modify all tested surfactants. In the performed glycerolyses reactions, the effect of the more relevant process parameters (enzyme concentration, temperature, glycerol to oil molar ratio, solvent ratio or surfactant concentration) on mono- and diacylglycerols production was assessed. For all systems, reaction conditions proved to be important for the formation of the desired products. Although the glycerolysis reaction in a solvent-free and surfactant-free system has been feasible, a long time (24h) was necessary to achieve appreciable amounts of monoacylglycerols (25.93wt%) and diacylglycerols (38.24wt%). These contents were observed for the reaction performed at 70°C in a Dubnoff water bath, with 5wt% of lipase (based on total substrates) and the glycerol to oil molar ratio of 1:1. It was possible to produce 43.30wt% and 43.10wt% of diacylglycerols in the reaction media containing, respectively, 1:1 (v/v) of *tert*-butanol and 5wt% of Tween 65 (based on total substrates). Reactions for both systems were carried out at 70°C for 2h under mechanical stirring, with the glycerol to oil molar ratio of 1:1 and 15wt% of lipase. This study described the feasibility of enzymatic synthesis of mono- and/or diglycerides rich in omega-3 fatty acids by using different reaction media.

**Keywords:** lipase, monoacylglycerols, diacylglycerols, fish oil, omega-3 fatty acids





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química dos ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA). .....	9
<b>Figura 2</b> – Captura mundial de savelha ( <i>Brevoortia patronus</i> e <i>Brevoortia tyrannus</i> ) de 1950 a 2008.....	12
<b>Figura 3</b> – Estrutura química do glicerol.....	13
<b>Figura 4</b> – Reação global de transesterificação para a produção de ésteres alquílicos (biodiesel). .....	14
<b>Figura 5</b> – Estrutura química e formas isoméricas de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. ....	18
<b>Figura 6</b> – Esquema das reações de hidrólise de triacilgliceróis (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa).....	23
<b>Figura 7</b> – Esquema da reação global de glicerólise para a produção de a) monoacilgliceróis e b) diacilgliceróis. ....	25
<b>Figura 8</b> – Figuras (a) da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B (PDB, 2011) e (b) dos resíduos de aminoácidos da tríade catalítica e resíduos polares presentes nas proximidades, formando pontes de hidrogênio na cavidade do sítio ativo.....	31
<b>Figura 9</b> – Esquema do sítio ativo (SA) e da tampa da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B. ....	32
<b>Figura 10</b> – Representação de uma micela normal (óleo em água) e de uma micela reversa (água em óleo).....	39
<b>Figura 11</b> – Estrutura química dos fosfatídios e estrutura aproximada do Tween 65, Tween 80 e Tween 85. ....	41
<b>Figura 12</b> – Diagrama esquemático do aparato experimental para as reações de glicerólise enzimática com <i>tert</i> -butanol e com surfactantes. BT – Banho termostático de recirculação, AM – Agitador mecânico e R – Reator de vidro encamisado com capacidade de 40mL.....	59
<b>Figura 13</b> - Esquema do procedimento adotado para as reações de glicerólise e para o tratamento das amostras. Borda simples: etapas realizadas no Brasil e na França; borda pontilhada: etapa realizada no Brasil; borda dupla: etapa realizada na França.....	60
<b>Figura 14</b> – Variação da viscosidade (a) do glicerol e (b) do óleo de peixe OmegaPure em função da temperatura.....	74
<b>Figura 15</b> - Placa de CCD das amostras do meio reacional com glicerol e diferentes surfactantes de grau alimentício. Meio reacional com lecitina de soja depois de (1) 2h e (2) 6h; (3) Tween 65 depois de	

2h; (4) Tween 80 depois de 2h; (5) Tween 85 depois de 2h; (6) Lecitina de soja pura; (7) Tween 65 puro; (8) Tween 80 puro; (9) Tween 85 puro; (10) Ácido oléico; (11) Ácido esteárico; (12) Ácido palmítico..... 77

**Figura 16** - Placa de CCD do meio reacional com glicerol e diferentes surfactantes de grau alimentício. Meio reacional com lecitina de soja depois de (1) 2 e (2) 6h; (3) Tween 65 depois de 2h; (4) Tween 80 depois de 2h; (5) Tween 85 depois de 2h; (6) Lecitina de soja pura; (7) Tween 65 puro; (8) Tween 80 puro; (9) Tween 85 puro; (10) Ácido oléico; (11) Ácido esteárico; (12) 1-oleína; (13) 1,3-dioléina; (14) Triacilgliceróis do óleo de peixe OmegaPure; (15) Oleato de etila. .... 78

**Figura 17** - Placa de CCD das amostras do meio reacional com (1) glicerol e óleo de peixe após 48h, (2) glicerol e Tween 85 após 2h, (3) controle (reação sem a enzima) com glicerol e Tween 85 após 62h, (4) água e Tween 85 após 2h, (5) glicerol, óleo de peixe e Tween 85 após 2h, (6) glicerol e óleo de peixe após 62h sob atmosfera inerte, (7) controle (reação sem a enzima) com glicerol e óleo de peixe após 62h sob atmosfera inerte..... 79

**Figura 18** - Perfis cromatográficos característicos, obtidos por cromatografia em fase gasosa, de amostras do meio reacional (a) antes e (b) após 2 horas de reação na presença de *terc*-butanol... 82

**Figura 19** – (A) Análise por CCD dos padrões de (a) ácido oléico, (b) monooleína, (c) dioléina, (d) dipalmitina, do meio (e) antes e (f) após a reação com *terc*-butanol; (B) Análise por CCD do meio (a) antes e após a reação (b) na ausência de solvente e de surfactante, (c) na presença de *terc*-butanol e (d) na presença do surfactante Tween 65. .... 87

**Figura 20** – Lipase Novozym<sup>®</sup> 435 submetida a três lavagens sucessivas com 20mL de *n*-hexano cada (foto à esquerda) e com uma mistura de *n*-hexano e etanol 96%, 1:1, v/v (foto à direita), após recuperação do meio de reação de glicerólise de óleo de peixe na presença de Tween 85. .... 91

**Figura 21** – Cromatogramas, obtidos por cromatografia em fase gasosa, do meio reacional de glicerólise de óleo de peixe com Tween 85, catalisada pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, (a) no tempo zero e após 2h de reação após a recuperação da enzima com (b) *n*-hexano e (c) *n*-hexano e etanol. .... 92

**Figura 22** – Gráfico de Pareto para a análise do efeito das variáveis sobre a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise

enzimática de óleo de peixe na presença de (a) <i>tert</i> -butanol e (b) Tween 65.....	100
<b>Figura 23</b> – Superfícies de resposta para a produção de diacilgliceróis (teor mássico, %) em <i>tert</i> -butanol, em função (a) da proporção molar de glicerol e óleo (G:O) e da temperatura (5% de lipase e proporção de solvente de 1:1) e (b) da concentração de enzima e da temperatura (proporção molar de glicerol e óleo de 1:1 e proporção de solvente de 1:1). .....	103
<b>Figura 24</b> - Superfícies de resposta para a produção de diacilgliceróis (teor mássico, %) em Tween 65, em função (a) da concentração de enzima e da temperatura (proporção molar de substratos de 1:1 e 5% de surfactante) e (b) da concentração de surfactante e de enzima (55°C, proporção molar de glicerol e óleo de 1:1). .....	104
<b>Figura 25</b> - Placas de CCD com amostras de reação de hidrólise de óleo de peixe, eluídas com os sistemas de solventes (a) hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v) e (b) clorofórmio/acetona (90:10, v/v).....	106
<b>Figura 26</b> - Placas de CCD com amostras do meio de reação de glicerólise eluídas com diferentes proporções volumétricas de hexano/éter etílico/ácido acético (indicadas na figura). Ordem de eluição (a partir da linha base): MAG, DAG, AGL, TAG, ésteres alquílicos. ....	106
<b>Figura 27</b> - Placa de CCD do meio reacional da hidrólise do óleo de peixe pela lipase Novozym <sup>®</sup> 435. ....	108
<b>Figura 28</b> - Placa de CCD referente às amostras (a) do meio reacional, e da mistura de padrões de (b) mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres, (c) mono- e diacilgliceróis, (d) diacilgliceróis, (e) ácido oléico e (f) colesterol.....	109
<b>Figura 29</b> – Picos referentes aos padrões de (a) diacilgliceróis (picos 3 e 4) e (b) colesterol (pico 2), visualizados a 200nm por densitometria, após a migração das amostras por CCD. ....	109
<b>Figura 30</b> – Picos referentes a amostras (a) do meio reacional, (b) da mistura de padrões, (c) do padrão de diacilgliceróis e (d) de colesterol, visualizados a 200nm por densitometria, após a migração das amostras por CCD.....	110
<b>Figura 31</b> - Placas de CCD de amostras da reação de glicerólise do óleo de peixe (a) com e (b) sem condicionamento prévio da lipase Novozym <sup>®</sup> 435 a 40°C durante 1h.....	111
<b>Figura 32</b> – Teor mássico de mono- e diacilgliceróis (%) formados durante a reação de glicerólise de óleo de peixe (a) sem e (b) com	

condicionamento prévio da lipase Novozym <sup>®</sup> 435 a 40°C durante 1h. ....	112
<b>Figura 33</b> – Perfil da produção de mono- e diacilgliceróis (teor mássico, %) na glicerólise de óleo de peixe catalisada pela Novozym <sup>®</sup> 435. ....	115
<b>Figura 34</b> – Gráfico de Pareto para a análise do efeito das variáveis sobre a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante. ....	121
<b>Figura 35</b> – Conversão molar de triacilgliceróis na reação de glicerólise a 70°C, proporção 1:1 (glicerol:óleo, mol/mol) e 5% de lipase. 123	
<b>Figura 36</b> – Superfície de resposta para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante, em função da proporção molar de glicerol e óleo (G:O) e da temperatura de reação, na presença de 5% (m/m) da lipase Novozym <sup>®</sup> 435.....	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor típico dos principais ácidos graxos presentes no óleo de savelha.....	13
Tabela 2. Pontos de fusão (°C) de alguns ácidos graxos e de seus mono-, di- e triacilgliceróis simples. ....	26
Tabela 3. Condições otimizadas e resultados de alguns estudos sobre reações de glicerólise enzimática, em reator em batelada. ....	44
Tabela 4. Nível das variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionado $2^{4-1}$ para a reação de glicerólise enzimática em meio com surfactante e em meio com <i>terc</i> -butanol. ....	68
Tabela 5. Nível das variáveis investigadas no planejamento fatorial completo $2^3$ para a reação de glicerólise enzimática em meio livre de solvente e de surfactante.....	69
Tabela 6. Caracterização do óleo de peixe comercial refinado OmegaPure.....	72
Tabela 7. Composição em ácidos graxos do óleo de peixe comercial refinado OmegaPure.....	73
Tabela 8. Teor de água dos substratos, solvente e surfactantes utilizados nas reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe. ....	75
Tabela 9. Composição em ácidos graxos <sup>1</sup> (%) do óleo de peixe OmegaPure e análise da regiodistribuição dos seus triacilgliceróis purificados.....	76
Tabela 10. Teor mássico (%) de di- e triacilgliceróis usando diferentes meios reacionais. ....	83
Tabela 11. Efeito do meio reacional sobre a atividade de esterificação específica (A.E. <sub>esp</sub> ) da Novozym <sup>®</sup> 435, expressa em U/mg de lipase imobilizada*.....	89
Tabela 12. Índice de peróxido do óleo de peixe original e do meio reacional após armazenagem sob temperatura de congelamento e atmosfera inerte durante um mês. ....	93
Tabela 13. Índice de peróxido do meio reacional em diferentes etapas do processo e analisado imediatamente após a evaporação dos solventes.....	95
Tabela 14. Matriz do planejamento experimental fracionado (valores reais e codificados) em termos de teor mássico (%) de di- e triacilgliceróis, em meio contendo <i>terc</i> -butanol.....	98
Tabela 15. Matriz do planejamento experimental fracionado (valores reais e codificados) em termos de teor mássico (%) de di-	

e triacilgliceróis, em meio contendo Tween 65 como surfactante de grau alimentício.....	98
Tabela 16. Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste <i>t</i> de Student para a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise com (a) <i>tert</i> -butanol e (b) Tween 65. $\alpha=0,05$ .....	99
Tabela 17. Fator de retenção ( $R_p$ ) de mono- di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres com o sistema hexano/éter etílico/ácido fórmico (65:35:1, v/v/v). .....	107
Tabela 18. Velocidade inicial específica ( $v_{i,esp}$ ) de formação de monoacilgliceróis e diacilgliceróis (mmol de MAG ou DAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) nas reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe.....	116
Tabela 19. Produtividade (P) em monoacilgliceróis e diacilgliceróis (mmol de MAG ou DAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) alcançada no equilíbrio das reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe.....	116
Tabela 20. Matriz do planejamento fatorial completo 2 <sup>3</sup> (níveis reais e codificados) e resultados para o teor mássico <sup>1</sup> (%) de monoacilgliceróis e diacilgliceróis obtidos após 24 horas de glicerólise enzimática de óleo de peixe.....	120
Tabela 21. Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste <i>t</i> de Student para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe. $\alpha=0,05$ .....	120
Tabela 22. Composição em ácidos graxos (%) dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis obtidos após 24 horas de reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe.....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácidos graxos livres
A/O	Emulsão água em óleo
$a_w$	Atividade de água
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCD-AD	Cromatografia em camada delgada de alto desempenho
CG	Cromatografia em fase gasosa
CL-EM	Cromatografia líquida – espectrometria de massa
DAG	Diacilgliceróis
DHA	Ácido docosaheptaenóico
[E]	Concentração de enzima (% , m/m, em relação ao total de substratos)
EEAG	Éster etílico de ácido graxo
EPA	Ácido eicosapentaenóico
G:O	Proporção molar de glicerol e óleo
BHL	Balanço hidrofílico-lipofílico
I.A.	Índice de acidez
I.P.	Índice de peróxido
I.S.	Índice de saponificação
$\log P$	Logaritmo do coeficiente de partição bifásico <i>n</i> -octanol/água
MAG	Monoacilgliceróis
MTBE	<i>tert</i> -metil butil éter
O/A	Emulsão óleo em água
$P_{MAG}$ , $P_{DAG}$	Produtividade em mono- e diacilgliceróis, no equilíbrio da reação
$R_f$	Fator de retenção
TAG	Triacilgliceróis
$V_{i,esp, MAG}$ , $V_{i,esp, DAG}$	Velocidade inicial específica de formação de mono- e diacilgliceróis





# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO.....	3
1.2 ESTRUTURA DA TESE.....	5
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
2.1 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS .....	7
2.2 ÓLEO DE PEIXE.....	8
2.3 ÓLEO DE SVELHA.....	11
2.4 GLICEROL .....	13
2.4.1 Glicerina produzida em reações de transesterificação.....	14
2.4.2 Purificação da glicerina proveniente da produção de biodiesel .....	16
2.5 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS .....	17
2.5.1 Monoacilgliceróis.....	19
2.5.2 Diacilgliceróis .....	20
2.6 MÉTODOS PARA A OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS .....	21
2.7 LIPASES COMO BIOCATALISADORES.....	27
2.7.1 Lipases de <i>Candida antarctica</i> .....	30
2.8 PATENTES PARA A PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	32
2.9 MEIOS REACIONAIS .....	34
2.9.1 Solvente orgânico.....	35
2.9.2 Surfactantes .....	38
2.9.2.1 Ação de lipases sobre surfactantes .....	40
2.10 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA PARA A OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS.....	42
2.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 MATERIAL.....	48
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DA ENZIMA.....	49
3.2.1 Índice de acidez.....	49
3.2.2 Índice de saponificação .....	50

3.2.3 Índice de peróxido .....	51
3.2.4 Densidade relativa .....	51
3.2.5 Determinação da viscosidade dos substratos .....	52
3.2.6 Composição em ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa ....	52
3.2.7 Análise posicional dos triacilgliceróis .....	53
3.2.8 Teor de água .....	54
3.2.9 Determinação da atividade de água ( $a_w$ ) da enzima .....	54
3.2.10 Determinação da atividade enzimática .....	55
3.3 AÇÃO DA NOVOZYM <sup>®</sup> 435 SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO .....	56
3.3.1 Protocolo experimental para as reações para verificar a ação da Novozym <sup>®</sup> 435 sobre os surfactantes.....	56
3.3.2 Análise qualitativa .....	57
3.3.3 Identificação de substâncias formadas durante as reações .....	58
3.4 REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS.....	58
3.4.1 Descrição do aparato experimental para as reações de glicerólise ....	58
3.4.2 Protocolo experimental para as reações de glicerólise .....	59
3.4.3 Acompanhamento qualitativo das reações de glicerólise .....	61
3.4.4 Determinação dos produtos de interesse .....	62
3.4.4.1 Produção de padrões de mono- e diacilgliceróis para análise por CCD-AD/Densitometria.....	64
3.4.5 Composição em ácidos graxos dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis .....	64
3.4.6 Condicionamento da Novozym <sup>®</sup> 435 pela temperatura.....	65
3.4.7 Ensaio preliminares.....	66
3.4.7.1 Meio reacional com surfactante .....	66
3.4.7.2 Meio reacional com solvente orgânico .....	66
3.4.7.3 Meio reacional livre de solvente orgânico e de surfactante .....	67
3.4.8 Planejamento experimental .....	67
3.4.9 Velocidade inicial de reação, produtividade e conversão.....	69
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS .....	72
4.1.1 Regiodistribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis do óleo de peixe.....	75

4.2 AÇÃO DA LIPASE NOVOZYM <sup>®</sup> 435 SOBRE SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO.....	77
4.3 REAÇÕES DE GLICERÓLISE EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS .....	81
4.3.1 Ensaio preliminares .....	81
4.3.1.1 Avaliação da atividade enzimática .....	88
4.3.1.2 Avaliação da recuperação da enzima após as reações.....	90
4.3.1.3 Avaliação do índice de peróxido .....	92
4.3.2 Reações em meio contendo <i>tert</i> -butanol e em meio contendo Tween 65.....	97
4.3.3 Reações de glicerólise enzimática em meio sem solvente e sem surfactante.....	106
4.3.3.1 Análise de mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres por cromatografia em camada delgada .....	106
4.3.3.2 Condicionamento da Novozym <sup>®</sup> 435 pela temperatura .....	111
4.3.3.3 Planejamento experimental .....	113
4.3.3.4 Composição em ácidos graxos dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis .....	126
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>129</b>
<b>6 SUGESTÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>135</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>163</b>
APÊNDICE A - GRÁFICOS DE PROBABILIDADE NORMAL E DE VALORES PREDITOS E OBSERVADOS.....	165
APÊNDICE B – QUANTIDADES DE PADRÕES APLICADAS NAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	167
APÊNDICE C - RESULTADOS DA ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA NOVOZYM <sup>®</sup> 435.....	171
APÊNDICE D – ARTIGO: ASSESSMENT OF PROCESS PARAMETERS ON THE PRODUCTION OF DIGLYCERIDES RICH IN OMEGA-3 FATTY ACIDS THROUGH THE ENZYMATIC GLYCEROLYSIS OF FISH OIL .....	172



# 1 INTRODUÇÃO

A relação entre as propriedades físico-químicas de óleos e gorduras e seus efeitos benéficos sobre a saúde tem incentivado a modificação destas matérias-primas (Goldberg, 1994). Muitas pesquisas têm sido aplicadas para a produção enzimática de novos ingredientes funcionais, tais como mono- e diacilgliceróis enriquecidos em ácidos graxos ômega-3 de interesse nutricional.

Os mono- e diacilgliceróis são moléculas não iônicas, com uma porção polar e outra apolar (Devi, Zhang *et al.*, 2008). Devido a estas características, estas moléculas, em especial os monoacilgliceróis, apresentam excelentes propriedades emulsificantes, sendo amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e química (Gunstone, 1999; Carvalho, Campos *et al.*, 2003). Na área da saúde, os diacilgliceróis são classificados como alimentos funcionais que auxiliam principalmente no combate a altas taxas de colesterol e triacilgliceróis, prevenindo e controlando a obesidade (Lo, Tan *et al.*, 2008).

Há um grande interesse na produção de mono- e diacilgliceróis ricos nos ácidos graxos ômega-3 eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6) de origem marinha, os quais encontram potencialidades para aplicação em alimentos funcionais, suplementos dietéticos e fármacos (Devi, Zhang *et al.*, 2008). A formulação de alimentos contendo estes emulsificantes pode elevar a ingestão de ácidos graxos ômega-3, essenciais na dieta, e que atuam na prevenção e no combate a doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios cerebrais (Kris-Etherton, Harris *et al.*, 2002; Hartvigsen, Mu *et al.*, 2003).

Os mono- e diacilgliceróis podem ser produzidos por alcoólise, esterificação ou hidrólise parcial de triacilgliceróis (Gunstone, 1999; Carvalho, Campos *et al.*, 2003). Industrialmente, estes acilgliceróis parciais são produzidos principalmente por glicerólise química (Devi, Zhang *et al.*, 2008), devido ao baixo custo dos catalisadores e aos curtos tempos de reação. Neste processo, a glicerina excedente derivada da produção de biodiesel pode ser submetida a etapas de purificação e aplicada como um substrato para a reação de glicerólise (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004).

Por se tratar de aditivos utilizados na indústria de alimentos, é indispensável que o produto obtido na reação, no caso os mono- e diacilgliceróis, apresentem alto grau de pureza. A produção destes acilgliceróis por rotas químicas resulta em produtos de coloração escura,

aroma indesejável e baixa pureza, o que requer etapa posterior de purificação (Ferreira-Dias, Correia *et al.*, 2001).

As principais vantagens da catálise enzimática, frente aos processos químicos tradicionalmente aplicados, são condições brandas do processo, maiores rendimentos, seletividade, obtenção de um produto de melhor qualidade e de maior pureza, e redução no custo do tratamento dos resíduos (Bornscheuer, 1995; Gunstone, 1999). A aplicação das lipases na forma imobilizada permite a fácil recuperação e reutilização destes biocatalisadores, reduzindo o custo do processo (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000; Osborn e Akoh, 2002).

Apesar do aumento crescente das pesquisas na área de transformação enzimática de óleos e gorduras, esta tecnologia ainda é pouco explorada em nível industrial (Xu, 2004).

Nas reações de glicerólise, o sistema obtido é constituído por uma fase oleosa hidrofóbica, uma fase glicérica hidrofílica e uma fase sólida constituída pela enzima. Um importante obstáculo a ser solucionado nestes sistemas, portanto, é a baixa miscibilidade do glicerol e do óleo (Pawongrat, Xu *et al.*, 2007). Durante as reações de glicerólise, os mono- e diacilgliceróis formados devem agir como emulsificantes das fases hidrofóbica e hidrofílica. Desta forma, a produção destes acilgliceróis parciais deve melhorar o contato entre os substratos durante a reação, favorecendo sua formação ao longo do tempo. Neste sentido, as reações de glicerólise poderiam ser conduzidas somente na presença dos triacilgliceróis e do glicerol, conforme já investigado na literatura (Torres, Lin *et al.*, 2002).

Uma alternativa para contornar a baixa miscibilidade do glicerol e do óleo é utilizar solventes com solubilidade compatível com os diferentes substratos utilizados, resultando em melhoria na transferência de massa, maior homogeneidade do sistema, menores tempos e maiores velocidades de reação. Nestes sistemas, álcoois terciários, como o *tert*-butanol, são amplamente empregados, já que oferecem bons rendimentos em curtos tempos de reação, principalmente em transformações mediadas pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, obtida de *Candida antarctica* fração B e imobilizada (Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003; Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Barouh, Piombo *et al.*, 2008). Deve-se levar em conta, entretanto, que o uso de solventes orgânicos apresenta inconvenientes tais como toxicidade, alto custo e necessidade de purificação dos produtos, o que onera o processo (Fiametti, Rovani *et al.*, 2009).

Uma estratégia bastante promissora para dispersar substratos imiscíveis é o emprego de surfactante como aditivo, molécula com

características anfipáticas, capaz de formar sistemas micelares. Em meio contendo apenas o glicerol e o óleo, a adição de surfactantes ao sistema, aliada a uma intensa agitação do meio reacional, proporciona o aumento da área de contato entre as diferentes fases presentes, garantindo um bom rendimento em mono- e diacilgliceróis, ao mesmo tempo em que se constitui em um processo “verde” e mais econômico (Bornscheuer, 1995). Este aumento de área interfacial é extremamente interessante na catálise enzimática, já que a formação do sítio de ligação durante a reação ocorre na interface entre o substrato e a enzima (Rousseau e Marangoni, 2002). A utilização de um surfactante de grau alimentício torna-se de fundamental importância quando se objetiva aplicar os mono- e diacilgliceróis na indústria alimentícia (Valério, 2009), embora seja uma estratégia pouco explorada na literatura.

Desta forma, buscou-se, no presente trabalho, o emprego de meios alternativos, livres de solvente orgânico, com o intuito de propor um processo simples, barato e atrativo, para a produção de mono- e diacilgliceróis. Três meios reacionais, para fins de comparação dos produtos obtidos, foram testados: meio contendo solvente orgânico; meio contendo surfactante de grau alimentício; meio livre de solvente orgânico e de surfactante.

## 1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO

Diante das considerações apresentadas anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo geral a produção de emulsificantes (monoacilgliceróis e diacilgliceróis) de interesse nutricional, a partir da glicerólise de óleo de peixe comercial refinado, obtido de savelha, utilizando-se diferentes meios reacionais, na presença da lipase comercial imobilizada Novozym<sup>®</sup> 435, de *Candida antarctica*, como biocatalisador.

Buscou-se a obtenção de um produto de qualidade, com aplicação potencial como ingrediente na indústria alimentícia, aliando as propriedades emulsificantes destes acilgliceróis com os benefícios nutricionais dos ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA. Para atingir tal objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Caracterizar o óleo de peixe quanto às suas propriedades físicas e químicas (índices de peróxido, saponificação, acidez, perfil de ácidos graxos, regiodistribuição, viscosidade, densidade);
- Avaliar se os surfactantes de grau alimentício (Tween 65, Tween 80 e Tween 85 e lecitina de soja) são modificados pela

- lipase Novozym<sup>®</sup> 435, em uma simulação de reação de glicerólise;
- Realizar reações preliminares para comparar a produção de diacilgliceróis em diferentes meios reacionais: meio contendo surfactante de grau alimentício (Tween 65, Tween 80, Tween 85, lecitina de soja), meio contendo *terc*-butanol, e meio contendo somente glicerol e óleo de peixe, que será chamado, daqui em diante, de meio livre de solvente (orgânico) e de surfactante;
  - Determinar a atividade enzimática antes e depois das reações preliminares;
  - Monitorar o índice de peróxido do meio reacional durante as reações preliminares de glicerólise enzimática, para verificar a ocorrência de oxidação do óleo de peixe;
  - Selecionar um surfactante de grau alimentício para a produção enzimática de diacilgliceróis mediante a glicerólise de óleo de peixe, em reator batelada;
  - Identificar os fatores significativos (temperatura do processo, proporção molar glicerol:óleo, concentração de enzima, concentração de surfactante ou quantidade de solvente orgânico) e as condições ideais para a produção de diacilgliceróis, empregando planejamento experimental, em meio contendo surfactante (Tween 65) e em meio contendo *terc*-butanol;
  - Estudar a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis mediante a glicerólise de óleo de peixe, em reator batelada, em meio livre de solvente e de surfactante;
  - Identificar os fatores significativos (temperatura do processo, proporção molar glicerol:óleo, concentração de enzima) e as condições reacionais ideais para a produção de mono- e diacilgliceróis, empregando planejamento experimental, em meio livre de solvente orgânico e de surfactante;
  - Avaliar a cinética da formação de mono- e diacilgliceróis durante a glicerólise enzimática, para o meio livre de solvente orgânico e de surfactante;
  - Determinar a composição em ácidos graxos das frações de acilgliceróis parciais, em meio livre de solvente orgânico e de surfactante.



## 1.2 ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho está estruturado em capítulos. No Capítulo 2, são apresentados aspectos gerais sobre a modificação enzimática de óleos e gorduras, com a abordagem das características das lipases. É apresentado levantamento acerca dos substratos utilizados em reações de glicerólise, a saber, glicerol e óleos de diferentes origens, com ênfase em óleo de peixe. São apresentados trabalhos sobre glicerólise enzimática relevantes à consecução desta proposta, com destaque para os meios e condições reacionais empregados nesta pesquisa. No Capítulo 3 são apresentados o material e os métodos que foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho. O item 4.1 apresenta a caracterização dos substratos. O item 4.2 apresenta os resultados obtidos para a ação da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 sobre os surfactantes de grau alimentício testados no presente trabalho. A seção 4.3 contém os resultados para as reações de glicerólise em diferentes meios reacionais, sendo que os resultados dos ensaios preliminares estão apresentados na seção 4.3.1. A avaliação dos sistemas na presença de surfactante e de *terc*-butanol estão abordadas na seção 4.3.2. No item 4.3.3 são apresentados os resultados para as reações de glicerólise enzimática em meio livre de solvente orgânico e de surfactante, para o qual foi feito um estudo mais aprofundado. O Capítulo 5 apresenta as conclusões desta pesquisa e, finalmente, o Capítulo 6 apresenta as sugestões para trabalhos futuros.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

No presente capítulo, são apresentados aspectos gerais das reações de modificação de óleos e gorduras, sendo abordadas as diferentes estratégias para a produção de mono- e diacilgliceróis. Especial ênfase é dada na apresentação de diferentes trabalhos sobre produção enzimática de mono- e diacilgliceróis por meio de reações de glicerólise, utilizando-se diferentes substratos e meios reacionais.

### **2.1 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS**

Sabe-se que a dieta apresenta um papel importante nas quatro principais classes de doenças da sociedade atual (doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão e obesidade) (Goldberg, 1994). Os óleos e as gorduras, constituídos principalmente por triacilgliceróis, são fundamentais para a alimentação humana. Os lipídios são uma importante fonte de energia na dieta, e atuam no transporte e na proteção das vitaminas lipossolúveis, e no fornecimento de ácidos graxos essenciais (Bailey, 1979; Pigott e Tucker, 1990; Turatti, 2000; HHS e USDA, 2005; ISEO, 2006). Os óleos e gorduras contribuem com várias características sensoriais dos alimentos, além de apresentarem um importante papel tecnológico (Bailey, 1979; Pigott e Tucker, 1990; ISEO, 2006).

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido focadas na modificação de óleos e gorduras para a obtenção de produtos que aliem propriedades funcionais e/ou de saúde, bem como propriedades tecnológicas que permitam sua utilização nas linhas de processamento (Xu, 2004; Feltes, Pitol *et al.*, 2009). Entre as técnicas existentes para a modificação destas matérias-primas, pode-se citar a mistura física de óleos e gorduras, a hidrogenação química, o fracionamento e as reações de interesterificação química ou enzimática (Willis, Lencki *et al.*, 1998; Xu, 2004).

Entre estas tecnologias de modificação, as reações de interesterificação merecem destaque, pois permitem a obtenção de lipídios específicos, construídos para apresentarem propriedades otimizadas em relação às moléculas originais (Osborn e Akoh, 2002; Xu, 2004). As reações de interesterificação mediadas por lipases têm sido objeto de muito estudo, devido a diversas vantagens da catálise enzimática frente à catálise química. Os produtos obtidos por biocatálise

têm aplicação potencial nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica (Gunstone, 1999; Shimada, 2006).

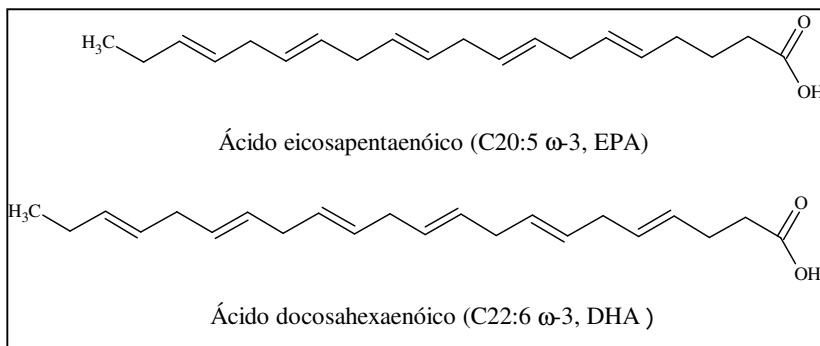
## 2.2 ÓLEO DE PEIXE

A captura total de peixes no ano de 2007 foi de 90 milhões de toneladas, sendo que os maiores produtores no período foram a China, o Peru, a Indonésia e os Estados Unidos (FAO, 2009a).

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no consumo de peixe no mundo todo, acompanhando um aumento no consumo total de alimentos. Em 2006, 110 milhões de toneladas de peixe estavam disponíveis para consumo humano. No ano mencionado, o consumo mundial médio foi de aproximadamente 16,7kg de peixe per capita, sendo que este consumo foi significativamente mais acentuado nos países mais desenvolvidos (FAO, 2009b).

Segundo recomendações do Governo Norte-Americano, é importante considerar não só a qualidade e a frequência, como também o tipo de alimento consumido, devendo-se privilegiar aqueles ricos nos ácidos ômega-3 eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6) (USDA, 2010), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1. Estes são os principais ácidos graxos poliinsaturados presentes na carne e no óleo de fígado de peixes (Turon, Rwabwogo *et al.*, 2005), principalmente sardinha, anchova, salmão e bacalhau (Stansby, 1990; Visentainer, Carvalho *et al.*, 2000; Feltes, 2006). É importante considerar que os peixes não são capazes de produzir ômega-3 e ômega-6, razão pela qual sua alimentação irá determinar a composição em ácidos graxos presente no seu organismo. Uma dieta rica em algas irá garantir um alto teor dos ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA nos tecidos do peixe (Lands, 2005).

As recomendações atuais (250-500mg/dia) para o consumo destes ácidos graxos ômega-3, também chamados n-3, representa duas a quatro porções por semana de peixes ricos nestes ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados (Harris, Mozaffarian *et al.*, 2009; USDA, 2010).



**Figura 1** – Estrutura química dos ácidos docosahexaenóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA).

Estas recomendações foram estabelecidas para assegurar uma proporção adequada de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 para um adulto saudável, de forma a garantir os efeitos biológicos e funcionais proporcionados por estas duas famílias de ácidos graxos. Acredita-se que a proporção de ômega-6/ômega-3 originalmente consumida na dieta humana era de aproximadamente 1. A agricultura moderna e a industrialização de alimentos provocaram o aumento desta proporção até 30:1, devido ao aumento na ingestão de ácidos graxos ômega-6 e à redução no consumo de ácidos graxos ômega-3 (Dunford, 2004; Simopoulos, 2004). Proporções de até 50:1, entretanto, já foram registradas na Índia (Pella, Dubnov *et al.*, 2003). Na dieta tradicional japonesa, esta proporção é de 4:1 (Dunford, 2004), devido ao consumo freqüente de ácidos graxos ômega-3. Mudanças no estilo de vida, entretanto, provocaram modificações na qualidade da gordura ingerida, inclusive entre japoneses, como decorrência, principalmente, da migração para outras regiões, como já registrado para japoneses residentes no Brasil (Sartorelli, Damião *et al.*, 2010).

Há um crescente interesse nestes ácidos graxos ômega-3 devido ao importante papel a eles atribuído na saúde (Vessby, 1994; Carvalho, Campos *et al.*, 2003). Ambos são importantes constituintes das membranas celulares e são essenciais para a função cerebral e para o crescimento (Gordon e Ratliff, 1992; Goldberg, 1994; Hartvigsen, Mu *et al.*, 2003; Lands, 2005). O EPA é precursor de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) da série 3 (Willis, Lencki *et al.*, 1998; Kris-Etherton, Harris *et al.*, 2002; Carvalho, Campos *et al.*, 2003), com propriedades antitrombóticas, antiquimiostáticas, antivasoconstritoras e antiinflamatórias (Goldberg, 1994). É evidente,

portanto, que a ingestão de alimentos ricos em EPA e DHA pode auxiliar no combate e prevenção de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, distúrbios cerebrais e câncer (Dunford, 2004; Lands, 2005). Devido a estes efeitos fisiológicos, os peixes têm sido considerados alimentos funcionais (Soccol e Oetterer, 2003; Brasil, 2005).

O EPA e o DHA não podem ser sintetizados por mamíferos ou são sintetizados em baixa quantidade, sendo, portanto, nutrientes essenciais, devendo ser providos pela dieta (Goldberg, 1994).

A deficiência de EPA e DHA na dieta, como decorrência do baixo consumo de peixes, pode ser suprida pela ingestão de óleo de peixe, ou ainda de suplementos ou alimentos enriquecidos com estes ácidos graxos da série ômega-3 (BNF, 2000; Kris-Etherton, Harris *et al.*, 2002).

Os óleos marinhos estão presentes na carne de peixes “gordos”, no fígado de peixes “magros” e na camada de gordura de mamíferos marinhos (Kulas, Olsen *et al.*, 2003). O método tradicional para a obtenção de óleo de peixe é conhecido como processo úmido, que envolve as etapas de cozimento, prensagem e centrifugação da matéria-prima (Lee, 1963; Lands, 2005). Após sua obtenção, o óleo bruto deve ser refinado para consumo humano (Lee, 1963; Hasselmann e Kummerlen, 1998), sendo reconhecido como *Generally recognized as Safe* (GRAS) pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (Lands, 2005).

Os óleos de peixe refinados e desodorizados consistem principalmente de triacilgliceróis com uma complexa composição em ácidos graxos (saturados, mono- e poliinsaturados) e alto teor de vitaminas, em especial a vitamina A (Aro, Tahvonon *et al.*, 2000; Kulas, Olsen *et al.*, 2003; Lands, 2005).

Os ácidos graxos poliinsaturados, apesar de contribuírem para a saúde, conferem baixa estabilidade oxidativa ao óleo de peixe (Pigott e Tucker, 1990; Kulas, Olsen *et al.*, 2003), sendo um parâmetro crítico para a vida-de-prateleira de óleos de peixe e de produtos alimentícios aos quais lipídios de origem marinha foram incorporados (Pigott e Tucker, 1990; Kulas, Olsen *et al.*, 2003).

À temperatura ambiente, as insaturações presentes nos ácidos graxos reagem prontamente com o oxigênio para a formação de hidroperóxidos, os quais são instáveis. Esta reação é acelerada a altas temperaturas e na presença de íons de metais de transição. Os hidroperóxidos decompõem-se a produtos secundários, muitos de baixa massa molecular, voláteis e com acentuadas propriedades olfativas, que

conferem o “flavor” característico e desagradável de óleo de peixe rançoso (Bockisch, 1993; Kulas, Olsen *et al.*, 2003). A ingestão de óleos marinhos degradados pode expor o consumidor aos produtos tóxicos resultantes do processo de oxidação dos lipídios (Shahidi e Shukla, 1996; Siqueira, Otterer *et al.*, 1997).

A concentração e o tipo dos antioxidantes adicionados ao óleo de peixe, bem como o processamento a que esta matéria-prima será submetida, serão determinantes para a manutenção da sua qualidade e dos produtos nos quais este óleo será utilizado como ingrediente (Pigott e Tucker, 1990; Wanasundara e Shahidi, 1998; Kulas, Olsen *et al.*, 2003).

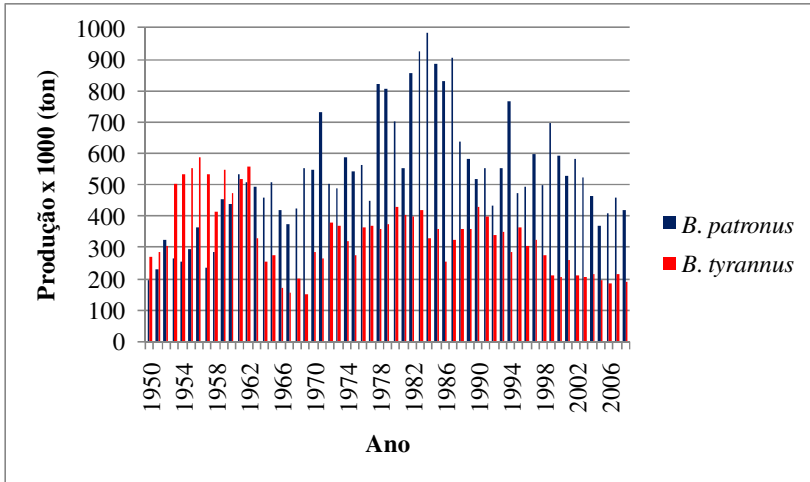
Entre as principais espécies de peixe utilizadas mundialmente para a obtenção de óleo, destaca-se a savelha, cujo óleo refinado, comercial, foi utilizado na presente pesquisa. No Brasil, o óleo de peixe produzido costuma ser destinado para alimentação animal. Neste país, o óleo é obtido principalmente a partir de resíduos do processamento de pescado, sendo que a principal espécie de peixe capturada neste país é a sardinha-verdadeira (Feltes, Correia *et al.*, 2010). Nesta região, não se tem conhecimento, até o presente momento, da existência de produção industrial de óleo de peixe para consumo humano.

É importante ressaltar que um aumento no consumo de alimentos de origem marinha requer estratégias eficazes e sustentáveis para garantir a disponibilidade de uma quantidade suficiente de matéria-prima rica em EPA e DHA contendo, ainda, um baixo teor de substâncias poluentes, como o metil mercúrio (USDA, 2010). Além disso, alguns dados apontam que, dentro de algumas décadas, há o risco de escassez de pescado no mundo, como decorrência de problemas como pesca predatória, poluição, mudanças climáticas e conseqüentes perturbações nos oceanos (Worm, Barbier *et al.*, 2006). Estes fatores podem estimular o desenvolvimento da produção de pescado por aquíicultura. O risco de suprimento de óleo de peixe também pode ser contornado mediante a utilização de fitoplânctons unicelulares e sementes marinhas como fontes alternativas de EPA e DHA (Gunstone, Harwood *et al.*, 1994).

### 2.3 ÓLEO DE SAVELHA

A savelha é um peixe pelágico que apresenta duas espécies de importância comercial. Uma delas é a *Brevoortia patronus*, conhecida como savelha do Golfo, típica da costa leste dos Estados Unidos e do

Golfo do México. A outra espécie é a *Brevoortia tyrannus*, também denominada savelha do Atlântico, presente na costa norte-americana do Atlântico (Whitehead, 1985). A produção mundial acumulada de savelha está apresentada na Figura 2.



**Figura 2** – Captura mundial de savelha (*Brevoortia patronus* e *Brevoortia tyrannus*) de 1950 a 2008.

**Fonte:** FAO Fishery Statistic (2010)

Na figura acima, percebe-se a redução da captura mundial de savelha ao longo dos últimos anos, comportamento já verificado para a captura global de pescado (Worm, Barbier *et al.*, 2006).

A savelha (*Brevoortia* spp.) fornece em média 10,6g lipídios/100g de parte comestível (IBGE, 1999). A produção de óleo de peixe, nos Estados Unidos, é proveniente principalmente da espécie *B. tyrannus* (Whitehead, 1985). O óleo proveniente da savelha, reconhecido como GRAS pelo FDA (2010b), caracteriza-se pelo alto teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (Allen, 1995). Sua composição típica está apresentada na Tabela 1.

Em 2008, o óleo de peixe foi comercializado por US\$ 1.700,00/ton, sendo que 85% da produção deste período foi direcionada para a aquicultura (FAO, 2009b). A utilização de óleo de peixe para a construção de mono- e diacilgliceróis poderá valorizar esta matéria-prima, provendo os ácidos graxos essenciais EPA e DHA na dieta, com seus respectivos benefícios fisiológicos (Robles Medina, Esteban



Cerdán *et al.*, 1999; Torres, Lin *et al.*, 2002; Pfeffer, Freund *et al.*, 2007).

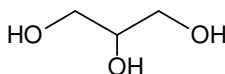
**Tabela 1.** Teor típico dos principais ácidos graxos presentes no óleo de savelha.

Ácido graxo	Teor aproximado (% em relação ao total de ácidos graxos)
C14:0	9%
C16:0	20%
C16:1	12%
C18:1	11%
C20:1	1%
C22:1	0,2%
C20:5 (EPA)	14%
C22:6 (DHA)	8%

Fonte: Allen (1995).

## 2.4 GLICEROL

O glicerol é um álcool trihidroxilado, cuja estrutura é apresentada na Figura 3. À temperatura ambiente de 25°C, encontra-se no estado líquido. É um composto higroscópico, inodoro, viscoso, com sabor adocicado. Encontra-se presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal esterificado a ácidos graxos, formando moléculas de triacilgliceróis (Iupac, 1993).



**Figura 3** – Estrutura química do glicerol.

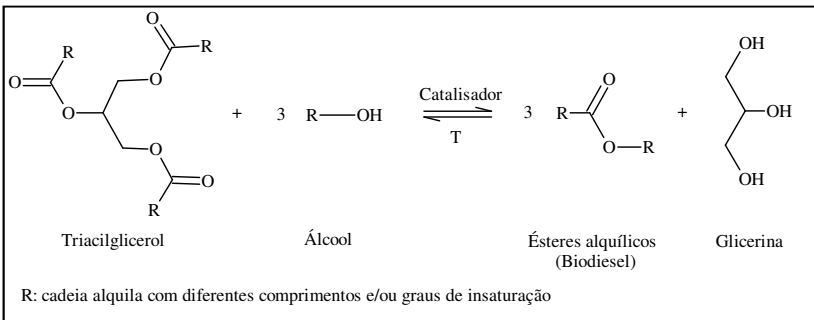
Comercialmente, o glicerol é gerado no processo de manufatura de sabões ou durante a síntese do propeno. O termo glicerol refere-se ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. É uma matéria-prima bastante versátil, utilizada tradicionalmente nas indústrias de cosméticos, sabões, fármacos e alimentos (Mota, Silva *et al.*, 2009).

O glicerol pode ser utilizado como intermediário na obtenção de uma vasta gama de substâncias usadas na indústria (Van Gerpen, Shanks

*et al.*, 2004; Corma, Iborra *et al.*, 2007). Pode ser aplicado como agente anticongelante ou em extintores de incêndio, em substituição ao propilenoglicol; como umectante ou edulcorante em alimentos, em substituição ao sorbitol. Pode ser aplicado como substrato para a obtenção poliglicerol e seus ésteres, polipropilenoglicol, dihidroxiacetona, ácido hidroxipirúvico, ácido glicérico, carbonato de glicerol e seus ésteres, glicidol, glicerol formal, ésteres de glicerol (mono- e diacilgliceróis) (Corma, Iborra *et al.*, 2007).

### 2.4.1 Glicerina produzida em reações de transesterificação

Na produção de biodiesel por transesterificação de triacilgliceróis com metanol ou etanol, cuja reação está apresentada na Figura 4, a glicerina é gerada em uma quantidade que corresponde a cerca de 10 a 12% (m/m) em relação à massa de matéria-prima processada (Dasari, Kiatsimkul *et al.*, 2005). Devido à forte expansão que se verifica na indústria de biodiesel, prevê-se que a produção mundial de glicerina alcançará 1,2 milhões de toneladas no ano de 2012 (Mota, Silva *et al.*, 2009).



**Figura 4** – Reação global de transesterificação para a produção de ésteres alquílicos (biodiesel).

No Brasil, a Lei 11.097/2005 introduziu o biodiesel na matriz energética, estabelecendo metas para a adição deste biocombustível ao diesel de petróleo (ANP, 2005). Resoluções posteriores determinaram a obrigatoriedade do uso de misturas com quantidade crescente de biodiesel ao diesel. Recentemente, em janeiro de 2010, a mistura B5 passou a ser obrigatória, conforme estipulado pela Resolução CNPE 6/2009 (CNPE, 2009).

Com a implementação da mistura B5, prevê-se que a produção anual brasileira atinja 2,5 bilhões de litros de biodiesel, paralelamente à geração de uma quantidade expressiva de glicerina, de cerca de 250 mil toneladas por ano (ANP, 2010).

No momento, o mercado não é capaz de absorver a quantidade excedente de glicerina bruta para as aplicações industriais tradicionalmente existentes (Johnson e Taconi, 2007), que atualmente consomem, no Brasil, cerca de 30 mil toneladas por ano (Mota, Silva *et al.*, 2009). Desta forma, torna-se imperativa a busca por alternativas para o aproveitamento desta glicerina excedente.

A produção de glicerina em excesso, em virtude da crescente produção de biodiesel, tem provocado a queda drástica no seu preço (Yazdani e Gonzalez, 2007), tornando-a competitiva para utilização nas mais diversas indústrias (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Corma, Iborra *et al.*, 2007). Além disso, a busca por alternativas para o aproveitamento da glicerina assim obtida enquadra-se no contexto de tecnologias limpas e proporciona a agregação de valor a este poliálcool, permitindo o desenvolvimento sustentável do setor de biocombustíveis e a viabilidade econômica das plantas processadoras de biodiesel (Oppe, Salvagnini *et al.*, 2007).

Embora a glicerina possa ser utilizada como combustível (Fernando, Adhikari *et al.*, 2007) e como suplemento em alimentação animal, tais produtos apresentam um baixo valor de mercado (Johnson e Taconi, 2007).

A busca de rotas alternativas para o aproveitamento da glicerina envolve sua conversão por meio de processos biológicos ou químicos, para a obtenção de substâncias de maior valor agregado (Johnson e Taconi, 2007; Yazdani e Gonzalez, 2007) como por exemplo ácido docosahexaenóico (Ethier, Woisard *et al.*, 2011), polihidroxicanoatos (Koller, Bona *et al.*, 2005), hidrogênio e etanol (Ito, Nakashimada *et al.*, 2005; Adhikari, Fernando *et al.*, 2007), 1,3-propanodiol (González-Pajuelo, Meynial-Salles *et al.*, 2005) e ácido cítrico (Papanikolau e Aggelis, 2003).

No que diz respeito à conversão do glicerol através de processos catalíticos, cabe mencionar a possibilidade de sua utilização como substrato para a produção de mono- e diacilgliceróis, biomoléculas de alto valor agregado, amplamente utilizadas como emulsificantes em diversas indústrias, especialmente alimentícia (Noureddini e Medikonduru, 1997; Langone e Sant'anna, 2002; Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003; Esmelindro, Fiametti *et al.*, 2008; Moquin e Temelli, 2008).

É importante salientar, entretanto, que a glicerina obtida como co-produto na produção de biodiesel, em especial quando proveniente de catálise básica, apresenta diversas impurezas (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Hájek e Skopal, 2010).

#### 2.4.2 Purificação da glicerina proveniente da produção de biodiesel

A produção industrial de biodiesel tem sido feita principalmente por transesterificação química (Bournay, Casanave *et al.*, 2005). A glicerina recuperada nesta reação geralmente contém resíduos de álcool, catalisador, óleo ou gordura remanescente, alguns ésteres, sabões, sais e água (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Hájek e Skopal, 2010).

Devido às impurezas, a glicerina bruta obtida na produção de biodiesel apresenta custo reduzido (Oleoline, 2005; Yazdani e Gonzalez, 2007). Entre as gliceras disponíveis comercialmente, a glicerina purificada grau USP (*United States Pharmacopeia*), incolor, apresenta no mínimo 99% de glicerol (USP, 2009), e atende os requisitos necessários para usos culinário, farmacêutico e cosmético (Ooi, Yong *et al.*, 2004). É reconhecida como GRAS pelo FDA (2010c).

Comercialmente, a purificação da glicerina pode ser feita por processo convencional ou por troca iônica (Gerpen, 2005; Oppe, Salvagnini *et al.*, 2007).

O processo convencional consiste basicamente na neutralização da fase glicérica e tratamento com sulfato de alumínio ou cloreto férrico, seguido de evaporação, destilação a vácuo, desodorização, branqueamento e, por fim, filtração e armazenagem do produto. Apesar de ser um processo já estabelecido, é uma operação cara e de alto consumo energético (Bailey, 1961; Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Bournay, Casanave *et al.*, 2005; Slinn, Kendall *et al.*, 2008).

No processo com troca iônica, a etapa de destilação, aplicada no processo convencional, é substituída pela passagem do material filtrado por sucessivos leitos de resinas trocadoras de íons. A solução purificada é então submetida à evaporação a vácuo, e, por fim, realizam-se as etapas de remoção do odor e da cor do material (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004; Gervajio, 2005). É uma alternativa atrativa para o tratamento da glicerina bruta para plantas de menor capacidade (Van Gerpen, Shanks *et al.*, 2004).

Nos dois casos, o processo completo de refino permite a obtenção de glicerina com pureza de até 99,5%, límpida e transparente (Majer, Mueller-Langer *et al.*, 2009). O valor de mercado que se pode obter pela

glicerina é diretamente proporcional à sua qualidade, o que depende, por sua vez, das etapas de refino a que foi submetida. Segundo a literatura, o custo do refino da glicerina bruta é de aproximadamente US\$0,33/kg (Johnson e Taconi, 2007). Devido à queda no preço da glicerina bruta, observou-se uma redução acentuada no preço das glicerinadas refinadas, como no caso da glicerina 99,7% Kosher, que atingiu, em dezembro de 2005, 35% do valor praticado dez anos antes nos Estados Unidos (Oleoline, 2005). No Brasil, em abril de 2009, a glicerina bruta estava sendo comercializada a R\$50,00/ton, enquanto a glicerina bi-distilada USP de origem animal estava sendo comercializada a R\$1.100,00/ton (Aboissa, 2009).

Outros processos para a purificação da glicerina estão sendo investigados, de maneira a tornar esta etapa economicamente viável para a cadeia de produção de biodiesel (Hájek e Skopal, 2010). Paralelamente, tem sido feita a investigação de processos mais limpos para a produção de biodiesel, mediante o uso de catalisadores heterogêneos, químicos (Bournay, Casanave *et al.*, 2005) ou enzimáticos (Adamczak, Bornscheuer *et al.*, 2009), que permitem a obtenção de ésteres e de glicerina com maior grau de pureza.

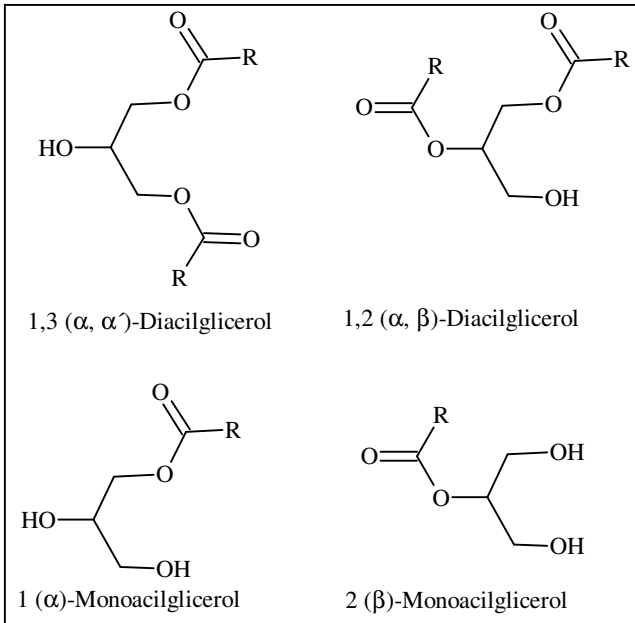
Apesar da viabilidade técnica para a purificação da glicerina obtida como co-produto na obtenção de biodiesel, e embora haja indicações da possibilidade de utilizar esta matéria-prima como substrato para a produção de mono- e diacilgliceróis (Freitas, Da Rós *et al.*, 2009), é importante avaliar a relação custo-benefício do processamento prévio daquele poliálcool.

## 2.5 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS

Os mono- e diacilgliceróis são mono- e diésteres de ácidos graxos e glicerol, que ocorrem em pequenas quantidades em óleos e gorduras de origem animal e vegetal (ISEO, 2006). Suas estruturas e formas isoméricas estão apresentadas na Figura 5. Geralmente, os emulsificantes mono- e diacilgliceróis são comercializados na forma de uma mistura, que contém principalmente mono- e/ou diésteres de glicerol, em conjunto com quantidades menores de triésteres. Esta mistura costuma apresentar pelo menos 90% de acilgliceróis (FDA, 2008a).

Devido à sua composição, os mono- e diacilgliceróis são classificados como surfactantes não iônicos. São amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, por não

apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (Ferreira-Dias, Correia *et al.*, 2001; Freitas, Bueno *et al.*, 2008). São responsáveis por cerca de 75% da produção mundial de emulsificantes para fins alimentícios (Krog, 1997; Ferreira-Dias, Correia *et al.*, 2001). Tanto os mono- quanto os diacilgliceróis podem ser utilizados como aditivos em alimentos para consumo humano, sendo reconhecidos como GRAS (FDA, 2008a).



**Figura 5** – Estrutura química e formas isoméricas de monoacylgliceróis e diacylgliceróis.

Mono- e diacylgliceróis, em especial 1,3-diacilgliceróis, contendo EPA e DHA, podem ter efeitos positivos na saúde como, por exemplo, na prevenção de doenças cardiovasculares e como mensageiros intracelulares, o que torna sua obtenção de especial interesse para aplicações farmacêuticas (Bornscheuer, 1995; Torres, Lin *et al.*, 2002).

### 2.5.1 Monoacilgliceróis

Os monoacilgliceróis são os compostos mais polares entre os lipídios simples. Do ponto de vista nutricional, os monoacilgliceróis podem ser considerados semelhantes aos triacilgliceróis. Sua digestão é completa e não são estabelecidas restrições quanto à sua ingestão diária (Grompone, 2011). Os monoacilgliceróis devem preferencialmente apresentar um alto grau de pureza (Xu, 2004) para aplicação na indústria alimentícia, uma vez que passam a apresentar propriedades emulsificantes melhores do que uma mistura de diferentes acilgliceróis (Bornscheuer, 1995).

São amplamente utilizados em produtos de panificação, margarinas, produtos lácteos e confeitaria, devido às suas propriedades emulsificantes, estabilizantes e condicionantes (Bornscheuer, 1995; Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). São principalmente utilizados como emulsificantes, sendo que uma quantidade de 0,5%, em massa, costuma ser suficiente para se obter uma emulsão estável (Xu, 2004).

Os monoacilgliceróis costumam ser usados como emulsificantes e estabilizantes em *spreads* ou sorvetes. Podem ser usados em pães para reforçar a estrutura do glúten e prolongar o frescor do produto. Podem ser aplicados em clarificadores de bebidas para facilitar a dispersão. Em massas, permitem a obtenção de uma massa mais firme e menos pegajosa durante o cozimento. Os monoacilgliceróis também são usados em medicamentos, nos quais facilitam a liberação controlada do ingrediente ativo (Xu, 2004).

Há também o interesse na produção de monoacilgliceróis, mediante alcoólise de triacilgliceróis, para posterior uso como substrato em reação de esterificação para a obtenção de triacilgliceróis estruturados, conforme já investigado na literatura (Schmid, Bornscheuer *et al.*, 1998; Irimescu, Iwasaki *et al.*, 2002; Pfeffer, Freund *et al.*, 2007).

Monoacilgliceróis contendo ácido oléico apresentaram efeito antioxidante, antidiabético e antiaterogênico, *in vitro* e em células, em estudo conduzido por Cho, Hong *et al.* (2010). Estes acilgliceróis inibem o aumento no nível de triacilgliceróis sanguíneos após as refeições, conforme descrito na patente JP A-1993-310567, mencionada por Takeno, Shimotoyodome *et al.* (2009). Estes autores comprovaram que monoacilgliceróis, tanto *sn*-1(3) quanto *sn*-2, inibem o aumento excessivo do nível de insulina sanguínea após a ingestão de alimentos, mantendo-se sob controle e, conseqüentemente, prevenindo a obesidade e a diabetes (hiperglicemia) (Patente US 2009/0124691 A1).

### 2.5.2 Diacilgliceróis

O interesse na produção industrial de diacilgliceróis é mais recente do que no caso dos monoacilgliceróis (Xu, 2004). Os diacilgliceróis são componentes naturais de vários óleos comestíveis, como por exemplo azeite de oliva e óleo de algodão, nos quais estão presentes em quantidades que não excedem 10% (Takase, 2007). Atualmente também são utilizados em alimentos como emulsificantes, principalmente devido a seu impacto benéfico sobre a saúde. Os diacilgliceróis utilizados como surfactantes normalmente são comercializados na forma de 1,3-diacilgliceróis, mais estáveis do que a sua forma isomérica (1,2-diacilgliceróis) (Lo, Tan *et al.*, 2008).

O valor calórico e os coeficientes de absorção dos diacilgliceróis e dos triacilgliceróis são similares (Taguchi, Nagao *et al.*, 2001). Ao contrário dos triacilgliceróis, os diacilgliceróis, em especial os 1,3-diacilgliceróis (Matsuo e Tokimitsu, 2001), atuam no combate a altas taxas de colesterol e triacilgliceróis, na prevenção da obesidade (Eom, Kong *et al.*, 2010), e na prevenção e redução do acúmulo de gordura no corpo (Matsuo e Tokimitsu, 2001; Taguchi, Nagao *et al.*, 2001; Meng, Zou *et al.*, 2004). Os diacilgliceróis são, portanto, benéficos para a redução das doenças relacionadas a estes fatores de risco, como doenças coronarianas, diabetes mellitus, hipertensão e alguns tipos de câncer (Matsuo e Tokimitsu, 2001).

As diferenças fisiológicas observadas entre os diacilgliceróis e os triacilgliceróis são decorrentes das rotas metabólicas que estes acilgliceróis seguem, depois da sua absorção nas células epiteliais gastrointestinais. Durante a digestão, os triacilgliceróis normalmente são hidrolisados a 2-monoacilgliceróis, sob ação da lipase pancreática. São, então, reesterificados a 1,2(2,3)-diacilgliceróis, e então a triacilgliceróis, sendo finalmente acumulados no organismo. Esta é a principal rota metabólica para a produção de triacilgliceróis (Matsuo e Tokimitsu, 2001).

Já os diacilgliceróis consumidos, normalmente na forma de 1,3-diacilgliceróis, são hidrolisados a 1(3)-monoacilgliceróis, os quais apresentam uma baixa reatividade como substratos para as enzimas responsáveis pela reesterificação a triacilgliceróis. Sendo assim, estes monoacilgliceróis são submetidos a nova hidrólise, gerando ácidos graxos livres e glicerol. Ambos são substratos na rota do glicerol 3-fosfato, sendo novamente reesterificados a 1,3-diacilgliceróis (Lo, Tan *et al.*, 2008). Devido a esta rota metabólica, a ingestão destes diacilgliceróis resulta no aumento dos ácidos graxos livres presentes na



veia porta, acompanhado por uma redução na atividade enzimática de síntese de ácidos graxos no fígado e pelo aumento na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Matsuo e Tokimitsu, 2001). Supõe-se que o aumento na  $\beta$ -oxidação, observado durante o metabolismo dos 1,3-diacilgliceróis, seja responsável pela redução na gordura corporal e nos níveis de triacilgliceróis séricos (Lo, Tan *et al.*, 2008).

Alimentos (*muffins*, *crackers*, sopa, *cookies*, barras de granola) contendo diacilgliceróis foram administrados a pacientes com sobrepeso ou obesos, e os resultados indicaram que a dieta promoveu a redução no peso e na gordura corporal (Maki, Davidson *et al.*, 2002).

Apesar das evidências científicas sobre o efeito fisiológico benéfico dos diacilgliceróis, há pesquisas que não indicam redução no peso corporal mediante a ingestão de dieta rica em diacilgliceróis, quando comparada com uma alimentação rica em triacilgliceróis (Nielsen, Göttsche *et al.*, 2005).

Os diacilgliceróis encontram diversas aplicações. Podem ser comercializados como óleo rico em diacilgliceróis, apresentando um benefício fisiológico específico (Lo, Tan *et al.*, 2008). No Japão, óleos para cozinha contendo no mínimo 80% (m/m) de diacilgliceróis são classificados desde 1999 como “Alimentos específicos para a saúde” (Matsuo, 2004; Morita, Knapp *et al.*, 2008). É o caso do *Econa Healthy Cooking Oil*, comercializado pela ADM/Kao Group do Japão. Os diacilgliceróis encontram aplicação em emulsões O/A, como maioneses e molhos para saladas, em emulsões A/O, como margarina, *spreads*, recheios cremosos e produtos de confeitaria, em *shortenings*, em produtos fritos (batatas fritas, bolos fritos, *doughnuts*), em coberturas para sorvetes (Lo, Tan *et al.*, 2008). Também foram desenvolvidos óleos ricos em diacilgliceróis com alto teor de ácidos graxos insaturados, acrescidos de fitoesteróis. Esta mistura, capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo e do triacilglicerol sérico, foi patenteada por Platt, Pelled *et al.* (2006).

## 2.6 MÉTODOS PARA A OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS

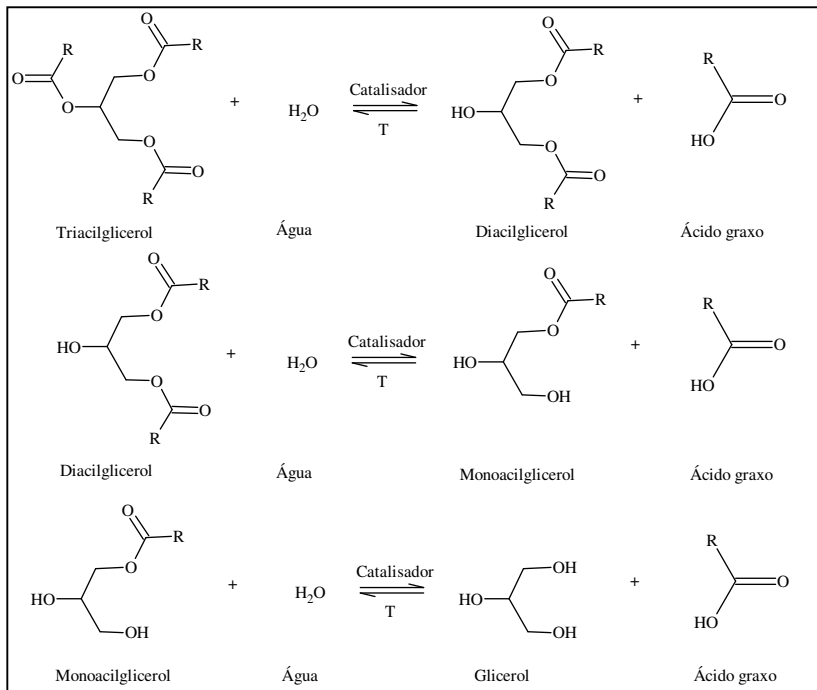
Os mono- e diacilgliceróis podem ser produzidos por hidrólise parcial de triacilgliceróis, esterificação direta do glicerol com ácidos graxos ou alcoólise. Entre as reações de alcoólise, destaca-se a glicerólise (Bornscheuer, 1995; Gunstone, 1999; Carvalho, Campos *et*

*al.*, 2003; Grompone, 2011). Em todos os casos, costuma-se utilizar catalisadores químicos homogêneos nos processos comerciais (Corma, Iborra *et al.*, 2007).

A hidrólise de óleos e gorduras pode ser utilizada para a obtenção de mono- e diacilgliceróis (Figura 6). O controle da reação de hidrólise é difícil (Grompone, 2011) e apresenta o inconveniente de gerar baixas concentrações de monoacilgliceróis, pois, além da possibilidade de ocorrer hidrólise total do substrato, cada mol do substrato é capaz de gerar somente um mol de monoacilgliceróis para dois mols de ácidos graxos livres, mesmo em condições ideais. Além disso, pode ocorrer migração acila durante a reação, isto é, a troca do ácido graxo da posição 2 para a posição 1(3) do glicerol (Bornscheuer, 1995). Caso necessário, esta migração pode ser minimizada mediante o controle do processo, utilizando-se, por exemplo, uma temperatura baixa. Este controle é difícil, pois os 1(3)-monoacilgliceróis são termodinamicamente mais estáveis do que os 2-monoacilgliceróis (Xu, 2004).

A esterificação do glicerol com ácidos graxos na forma livre constitui-se em outra estratégia para a formação de mono- e diacilgliceróis. Esta reação está representada na figura abaixo, considerando-se que a hidrólise dos acilgliceróis é uma reação reversível (Grompone, 2011). Esta reação geralmente ocorre na presença de um catalisador ácido, sob temperaturas mais baixas do que as aplicadas nas reações de glicerólise (Corma, Iborra *et al.*, 2007). Nestas reações, também podem-se utilizar lipases como catalisadores ou ainda resinas de troca catiônica, economicamente mais vantajosas, conforme discutido por Lo, Tan *et al.* (2008). Alternativamente, a esterificação pode ser feita sem catalisador, na presença de solventes polares de grau alimentício (lactato de metila ou ácido láctico), sob altas temperaturas (130 a 150°C) (Thengumpillil, Penumarthy *et al.*, 2002).

Um substrato alternativo e de baixo custo para estas reações são os ácidos graxos livres provenientes de destilados produzidos no processo de desodorização de óleos comestíveis, conforme sugerido na patente PI 20014817 publicada na Malásia por Lo e Baharin (2001), citados por Lo, Tan *et al.* (2008). Esta matéria-prima permite a redução do custo do produto final, e sua utilização como substrato em reações de esterificação permite sua valorização (Tangkam, Weber *et al.*, 2008).



**Figura 6** – Esquema das reações de hidrólise de triacilgliceróis (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa).

Nesta figura estão representados os isômeros termodinamicamente mais estáveis dos mono- e diacilgliceróis. Adaptado de Castro, Mendes *et al.* (2004).

Nas reações de esterificação, a formação de água pode interferir no equilíbrio da reação e causar migração acila, afetando, portanto, o rendimento do processo. Algumas alternativas para contornar estes problemas e maximizar a conversão dos substratos aos produtos de interesse são o uso de peneiras moleculares (Arcos, Otero *et al.*, 1998) ou a aplicação de vácuo durante a reação (Watanabe, Yamauchi-Sato *et al.*, 2004; Wongsakul, H-Kittikun *et al.*, 2004).

Uma outra maneira de preparar acilgliceróis parciais é mediante a abertura do anel do glicidol por ácidos graxos, catalisada por tetrapropilato de titânio, trietilamina, cloreto de benziltrimetilamônia, carbonato de potássio, carbonato de sódio, acetato de potássio ou sódio e seus hidratos. Apesar da alta seletividade para a obtenção de

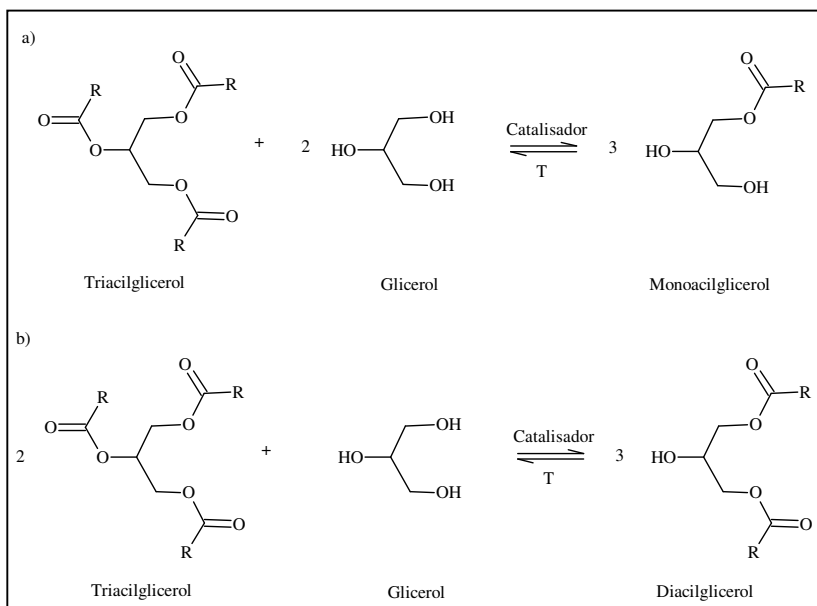
monoacilgliceróis, o custo do glicidol é alto em relação ao do glicerol, onerando o produto final (Corma, Iborra *et al.*, 2007).

As reações de alcoólise também são aplicadas para a obtenção de mono- e diacilgliceróis. Um tipo de alcoólise que pode ser empregada para a obtenção destes acilgliceróis parciais é a etanólise, na qual o etanol atua como solvente e como substrato (Koblitz, 2003). Esta reação corresponde às etapas intermediárias da reação global do esquema mostrado na Figura 4. Na etanólise, entretanto, há a produção de ésteres etílicos dos ácidos graxos utilizados como substrato, os quais compõem os co-produtos da reação, fato que não ocorre na glicerólise (Torres, Lin *et al.*, 2002).

Entre todas as formas possíveis de se obter monoacilgliceróis, a glicerólise é a reação que oferece o maior rendimento teórico, uma vez que cada mol de triacilglicerol usado como substrato pode gerar três mols de monoacilgliceróis, na presença de excesso de glicerol. Quando não há excesso de glicerol no meio, a reação é direcionada para a obtenção de diacilgliceróis (Bornscheuer, 1995). As reações de glicerólise estão representadas na Figura 7.

Os monoacilgliceróis são obtidos, em escala industrial, principalmente mediante reação de glicerólise contínua de óleos ou gorduras, com o uso de catalisadores inorgânicos alcalinos (NaOH ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), a altas temperaturas (220-260°C), de preferência sob atmosfera inerte. No equilíbrio, a mistura pode apresentar um teor de monoacilgliceróis variando de 10 a 60%, dependendo da proporção glicerol:óleo presente na mistura reacional. A glicerólise comercial geralmente proporciona uma distribuição de mono-, di- e triacilgliceróis de 45-55, 38-45 e 8-12%, respectivamente (Krog, 1997; Damstrup, Jensen *et al.*, 2005).

Uma rota interessante para a obtenção de mono- e diacilgliceróis é a reação do glicerol com ésteres metílicos de ácidos graxos, que apresenta vantagens sobre o uso direto do óleo ou gordura (Corma, Iborra *et al.*, 2007). Os ésteres, preparados por meio de reações de metanólise do óleo, são mais facilmente purificados e são menos corrosivos do que a matéria-prima original (óleo). Adicionalmente, segundo os autores, os ésteres metílicos seriam menos hidrofóbicos do que o óleo, exibindo, assim, uma miscibilidade maior no glicerol. A reação dos ésteres metílicos com o glicerol, portanto, pode ser conduzida a temperaturas inferiores (120-230°C) do que no caso da glicerólise de óleos (260°C) (Corma, Iborra *et al.*, 2007). Um processo de glicerólise química de ésteres metílicos foi publicado na patente US 6127561 (Jeromin, Wozny *et al.*, 2000).



**Figura 7** – Esquema da reação global de glicérolise para a produção de a) monoacilgliceróis e b) diacilgliceróis.

**Fonte:** Adaptado de Grompone (2011).

Para maximizar o rendimento em monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis e, paralelamente, separar os produtos de interesse, pode-se recorrer à glicérolise em fase sólida. Sabe-se que o ponto de fusão aumenta, de uma forma geral, na seqüência tri-, di- e monoacilgliceróis (Bockisch, 1993; Grompone, 2011) e diminui com o aumento das insaturações presentes nos ácidos graxos que formam os acilgliceróis (Bockisch, 1993; Pawongrat, Xu *et al.*, 2008), conforme indicado na Tabela 2. Sendo assim, ao final da reação, pode-se realizar o resfriamento do meio reacional. Isto faz com que os lipídios que apresentam o ponto de fusão mais alto sofram cristalização preferencial, resultando em uma fase sólida. A separação desta fração permite a retirada dos mono- e diacilgliceróis obtidos, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formação destes produtos (Yang, Fruekilde *et al.*, 2003; Pawongrat, Xu *et al.*, 2008). Deve-se considerar, entretanto, que este processo pode ser não viável economicamente em larga escala, conforme discutido por Lo, Tan *et al.* (2008).

**Tabela 2.** Pontos de fusão (°C) de alguns ácidos graxos e de seus mono-, di- e triacilgliceróis simples.

Ácido graxo	Ácido livre	TAG	1,3-DAG	1,2(2,3)-DAG	1(3)-MAG	2-MAG
Mirístico	54,4°C	57,0°C	65,5°C	55,5°C	70,5°C	61,2°C
Palmitico	62,9°C	65,5°C	72,5°C	62,8°C	77,0°C	69,0°C
Oléico	16,3°C	5,5°C	21,5°C	n.i.	35,2°C	23,5°C
Linolênico	- 12,8°C	-24,2°C	-12,3°C	n.i.	15,7°C	n.i.

n.i.: não informado. Fontes: Bailey (1961) e Bockisch (1993).

Depois das reações, é necessário realizar a desodorização dos produtos, o que é feito a temperaturas normalmente superiores a 150°C (Xu, 2004).

Apesar de ser um processo caro, a destilação molecular é geralmente aplicada para a purificação da mistura, de maneira a se obter o produto de interesse (monoacilgliceróis ou diacilgliceróis). Consiste em um processo de destilação apropriado para a separação e purificação de substâncias termicamente sensíveis, assim como de líquidos com baixa pressão de vapor (Micov, Lutišan *et al.*, 1997). Com esta técnica, é possível obter monoacilgliceróis com pureza de cerca de 80% até mais de 90% (Corma, Iborra *et al.*, 2007; Fregolente, Pinto *et al.*, 2010; Wang, Zhao *et al.*, 2010a).

Embora a glicerólise química seja um processo conhecido e bem estabelecido (Xu, 2004), o uso de catalisadores homogêneos exige uma etapa de neutralização, que implica na formação de sabões e outros resíduos, como sais (Corma, Iborra *et al.*, 2007). O produto obtido apresenta inconvenientes, como baixo rendimento, cor escura e sabor queimado (Bornscheuer, 1995). O processo químico não é adequado para a obtenção de acilgliceróis parciais contendo ácidos graxos poliinsaturados, já que as altas temperaturas aplicadas na reação prejudicam estes ácidos graxos, os quais são sensíveis ao calor (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). Uma opção é realizar a glicerólise química sob baixas temperaturas, com irradiação ultrassônica de baixa frequência, com a possibilidade de introdução de solventes no meio reacional, segundo investigado por Zhong, Li *et al.* (2010).

Outros processos para a produção de mono- e diacilgliceróis têm sido pesquisados. Uma alternativa para a produção destes emulsificantes é o desenvolvimento de catalisadores sólidos heterogêneos, tais como

zeólitas, ácidos sulfônicos mesoporosos, tetrapropilato de titânio, sílicas funcionalizadas, resinas aniônicas, catalisadores sólidos básicos como MgO, isoladamente ou em conjunto com lítio metálico (Li/MgO) (Corma, Iborra *et al.*, 2007). Há também um número crescente de pesquisas na área de modificação enzimática de óleos e gorduras (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005).

## 2.7 LIPASES COMO BIOCATALISADORES

As lipases pertencem ao grupo das hidrolases, sendo classificadas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3). São amplamente distribuídas na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas (Cheetham, 1995; Gais e Theil, 2002; Freitas, Castro *et al.*, 2008).

As lipases catalisam a hidrólise total ou parcial das ligações éster de triacilgliceróis, liberando mono-, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Macrae, 1983; Carvalho, Campos *et al.*, 2003). As características das lipases permitem que estas enzimas ajam reversivelmente, ou seja, em reações de esterificação (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000). O equilíbrio entre a reação direta (hidrólise) e a inversa é controlado pela atividade de água da mistura reacional (Castro e Anderson, 1995; Cheetham, 1995; Wanasundara e Shahidi, 1997b; Castro, Mendes *et al.*, 2004).

Na mistura reacional, a água é compartilhada entre a enzima, o suporte – no caso de enzimas imobilizadas – e o meio reacional. A quantidade de água presente na enzima tem um papel importante para sua atividade catalítica, podendo ser influenciada pela solubilidade da água no meio reacional e pela capacidade de atração de água pelo suporte (“hidrofilicidade”) (Adlercreutz, 1996).

A água presente no meio reacional mantém a dinâmica enzimática durante as interações não covalentes (Osborn e Akoh, 2002), promovendo a produção, via hidrólise, dos acilgliceróis intermediários formados durante as reações de interesterificação (Rousseau e Marangoni, 2002).

O teor de água ideal para a atividade máxima da enzima depende do biocatalisador (Zaks e Klibanov, 1988). Um teor de água residual geralmente de 0,5 a 1% (m/v), correspondente a uma atividade de água ( $a_w$ ) de 0,25 a 0,45, é necessário para a atividade catalítica da maioria das lipases. Este teor, entretanto, pode ser de até 11% (m/v) (Villeneuve, 2007). Na literatura, já foi demonstrado que o teor de água presente no

meio reacional exerce influência sobre a obtenção de lipídios, em diferentes sistemas (Li e Ward, 1993; Haraldsson e Thorarensen, 1994).

As lipases apresentam atividade catalítica não somente em água, como também na presença de uma mistura de água e de um solvente orgânico, e, com maior importância, em meio exclusivamente orgânico (Cheetham, 1995; Gunstone, 1999; Gais e Theil, 2002; Rousseau e Marangoni, 2002; Freitas, Castro *et al.*, 2008). Desta forma, estes biocatalisadores são bastante versáteis (Xu, 2004), apresentando potencialidade para aplicação na bioconversão de óleos e gorduras em diferentes processos (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000; Pilissão, 2006). A atividade catalítica das lipases ocorre na interface água/óleo, sendo que, por isto, estes biocatalisadores atuam sobre moléculas polares e apolares (Grompone, 2011).

As lipases consistem de cadeias polipeptídicas contendo 199-641 resíduos de aminoácidos. De maneira geral, a funcionalidade destes biocatalisadores depende de uma mudança conformacional, que permite o acesso do substrato ao sítio ativo, o qual consiste da tríade serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina, conhecida como regra dos três pontos ou tríade catalítica (Jaeger e Reetz, 1998). A serina é o nucleófilo necessário para a catálise e os outros dois aminoácidos estão envolvidos em um sistema de “cadeia de cargas” definido para melhorar a catálise. Esta tríade está encoberta por uma curva superficial conhecida como *flap* ou *lid* (dobra), que consiste de um curto fragmento helicoidal de uma longa curva superficial mantida por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Durante a ativação interfacial, a dobra é deslocada mediante ligações com a interface, expondo o substrato ao sítio ativo. Simultaneamente, o meio hidrofóbico ao redor do sítio ativo fica exposto e forma um forte sítio de ligação na interface. Durante a catálise, a tríade é envolvida por um mecanismo de grupo de cargas (Rousseau e Marangoni, 2002). Exemplos de exceções são as lipases de *Burkholderia glumae*, *C. antarctica* B e *Pseudomonas aeruginosa*, que não possuem o efeito da ativação interfacial, apesar de conterem a “tampa hidrofóbica” (Verger, 1997).

Segundo a especificidade pelo substrato, as lipases são classificadas em diferentes grupos: lipases não específicas ou aleatórias, lipases regioespecíficas, lipases estereoespecíficas, lipases ácido graxo específicas (Rousseau e Marangoni, 2002; Carvalho, Campos *et al.*, 2003; Freitas, Bueno *et al.*, 2008). Além destas especificidades, muitas lipases também apresentam enantiosseletividade frente a vários ésteres, álcoois e substratos ácidos (Wanasundara e Shahidi, 1997b; Gais e Theil, 2002).



As fosfolipases A1 (E.C. 3.1.1.32), enzimas que normalmente agem sobre fosfolipídios, também podem ser aplicadas em reações de hidrólise parcial de triacilgliceróis provenientes, por exemplo, de óleo de soja (Wang, Zhao *et al.*, 2010b).

A aplicação de lipases na transformação de lipídios apresenta muitas vantagens tecnológicas frente aos processos químicos e físicos. A especificidade inerente à maioria das lipases permite a redução ou a eliminação de reações paralelas indesejáveis, o que facilita a recuperação e o refino do produto desejado (Xu, 2004). Os produtos obtidos apresentam alto valor agregado, já que se podem construir moléculas específicas, com composição pré-determinada (Goldberg, 1994). Na biocatálise, a quantidade gerada de resíduos é menor do que a obtida no processo químico, constituindo-se, portanto, em um processo mais atrativo do ponto de vista ambiental. Além disso, há a redução no custo para o tratamento dos resíduos gerados. Adicionalmente, o investimento em processo é baixo quando se utilizam enzimas como catalisadores (Xu, 2004).

O processo enzimático ocorre sob condições brandas (pH, temperatura, pressão), resultando em menor consumo energético e na degradação térmica mínima do substrato, o que implica na redução da formação de substâncias tóxicas decorrentes do processo de oxidação (Mu e Hoy, 2000; Osborn e Akoh, 2002; Rousseau e Marangoni, 2002; Kodali e List, 2005). Este fator é fundamental quando se trabalha com um óleo rico em ácidos graxos poliinsaturados, extremamente sensíveis ao calor (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a; Pawongrat, Xu *et al.*, 2007). É obtido, assim, um produto com qualidade superior do que aquele obtido na catálise química (Gunstone, 1999; Shimada, 2006).

Apesar das vantagens da catálise enzimática, as lipases apresentam algumas desvantagens frente ao processo químico (Castro, Mendes *et al.*, 2004). Apesar de sua versatilidade, muitas lipases apresentam baixa estabilidade, baixa atividade ou seletividade, sendo que seu custo ainda limita a utilização em larga escala das lipases nativas (Cheetham, 1995), quando comparado com os catalisadores químicos.

A biotransformação de lipídios poderá se tornar comercial e economicamente viável mediante a utilização de técnicas de modificação de enzimas (Villeneuve, Muderhwa *et al.*, 2000), a pesquisa de novas fontes de lipases de origem microbiana (Salum, Baron *et al.*, 2008; Griebeler, Polloni *et al.*, 2009; Wolski, Menusi *et al.*, 2009; Ramani, John Kennedy *et al.*, 2010) ou vegetal (Foglia e

Villeneuve, 1997), o estudo de biorreatores (Freitas, Paula *et al.*, 2010) e a otimização das condições da reação (Damstrup, Jensen *et al.*, 2006), preferencialmente na ausência de solvente orgânico (Linder, Kochanowski *et al.*, 2005).

O uso de enzimas imobilizadas é uma das alternativas mais utilizadas para desenvolver catalisadores técnica e economicamente viáveis (Freitas, Paula *et al.*, 2010; Kandasamy, John Kennedy *et al.*, 2010), já que permite, entre outras vantagens, a recuperação da enzima para reutilização posterior (Kennedy, 1995; Adlercreutz, 1996).

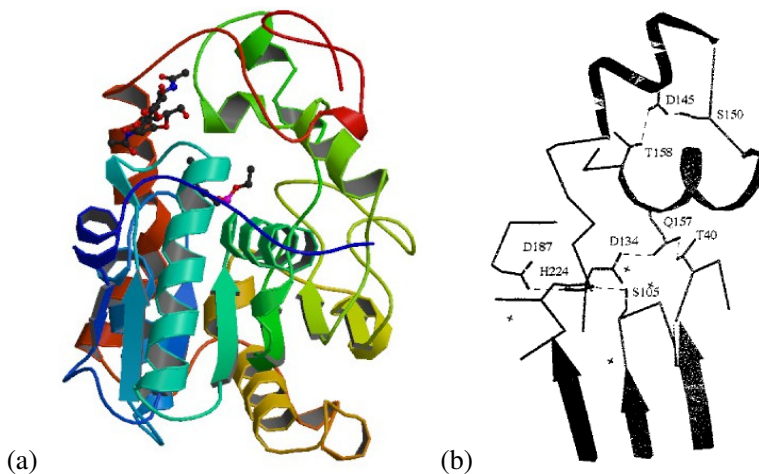
### 2.7.1 Lipases de *Candida antarctica*

Sabe-se que a lipase de *C. antarctica* contém duas frações, A e B (Bosley, Casey *et al.*, 1997). A fração A, mais termoestável do que a fração B, apresenta especificidades únicas (Forde e Ó'Fágáin, 2008), inclusive frente a álcoois terciários como o *tert*-butanol, sobre o qual a maioria das lipases, inclusive a fração B da *C. antarctica*, segundo a literatura, não é capaz de atuar (Bosley, Casey *et al.*, 1997). A fração A é amplamente utilizada na indústria de papel, na qual demonstra habilidade para hidrolisar acilgliceróis com alto ponto de fusão e ésteres de resinas (Forde e Ó'Fágáin, 2008). Apresenta estereoespecificidade (Ann, Stockenstrom *et al.*, 2006), sendo aplicada em síntese quiral (Pietzsch e Hopf, 1999; Ann, Stockenstrom *et al.*, 2006). A fração B desta lipase é bastante versátil, apresentando especificidade frente a inúmeros substratos, o que a torna flexível para aplicações em diferentes setores industriais (Forde e Ó'Fágáin, 2008).

Os pontos isoelétricos das frações A e B são 7,5 e 6,0, respectivamente, e suas massas molares são 45kDa e 35 kDa, conforme determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, conforme mencionado na literatura (Uppenbergh, Hansen *et al.*, 1994).

A CALB, lipase de *C. antarctica* B, comercializada pela Novozymes na forma livre, é uma proteína globular do tipo  $\alpha/\beta$ , formada por 317 resíduos de aminoácidos, com dimensões aproximadas de 30Å x 40Å x 50Å. A seqüência de aminoácidos não apresenta homologia com seqüências presentes em outras lipases. Na sua estrutura, há nove folhas  $\beta$ -pregueadas e dez  $\alpha$ -hélices. Como outras lipases, a enzima CALB contém a tríade catalítica Ser105, Asp187 e His224. Em outras lipases, o resíduo de serina é usualmente identificado

pela seqüência GxSxG, embora, na CALB, o primeiro resíduo de glicina seja substituído por um resíduo de treonina (Uppenberg, Hansen *et al.*, 1994). A estrutura tridimensional da *C. antarctica* B e seu sítio ativo estão apresentados na Figura 8.



**Figura 8** – Figuras (a) da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* fração B (PDB, 2011) e (b) dos resíduos de aminoácidos da tríade catalítica e resíduos polares presentes nas proximidades, formando pontes de hidrogênio na cavidade do sítio ativo

**Fonte:** Uppenberg, Hansen *et al.*, 1994.

Estudos realizados com a lipase da *C. antarctica* revelaram a existência de uma “tampa” recobrendo a tríade catalítica Ser-His-Asp. Segundo investigado na literatura (Pleiss, Fischer *et al.*, 1998), a tampa desta enzima é pequena e seu sítio ativo é em forma de funil, conforme está apresentado simplificada na Figura 9. Apesar da presença da “tampa” em sua estrutura, a lipase de *C. antarctica* B não sofre ativação interfacial (Verger, 1997).

É interessante comentar que a lipase de *C. antarctica* fração B, apesar de normalmente não apresentar especificidade, passa a ser 1,3-regioespecífica quando se encontra na presença de etanol (Pfeffer, Freund *et al.*, 2007).

A lipase comercial Novozym<sup>®</sup> 435 de *C. antarctica* B é uma preparação enzimática granulada. É produzida por fermentação submersa de um microrganismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*) (Novozymes, 2010a). Após sua produção, a enzima purificada é

imobilizada na resina acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600, desenvolvida pela Bayer AG para a Novozymes (Novozymes, 2010b).



**Figura 9** – Esquema do sítio ativo (SA) e da tampa da lipase de *Candida antarctica* fração B.

**Fonte:** Gutiérrez-Ayesta, Carelli et al., 2007.

Esta lipase é usada na indústria de óleos e gorduras em reações de esterificação e rearranjo de ácidos graxos nos triacilgliceróis. As misturas reacionais típicas compreendem triacilgliceróis, com ou sem ácidos graxos livres. Sua temperatura de reação típica é 70°C (Novozymes, 2010b).

A enzima comercial Novozym<sup>®</sup> 435 apresenta as seguintes características físicas: área superficial 80m<sup>2</sup>/g, densidade de 0,42g/mL e porosidade de 0,34mL/g (Kirk e Christensen, 2002). Sua atividade, declarada pelo fornecedor, é de 10.000 unidades de laurato de propila (PLU)/g (Novozymes, 2010a), na reação de esterificação de ácido láurico com 1-propanol a 60°C por 20min, em que ocorre a formação de laurato de propila. A atividade, em μmol/(g.min), é determinada pela Novozymes pela quantificação, por cromatografia em fase gasosa, do laurato de propila formado e do ácido láurico consumido (Novozymes, 2004).

## 2.8 PATENTES PARA A PRODUÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

A modificação de lipídios por processo enzimático é uma tecnologia nova em relação à modificação química de óleos e gorduras. O crescente número de pesquisas na área de biotransformação de lipídios permitiu o aumento do conhecimento sobre a ação das lipases, embora a aplicação desta tecnologia ainda seja limitada nas indústrias (Xu, 2004). Este autor cita que a catálise enzimática está sendo utilizada já há alguns anos para a obtenção industrial de diacilgliceróis. Desde a

década de 90, por exemplo, a ADM/Kao Group produz um óleo rico em diacilgliceróis, obtido por processo enzimático (Kao, 2010). Na literatura consultada, encontraram-se informações limitadas quanto à produção comercial de monoacilgliceróis via enzimática, conforme discutido por Freitas, Bueno *et al.* (2008). Apesar disso, a seguir serão descritos alguns processos patenteados para a produção de mono- e diacilgliceróis com potencialidades para aplicação em indústrias.

Um processo para a produção de monoacilgliceróis mediante a glicerólise enzimática de óleos foi descrito em uma patente publicada por McNeill, Yamane *et al.* (1991). Nesta invenção, a glicerólise é conduzida em uma emulsão líquido-líquido e a separação do produto de interesse é feita no estado sólido.

Na patente US 5935828 da Opta Food Ingredients, Inc., é descrita a produção de monoacilgliceróis enriquecidos com ácidos graxos ômega-3. O processo descrito envolve duas etapas, sendo que a primeira consiste na alcoólise de triacilgliceróis provenientes de um óleo de origem marinha rico em ácidos graxos ômega-3. Esta reação é catalisada por uma lipase, como a de *Pseudomonas fluorescens* ou a lipase pancreática suína, sendo que deve ser feito o ajuste prévio do teor de água do meio, para garantir a atividade catalítica da enzima. Nas condições descritas no processo, a transesterificação gera no mínimo 90% de 2-monoacilgliceróis. Após a reação, adiciona-se à mistura um solvente orgânico (hexano, acetona, tetrahidrofurano) capaz de solubilizar os monoacilgliceróis insaturados. Com a redução da temperatura do sistema, provoca-se então a cristalização da fração contendo monoacilgliceróis saturados. Separa-se em seguida o sobrenadante, do qual o solvente é removido, obtendo-se finalmente um alto teor de 2-monoacilgliceróis contendo no mínimo 60% de ácidos graxos ômega-3. Na seqüência, os monoacilgliceróis obtidos podem ser utilizados como substrato para a obtenção de triacilgliceróis ricos em ômega-3 (Zaks e Gross, 1999).

Uma patente publicada pela Danisco descreve a produção de monoacilgliceróis mediante a glicerólise em fase sólida de uma mistura de gordura hidrogenada, glicerol, lipase e, opcionalmente, lecitina (Soe, 2008).

A patente US 5153126 descreve um método para a preparação contínua de monoacilgliceróis de alta pureza (Schroder e Oba, 1992), com a separação constante dos monoacilgliceróis formados mediante resfriamento e precipitação, e recirculação da solução remanescente.

Sugiura, Shimizu *et al.* (2001) desenvolveram um processo (patente EP 1 094 116 A1) para a preparação de acilgliceróis parciais,

em especial diésteres, mediante a glicerólise enzimática de um óleo ou gordura, na presença de água.

A produção de mono- e diacilgliceróis pode envolver mais de um processo. Pode-se realizar, por exemplo, a hidrólise dos triacilgliceróis de um óleo, na presença de vapor ou de uma lipase, visando à obtenção de ácidos graxos livres. Estes são em seguida esterificados enzimaticamente com glicerol. A mistura assim obtida é então purificada por destilação molecular, para a produção de diacilgliceróis de alta pureza, em processo de baixo custo, patenteado (Yamada, Shimizu *et al.*, 1999). Em outra patente (Sugiura, Yamaguchi *et al.*, 2002), foi realizado o aumento de escala do processo citado, mediante reação de esterificação em uma torre com lipase *sn*-1,3 específica empacotada. Ambas as patentes são da Kao Corporation.

Uma patente publicada pela Procter & Gamble também relata um processo de hidrólise seletiva de triacilgliceróis para a obtenção de 2-monoacilgliceróis, os quais podem em seguida ser esterificados para produzir 1,2-diacilgliceróis ou 2,3-diacilgliceróis (Mazur, Hiler *et al.*, 1992).

## 2.9 MEIOS REACIONAIS

Nas reações envolvendo glicerol em que se utiliza uma lipase imobilizada como biocatalisador, o sistema obtido é trifásico: há uma fase oleosa hidrofóbica, uma fase glicérica hidrofílica e uma fase sólida na qual está ligada a enzima (Pawongrat, Xu *et al.*, 2007). Nestas reações, portanto, um importante obstáculo a ser solucionado é a baixa miscibilidade do glicerol e do substrato (óleo ou ácido graxo livre).

A literatura aponta que, em reações de glicerólise, somente a fração solúvel do glicerol é capaz de participar da reação (Torres, Lin *et al.*, 2002; Grompone, 2011). Deve-se considerar que a formação dos mono- e diacilgliceróis ao longo do tempo tende a aumentar a dispersão dos substratos presentes no meio reacional, por reduzir a tensão superficial entre o óleo e o glicerol, mudando o comportamento de fases ao longo da reação (Moquin e Temelli, 2008).

Algumas reações de glicerólise já foram conduzidas na ausência de solventes, conforme investigado em diferentes publicações (Arcos, Otero *et al.*, 1998; Borg, Girardin *et al.*, 2000; Guo e Sun, 2004; 2007). Em meios reacionais multifásicos sem solvente, entretanto, as conversões costumam ser baixas, sendo fundamental garantir um contato adequado dos reagentes (Borg, Girardin *et al.*, 2000).

Diversas pesquisas concentram-se na busca de alternativas para contornar a imiscibilidade do óleo e do glicerol no meio reacional e melhorar o contato entre estes substratos (Xu, 2004).

Entre as opções avaliadas, pode-se citar o aumento na temperatura da reação (Yang, Vali *et al.*, 2003b), a imobilização do glicerol em suportes (Wongsakul, H-Kittikun *et al.*, 2004), a modificação química do glicerol com agentes solubilizantes e protetores das hidroxilas (Koblitz, 2003), a condução da reação na presença de solventes orgânicos (Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003), surfactantes (Fiametti, Rovani *et al.*, 2009), fluidos supercríticos ou pressurizados (Moquin e Temelli, 2008), ou ainda em sistemas mistos, contendo fluido pressurizado e surfactante (Esmelindro, Fiametti *et al.*, 2008). Outra tendência recente em reações de biotransformação é a aplicação de líquidos iônicos em substituição aos solventes orgânicos convencionais, especialmente no caso de substratos polares de difícil solubilização em meios convencionais (Husson, Humeau *et al.*, 2008).

Técnicas de catálise utilizando ultrassom, entre outras técnicas de “alta energia”, também têm sido aplicadas em reações de transformação de lipídios, principalmente na área de catálise química, como já investigado na produção de biodiesel (Hanh, Dong *et al.*, 2009). Pesquisas sobre a aplicação da tecnologia de ultrassom em biocatálise mostram sua eficácia na hidrólise enzimática de óleo de soja (Liu, Jin *et al.*, 2008) e na produção enzimática de diacilgliceróis (Babicz, Leite *et al.*, 2010). As tecnologias descritas acima, entretanto, devem ser adequadamente investigadas para se tornarem economicamente viáveis para aplicação industrial.

Nas seções seguintes, serão descritos os meios reacionais utilizados no presente trabalho.

### **2.9.1 Solvente orgânico**

Uma forma de solucionar o problema da baixa solubilidade dos substratos no meio reacional é utilizar solventes (ou uma mistura de solventes) com solubilidade compatível com os diferentes substratos utilizados, resultando em melhoria na transferência de massa (Schmid, Bornscheuer *et al.*, 1998; Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003; Yang, Vali *et al.*, 2003b; Barouh, Piombo *et al.*, 2008). Outra vantagem do uso de solventes é a redução do tempo de reação (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005).

Quando se utiliza solvente em reações catalisadas por lipases, dispõe-se de um parâmetro para a sua escolha, o chamado “log  $P$ ”, que representa a hidrofobicidade do solvente, sendo definido como o coeficiente de partição do solvente em um sistema bifásico octanol/água (Cheetham, 1995; Gais e Theil, 2002; Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003).

A atividade da maioria das lipases é baixa em solventes hidrofílicos apresentando  $\log P < 2$ , já que modificam as interações essenciais água-enzima, inativando ou desnaturando o biocatalisador. Já para  $2 < \log P < 4$ , a atividade é relativamente variável, e para solventes hidrofóbicos com  $\log P > 4$ , a atividade é alta (Adlercreutz, 1996; Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003). Solventes hidrofóbicos podem ser utilizados para reduzir a afinidade pela água ligada à lipase, evitando sua inativação e aumentando a taxa de reação catalisada pela enzima no sentido de síntese, promovendo também um aumento na solubilidade de substratos apolares, bem como uma maior termoestabilidade da enzima (Cheetham, 1995; Gais e Theil, 2002; Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003).

É fundamental observar que os solventes orgânicos provocam alterações conformacionais nas enzimas, já que modificam as interações essenciais água-enzima, resultando na alteração da especificidade pelo substrato e pela afinidade das enzimas aos substratos (Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003; Yesiloglu e Kilic, 2004).

Reações conduzidas em um solvente polar, por exemplo, resultam em uma fração molar relativamente alta de monoacilgliceróis, enquanto a redução na polaridade do meio reacional direciona a reação para a formação de di- e triacilgliceróis (Yang, Vali *et al.*, 2003b). Já nas reações conduzidas em meios livres de solventes, as frações molares dos ésteres no equilíbrio dependem do comprimento da cadeia alquila (Bornscheuer, 1995).

Em estudo sobre a glicerólise enzimática de óleo de girassol (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a), foi realizada inicialmente uma seleção do biocatalisador, utilizando-se as lipases Novozym<sup>®</sup> 435 (obtida de *C. antarctica* B), Lipozyme RM IM (obtida de *Rhizomucor miehei*) e Lipozyme TL IM (obtida de *Thermomyces lanuginosus*). Neste trabalho, utilizou-se *tert*-butanol ( $\log P = 0,35$ ), solvente permitido para uso em indústrias alimentícias. A Novozym<sup>®</sup> 435 proporcionou o maior rendimento em monoacilgliceróis entre os catalisadores avaliados, provavelmente por ser a lipase com menor exigência de água entre as enzimas testadas, não sendo afetada pela polaridade do sistema.



Ao contrário de outras enzimas, a literatura indica que a lipase de *C. antarctica* fração B não atua sobre álcoois terciários, devido ao impedimento estéreo, podendo mediar reações de glicerólise em meios contendo tais álcoois como solvente (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a).

Em estudo sobre glicerólise de óleo de girassol catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435, verificou-se que o uso de *terc*-butanol, *terc*-pentanol (log  $P=0,89$ ) ou a mistura de um destes álcoois com *n*-hexano (log  $P=4,00$ ) proporcionou uma boa eficácia reacional (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). Neste trabalho, também haviam sido testadas misturas de acetona (log  $P=-0,24$ ) e isooctano (log  $P=5,15$ ), que não proporcionaram quantidades satisfatórias de monoacilgliceróis. No trabalho citado, observou-se que um teor máximo de monoacilgliceróis foi obtido em solventes com log  $P$  na faixa de 0,3 a 1, apresentando estrutura de álcool terciário (*terc*-butanol e *terc*-pentanol), sendo que a formação de monoacilgliceróis em sistema livre de solvente foi desprezível. O log  $P$  relativamente baixo destes álcoois terciários indica características tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, com predominância de características hidrofílicas. Isto garante as propriedades necessárias de solvência, tanto para o óleo quanto para o glicerol.

O emprego de *terc*-butanol também foi eficaz para a produção de mono- e diacilgliceróis em reação de glicerólise de azeite de oliva catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 (Krüger, Valério *et al.*, 2010).

Na glicerólise de óleo de atum visando à obtenção de monoacilgliceróis ricos em EPA e DHA, observou-se que o solvente *terc*-butil metil éter (MTBE) foi o mais adequado para a reação catalisada pela lipase AK de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em Accurel EP-100 (Pawongrat, Xu *et al.*, 2007). Em outro trabalho publicado pelos mesmos autores (2008), observou-se que, para o mesmo sistema acima, a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 apresentou atividade maior do que a lipase AK em meio contendo *terc*-butanol, inclusive quando este álcool está misturado com *n*-hexano. Os autores observaram que o aumento da proporção de hexano na mistura reduziu a obtenção de monoacilgliceróis.

Em estudo sobre a produção de monoestearina, observou-se a obtenção preferencial deste monoacilglicerol quando se utilizou excesso de acetona em misturas com hexano, em reação catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 (Yang, Vali *et al.*, 2003b). Em outra pesquisa (Monteiro, Nascimento *et al.*, 2003), foi possível obter somente monolaurina quando se utilizou um excesso de glicerol em meio

contendo *n*-hexano/*terc*-butanol (1:1, v/v), em reação catalisada pela Lipozyme RM IM (Novozymes), de *R. miehei*.

Outros aspectos devem ser considerados para a definição do solvente mais adequado para uso industrial, como seu custo, a ocorrência de reações paralelas indesejáveis, a facilidade na sua recuperação, a energia necessária para sua remoção da mistura, sua toxicidade, entre outros (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). Apesar do uso freqüente de solventes nos meios reacionais contendo enzimas, estas desvantagens direcionaram as pesquisas para a condução de reações na ausência de solvente, condição preferencial para aplicações em alimentos (Khare e Nakajima, 2000).

## 2.9.2 Surfactantes

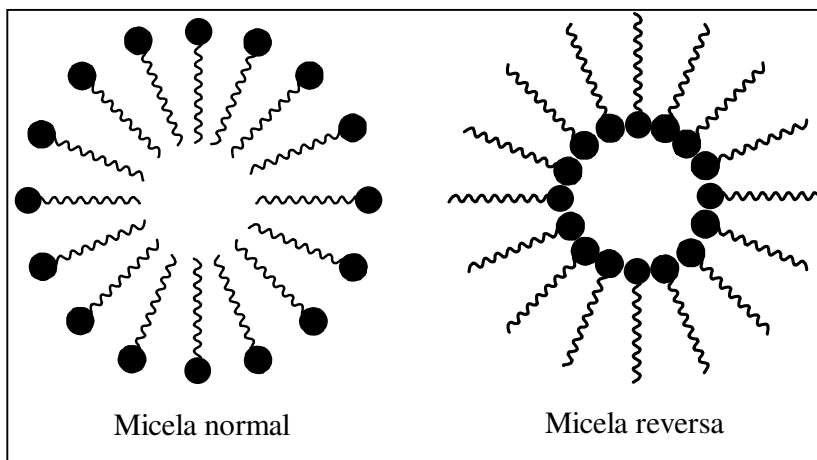
Outro método empregado em reações de glicerólise é a formação de emulsões (gotas de 0,30-200 $\mu$ m de diâmetro) ou de microemulsões (gotas de 5-100nm de diâmetro), de maneira a proporcionar uma interface polar/apolar estável e de tamanho apreciável (Grompone, 2011).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma região polar, hidrofílica, e outra apolar, hidrofóbica. Podem ser de origem sintética, obtidos a partir de derivados de petróleo, ou natural, obtidos a partir de produtos naturais renováveis, via microbiana ou enzimática. De acordo com a carga presente na parte hidrofílica da molécula, após dissociação em solução aquosa, podem ser classificados em surfactantes aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou zwitteriônicos (Maniasso, 2001).

Uma característica comum a todos os surfactantes é a capacidade de formar agregados, denominados micelas, em misturas água/óleo, a partir de uma determinada concentração e em condições específicas. A concentração onde inicia o processo de formação das micelas é chamada de concentração micelar crítica, CMC, que é uma propriedade intrínseca e característica dos surfactantes (Maniasso, 2001).

A emulsão pode ser de óleo em água (O/A, micela normal) ou de água em óleo (A/O, micela reversa), conforme indicado na Figura 10. No sistema de micela normal, o centro da gota de emulsão é constituído de óleo (fase apolar), e a água, a fase contínua, está em volta da gota da emulsão O/A. Já no sistema de micela reversa, o centro da gota é constituído de água, e a fase orgânica (óleo) está em volta da gota de emulsão A/O. Uma maneira de se definir o tipo de emulsão (A/O ou

O/A) é através da proporção volumétrica dos componentes da mistura (Leon-Calderon, Schmitt *et al.*, 2007). O sistema utilizado nas reações de glicerólise é formado por duas fases, sendo que a porção glicerol (polar) geralmente apresenta-se em menor proporção volumétrica do que a porção óleo (apolar), o que caracteriza o sistema como uma emulsão A/O (micela reversa).



**Figura 10** – Representação de uma micela normal (óleo em água) e de uma micela reversa (água em óleo).

O balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) é a relação entre a concentração do surfactante na fase oleosa e a sua concentração na fase aquosa, quando este é adicionado a uma mistura de água e óleo. O BHL baseia-se apenas na estrutura molecular do surfactante e indica o tipo de emulsão que pode ser obtido, se A/O ou O/A (Schick, 1987). Um surfactante hidrofóbico, com BHL na faixa de 3 a 6, irá favorecer a formação de uma emulsão A/O, enquanto um BHL entre 10 e 18 favorece uma emulsão O/A (Desai e Banat, 1997). Uma combinação de surfactantes, em que um é mais hidrofílico e o outro é mais hidrofóbico, geralmente é mais eficaz do que o uso de apenas um surfactante para estabilizar uma emulsão. Apesar de ser útil, o BHL não é uma ferramenta universal para a escolha do surfactante ideal para determinado sistema, nem para a definição do tipo de emulsão formada (A/O ou O/A) (Holmberg, Jönsson *et al.*, 2002).

O uso de um surfactante em reações de glicerólise permite um maior contato entre os substratos e a enzima (Bornscheuer, 1995).

Fiametti, Rovani *et al.* (2009) estudaram a obtenção de monoacilgliceróis através da glicerólise de azeite de oliva catalisada pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, em meio livre de solvente, na presença de AOT. Encontraram conversões superiores a 70% utilizando baixas concentrações de enzima, em apenas 1h de reação. Em outro trabalho, o mesmo biocatalisador mediou a glicerólise de azeite de oliva em meio livre de solvente, na presença do surfactante Triton X-100 (Valério, Krüger *et al.*, 2009), para a obtenção de um teor superior a 35% (em massa, em relação ao total de substratos) de mono- e diacilgliceróis. No mesmo sistema acima, mas utilizando-se Tween 65 como surfactante de grau alimentício, foi possível obter 26 e 17% de mono- e diacilgliceróis (em massa, em relação ao total de substratos), respectivamente (Valério, Rovani *et al.*, 2010).

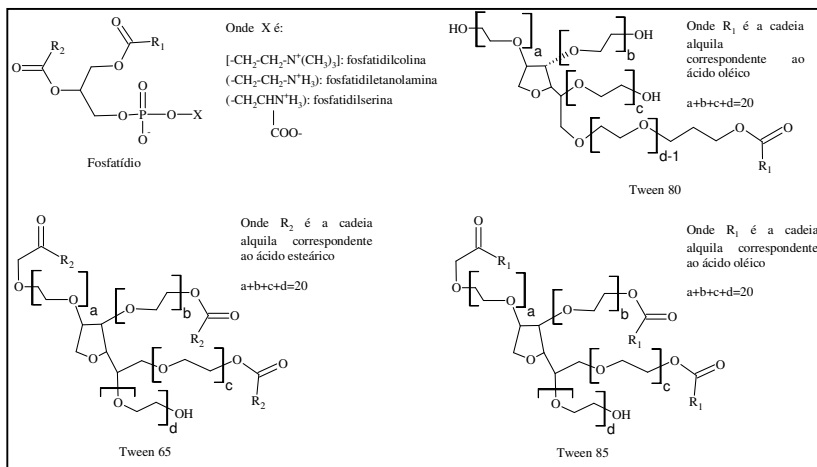
Apesar dos altos rendimentos em mono- e diacilgliceróis proporcionados pelo uso de AOT, o caráter tóxico deste e de outros surfactantes sintéticos (como o Triton X-100) limita sua aplicação para a obtenção de ingredientes alimentícios. Neste sentido, é fundamental optar pela utilização de surfactantes reconhecidos como GRAS.

### **2.9.2.1 Ação de lipases sobre surfactantes**

Muitos surfactantes de grau alimentício (Tween, lecitina) têm sido aplicados como aditivos em reações catalisadas por lipases, para melhorar a homogeneidade do sistema, o que é de interesse particular quando se trabalha com substratos imiscíveis, como acontece em reações de glicerólise (Krüger, Valério *et al.*, 2010; Valério, Rovani *et al.*, 2010). As estruturas químicas dos Tween 65, 80 e 85 ainda não estão corretamente elucidadas. A composição aproximada dos Tween e a estrutura geral dos fosfatídios estão indicadas na Figura 11.

Os surfactantes de grau alimentício poli-(óxido de etileno) (20) triestearato de sorbitana, poli-(óxido de etileno) (20) monooleato de sorbitana e poli-(óxido de etileno) (20) trioleato de sorbitana são surfactantes não iônicos, conhecidos, respectivamente, como Tween 65, 80 e 85 (FDA, 2010a). Os Tween são uma mistura de ésteres parciais de sorbitol e seus mono- e dianidridos com ácidos graxos, condensados com óxido de etileno. No nome destes compostos, o índice 20 refere-se ao número total de mols de óxido de etileno,  $-(CH_2CH_2O)-$ , presentes por mol de sorbitol e seus anidridos (Fennema, 1996; Jecfa, 2009; FDA, 2010a). Um processo que descreve a produção de poli-(óxido de etileno)

ésteres de ácidos graxos de sorbitana foi patenteado por Tanaka, Omae *et al.* (2005).



**Figura 11** – Estrutura química dos fosfatídios e estrutura aproximada do Tween 65, Tween 80 e Tween 85.

A lecitina é um surfactante natural obtido da gema de ovo ou da soja. Estruturalmente, consiste de dois ácidos graxos esterificados ao glicerol e de um grupo fosfatidil esterificado ao grupamento –OH do glicerol. Os grupos funcionais polares predominantes na lecitina são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina (Hasenhuettl, 2008). É classificado como um surfactante zwitteriônico (McClements, 2008)

Tanto os Tween quanto a lecitina, portanto, contêm funções químicas que podem potencialmente ser modificadas por lipases, como já observado na literatura (Bendikienė, Surinėnaitė *et al.*, 2005).

Na esterificação de sorbitol com ácido esteárico (Gulati, Arya *et al.*, 2003), verificou-se que a lipase imobilizada de *A. terreus* é capaz de produzir ésteres de ácidos graxos de sorbitana. Em dois trabalhos, Bendikienė, Surinėnaitė *et al.* (2005; 2008) demonstraram que a lipase de *Pseudomonas mendocina* 3121-1 apresenta atividade hidrolítica frente a diferentes Tween. Em trabalho de Rudek (1978), observou-se que diferentes espécies de *Candida* apresentaram habilidade em hidrolisar pelo menos um tipo de Tween.

Em investigação em que se utilizou lecitina de soja como substrato, as lipases comerciais CALB (na forma livre) e Novozym<sup>®</sup> 435

(na forma imobilizada), de *C. antarctica* B, não foram capazes de hidrolisar este fosfolípido (Gutiérrez-Ayesta, Carelli *et al.*, 2007). As lipases Novozym® 435 e Lipozyme RM IM de *R. miehei* já foram aplicadas, respectivamente, no enriquecimento de fosfolípidios com ácido  $\alpha$ -linolênico (Chojnacka, Gladkowski *et al.*, 2009) e no enriquecimento de fosfatidilcolina com EPA e DHA (Haraldsson e Thorarensen, 1994) e com ácidos palmítico e esteárico (Reddy, Vijeeta *et al.*, 2005).

Com base nos trabalhos citados, percebe-se que, em reações de glicerólise enzimática, é fundamental avaliar se os Tween e lecitinas irão agir apenas como surfactantes dos substratos imiscíveis ou se também servirão como substrato para a lipase. Na literatura consultada, referente a reações de glicerólise na presença de surfactantes, não foi realizada esta abordagem.

## **2.10 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA PARA A OBTENÇÃO DE MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS**

As reações de glicerólise enzimática podem ser realizadas em diferentes sistemas reacionais como, por exemplo, em micelas reversas, na presença ou na ausência de solventes orgânicos, e em um sistema livre de solvente no estado sólido (Bornscheuer, 1995). Na Tabela 3, são apresentados alguns estudos encontrados na literatura sobre reações enzimáticas de glicerólise, visando à produção de mono- e diacilgliceróis, destacando-se aqueles contendo EPA e DHA. Nos resultados apresentados, estão destacadas as condições otimizadas em cada trabalho.

Nos trabalhos apresentados, observa-se que a reação de glicerólise pode ser conduzida em meio livre de solvente e de surfactante (Torres, Lin *et al.*, 2002; Yang, Fruekilde *et al.*, 2003). Neste sistema, entretanto, a transferência de massa torna-se limitada devido à imiscibilidade dos substratos (glicerol e óleo), o que exige um longo tempo de reação (24h, nos trabalhos apresentados) para se atingir conversões satisfatórias. Estes problemas podem ser contornados mediante a condução da reação na presença de solvente orgânico (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a; Pawongrat, Xu *et al.*, 2007) ou de um agente tensoativo (Valério, Krüger *et al.*, 2009). Segundo os estudos mencionados, o uso de solventes ou de surfactantes no meio reacional reduz consideravelmente os tempos de reação, mantendo conversões comparáveis ou mesmo superiores às obtidas na ausência destas

substâncias, constituindo-se, portanto, em alternativas atrativas e com potencialidades para aplicação industrial.

**Tabela 3.** Condições otimizadas e resultados de alguns estudos sobre reações de glicerólise enzimática, em reator em batelada.

<b>Lipase testada</b>	<b>Substrato</b>	<b>Condições Otimizadas</b>	<b>Produtos Formados</b>	<b>Referência</b>
Chirazyme L9 <sup>(1)</sup>	Óleo de peixe	8,5% (m/m) de enzima (em relação ao total de substratos), 45°C, TAG:gli = 5,5 (mol/mol), 300rpm, sem solvente	9% MAG, 18% 1,3-DAG, 13% 1,2-DAG após 24h <sup>(a)</sup>	(Torres, Lin <i>et al.</i> , 2002)
Chirazyme L2 <sup>(2)</sup>	Óleo de peixe	7% (m/m) de enzima, 60°C, TAG:gli = 0,89 (mol/mol), 300rpm, sem solvente	20% MAG e 42% DAG após 24h <sup>(a)</sup>	(Torres, Lin <i>et al.</i> , 2002)
Lipozyme TL IM <sup>(3)</sup>	Óleo de girassol	20% (m/m) de enzima, 40°C e 200rpm durante 17h, com redução para 5°C e 200rpm até completar 24h, TAG:gli = 1:1 (mol/mol), sem solvente	5% MAG, 50% DAG, 3,5% TAG, 8% AGL após 24h <sup>(b)</sup>	(Yang, Fruekilde <i>et al.</i> , 2003)
Lipase AK <sup>(4)</sup>	Óleo de atum	45°C, TAG:gli = 1:3, 300rpm, 10% (m/v) de óleo em MTBE, 4% (m/m) de água adicionada ao glicerol	24,6% MAG contendo 56,0% AGPI (EPA e DHA) e 30% DAG após 24h <sup>(c)</sup>	(Pawongrat, Xu <i>et al.</i> , 2007)
Accurel EP-100 Novozym® 435 <sup>(5)</sup>	Óleo de girassol	10-15% (m/m) enzima, 40°C, TAG:gli = 1:4,5 (mol/mol), 700rpm, <i>tert</i> -butanol (1,5:1, álcool:óleo, mol/mol)	70% MAG e 27% DAG, após 2h <sup>(d)</sup>	(Yang, Rebsdorf <i>et al.</i> , 2005a)
Novozym® 435 <sup>(5)</sup>	Óleo de girassol	30% (m/m) de enzima, 50°C, TAG:gli = 1:5 (mol/mol), <i>tert</i> -butanol (50mL/10 g óleo)	83,6% MAG após 150min <sup>(e)</sup>	(Damstrup, Jensen <i>et al.</i> , 2005)
Novozym® 435 <sup>(5)</sup>	Azeite de oliva	10% (m/m) de enzima, 40°C, TAG:gli = 1:3 e 1:6 (mol/mol), 600rpm, <i>tert</i> -butanol (1:1, v/v em relação aos substratos)	53% MAG e 18% DAG após 8h <sup>(d)</sup>	(Krüger, Valério <i>et al.</i> , 2010)
Novozym® 435 <sup>(5)</sup>	Azeite de oliva	10% (m/m) de enzima, 55°C, TAG:gli = 1,5:0,5 (mol/mol), 600rpm, <i>tert</i> -butanol (1:1, v/v em relação aos substratos)	10% MAG e 50% DAG após 8h <sup>(d)</sup>	(Krüger, Valério <i>et al.</i> , 2010)
Novozym® 435 <sup>(5)</sup>	Azeite de oliva	9,0% (m/m) de enzima, 70°C, TAG:gli 1:6 (mol/mol), 600rpm, 16% (m/m) de surfactante (Triton X-100 ou Tween 65)	37,4% e 41,8% de MAG+DAG para os surfactantes Triton X-100 e Tween 65, respectivamente, após 2h <sup>(d)</sup>	(Valério, Rovani <i>et al.</i> , 2010)

Abreviações: gli: glicerol. MTBE: *tert*-butil metil éter. AGPI: ácidos graxos poliinsaturados. MAG: monoacilgliceróis. DAG: diacilgliceróis. TAG: triacilgliceróis. AGL: ácidos graxos livres.

(1) *Rhizomucor miehei*, 1,3-específica (Boehringer-Mannheim). (2) *C. antarctica* fração B, não específica (Boehringer-Mannheim). (3) Lipase de *Thermomyces lanuginosa*, imobilizada comercialmente em sílica (Novozymes). (4) *Pseudomonas fluorescens*, teor de água de 0,04% (Amano). Accurel EP-100: nome comercial de suporte de polipropileno. (5) Lipase não específica de *C. antarctica* obtida por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, e adsorvida em uma resina macroporosa (Novozymes).

Expressão dos resultados: (a) % molar dos ácidos graxos presentes em cada produto. (b) % em área de MAG, DAG, TAG e AGL. (c) (m/m) de cada produto em relação ao total de acilgliceróis. (d) % (m/m) em relação ao total de substratos.



Entre os trabalhos de glicerólise indicados na Tabela 3, verifica-se que a lipase de *C. antarctica* fração B é um biocatalisador promissor para mediar reações de glicerólise. Esta enzima age sobre diferentes substratos, como óleo de peixe (Torres, Lin *et al.*, 2002), óleo de girassol (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a) e azeite de oliva (Krüger, Valério *et al.*, 2010). Esta lipase apresenta bom desempenho em meios em que há somente os substratos da reação de glicerólise, a saber, triacilgliceróis e glicerol, como observado no estudo realizado por Torres, Lin *et al.* (2002). Este catalisador é capaz de atuar na presença de solventes como *terc*-butanol (Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a; Valério, Krüger *et al.*, 2009) e na presença dos surfactantes Tween e Triton X-100 (Valério, Rovani *et al.*, 2010).

## 2.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado da arte revelou o potencial em utilizar lipases imobilizadas como catalisadores em reações de glicerólise para a produção de mono- e diacilgliceróis ricos em EPA e DHA. A aplicação de enzimas encontra especial interesse na modificação de óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, já que permite que a reação seja conduzida sob condições amenas, preservando a qualidade do produto. Além disso, verificou-se o potencial de utilização destes biocatalisadores em sistemas heterogêneos, como os encontrados nas reações de glicerólise.

Para viabilizar a aplicação industrial de lipases em reações de glicerólise, alguns aspectos devem ser considerados. Um deles é a imiscibilidade do óleo e do glicerol presentes no meio reacional, o que dificulta a transferência de massa neste sistema. Para contornar este problema, um tema explorado com muito sucesso na literatura é a condução das reações de glicerólise na presença de solventes orgânicos. A adição de solventes, com destaque para o *terc*-butanol, permite reduzir a resistência à transferência de massa. Esta alternativa, entretanto, apresenta certos inconvenientes como a necessidade de recuperação e a toxicidade apresentada por alguns solventes, excluído o *terc*-butanol. Por estas razões, esforços têm sido feitos para a condução das reações em meios livres de solventes orgânicos. Em sistemas compostos somente pelos substratos (óleo e glicerol) e pela enzima, conversões satisfatórias são obtidas somente quando se aplicam longos tempos de reação (normalmente de 24 horas, dependendo das condições

reacionais), o que se torna impraticável para aplicações industriais. Desta forma, é imperativa a investigação de outras alternativas que permitam a redução do tempo de reação, juntamente com a maximização da produção de mono- e diacilgliceróis. A adição de surfactantes ao meio reacional tem sido de grande contribuição para melhorar a eficácia da reação, já que proporciona o aumento da área interfacial, permitindo o contato entre os substratos e a enzima. Além disso, este sistema proposto constitui-se em um processo que minimiza os impactos ambientais. A utilização de surfactantes de grau alimentício é uma alternativa bastante promissora na área de modificação enzimática de óleos e gorduras, embora os estudos a este respeito ainda sejam escassos.

Neste contexto, conforme apresentado anteriormente e agora embasado pela revisão da literatura, revelando o estado da arte no qual este tema se insere, o desenvolvimento do presente trabalho é de extrema importância para a produção de mono- e diacilgliceróis através da glicerólise de óleo de peixe, utilizando lipase comercial imobilizada como catalisador. Os sistemas reacionais investigados foram definidos em função das características dos substratos envolvidos na reação, do catalisador empregado e de alguns dados existentes na literatura para sistemas semelhantes.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados o material e a metodologia empregados para cada uma das etapas do trabalho realizadas no Brasil e na França.

#### 3.1 MATERIAL

Utilizou-se como catalisador a lipase comercial imobilizada Novozym<sup>®</sup> 435 de *C. antarctica* B (Novozymes). Durante a obtenção comercial deste preparado enzimático, a lipase é fortemente ligada ao suporte Lewatit VPOC 1600, que é uma resina poliacrílica macroporosa. Sua atividade mínima é de 10.000,00 PLU/g (unidades de laurato de propila), conforme declarado pelo fornecedor.

Utilizou-se como substrato o óleo de peixe ultra-refinado OmegaPure (OmegaProtein, USA). Este óleo, rico em EPA e DHA, foi obtido industrialmente de savelha e foi estabilizado pelo fabricante com 500ppm de tocoferóis e 200ppm de *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ).

Segundo o fornecedor, o perfil de ácidos graxos típico deste óleo é o seguinte (% do total de ácidos graxos): mirístico 8,2%; palmítico 19,1%; palmitoléico 11,7%; esteárico 3,0%; oléico 13,2%; linoléico 2,2%;  $\alpha$ -linoléico 1,6%; estearidônico 3,5%; araquidônico 1,7%; eicosapentaenóico 13,8%; docosapentaenóico 2,2%; docosahexaenóico 11,8%; outros 7,0%. Com base nesta composição em ácidos graxos, calculou-se a massa molar dos acilgliceróis deste óleo (massa molar dos triacilgliceróis 877,65g/gmol, massa molar dos diacilgliceróis 615,80g/gmol, massa molar dos monoacilgliceróis 353,95g/gmol).

Nos experimentos realizados no Brasil, utilizou-se o glicerol P.A. (99,5%, Nuclear, massa molar 92,09g/gmol). Os surfactantes de grau alimentício utilizados estão listados a seguir: poli-(óxido de etileno) triestearato de sorbitana (nome comercial Tween 65, marca Fluka, poli-(óxido de etileno) monooleato de sorbitana (nome comercial Tween 80, Synth), poli-(óxido de etileno) trioleato de sorbitana (nome comercial Tween 85, Fluka) e lecitina de soja em pó da marca Inlab.

Nos experimentos realizados na França, utilizou-se o glicerol P.A. 99,5% da marca Sigma-Aldrich, os Tween 65, 80 e 85 da marca Sigma, e a lecitina em pó desengordurada EMULPUR IP (Degussa, Alemanha).

Todos solventes utilizados foram de grau analítico.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS E DA ENZIMA

O óleo de peixe foi caracterizado quanto aos índices de acidez, saponificação e peróxido, densidade relativa, viscosidade, teor de água, composição em ácidos graxos, regiodistribuição de ácidos graxos nos triacilgliceróis. O glicerol foi caracterizado quanto à viscosidade e ao teor de água. O teor de água do material de partida (*tert*-butanol e surfactantes) também foi determinado. A enzima foi caracterizada quanto à atividade de água e à atividade de esterificação. As análises realizadas estão detalhadas a seguir.

#### 3.2.1 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez do óleo foi realizada, no Brasil, segundo metodologia AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1989), com as seguintes modificações: 7,05±0,05g do óleo, inteiramente líquido, foram dissolvidos em uma solução neutralizada de 75mL de etanol 95%, quente. Adicionaram-se 2mL do indicador (solução de fenolftaleína 1% em etanol 95%) e titulou-se com solução padronizada de NaOH 0,01M. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como índice de acidez em ácido oléico, calculado pela Equação 1:

$$I.A.(%ácidooleico) = \frac{V \cdot M \cdot 28,2 \cdot f_c}{m} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

V = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de NaOH;

f<sub>c</sub> = fator de correção da solução de NaOH;

m = massa da amostra (g).

O índice de acidez total da amostra (%) foi obtido multiplicando-se o resultado encontrado na Equação 1 por 1,99.

Na França, o índice de acidez do óleo foi determinado com base no método NF T60-204/1985 (AFNOR, 1985). A diferença básica entre as técnicas é a dissolução da amostra de óleo em éter etílico/etanol 95% (50:50, v/v) e titulação com uma solução etanólica de KOH 0,1M, na presença de fenolftaleína como indicador. Os resultados foram

expressos como índice de acidez, em porcentagem de ácido oléico, determinado pela fórmula indicada na Equação 2:

$$I.A.(%ácidooleico) = \frac{V \cdot M \cdot 56,1 \cdot f_c}{m}$$

**Equação 2**

onde:

V = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de KOH;

$f_c$  = fator de correção da solução de KOH;

m = massa da amostra (g).

### 3.2.2 Índice de saponificação

O índice de saponificação do óleo foi determinado, no Brasil, segundo metodologia AOCS Cd 3-25 (AOCS, 1990), conforme descrito a seguir: em um Erlenmeyer com boca esmerilhada, cerca de 2g de óleo foram dissolvidos em 20mL de solução alcoólica de KOH a 4%. O Erlenmeyer foi conectado a um condensador de refluxo e a amostra foi aquecida brandamente, por um período de 30min. Ao final deste tempo, a amostra foi resfriada e adicionaram-se 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. A mistura foi titulada com solução padronizada de HCl 0,5M, até o desaparecimento da coloração rósea. Em paralelo, foi realizada a titulação do branco.

As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como índice de saponificação em mg KOH/mg de amostra, calculado pela Equação 3:

$$I.S.(mgKOH / mgamostra) = \frac{(B - V_a) \cdot 28 \cdot f_c}{m}$$

**Equação 3**

onde:

B = volume de ácido gasto na titulação do branco (mL);

$V_a$  = volume de ácido gasto na titulação da amostra (mL);

$f_c$  = fator de correção da solução de HCl;

m = massa da amostra (g).

### 3.2.3 Índice de peróxido

O índice de peróxido (I.P.) foi determinado, no Brasil, segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1990): cerca de 5,00±0,05g do óleo foram dissolvidos em 50mL de solução ácido acético-clorofórmio (3:2, v/v) e 0,5mL de solução saturada de KI. Após 1 minuto em repouso, adicionaram-se 30mL de água destilada. Titulou-se com solução padronizada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01M, sob constante e vigorosa agitação, até que a cor amarela do iodo tivesse quase desaparecido. Após adição de 0,5mL de solução indicadora de amido a 1%, continuou-se a titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01M até que a cor azul da solução tivesse desaparecido. Realizou-se paralelamente a titulação de um branco. A análise foi feita em triplicata e a concentração de peróxidos (meq de O<sub>2</sub>/kg de óleo) foi calculada através da Equação 4:

$$I.P.(meqO_2 / kg) = \frac{(S - B) \cdot M \cdot 1000}{m} \quad \text{Equação 4}$$

onde:

S = volume gasto na titulação da amostra (mL);

B = volume gasto na titulação do branco (reagentes sem a amostra) (mL);

M = molaridade da solução padronizada de tiosulfato de sódio;

m = massa de amostra (g).

Para a determinação do índice de peróxido na França, utilizou-se o método NF T60-220/1968, descrito em AFNOR (1985), seguindo os mesmos princípios descritos na técnica acima.

### 3.2.4 Densidade relativa

A densidade relativa do óleo OmegaPure foi determinada, no Brasil, com base no método AOCS Cc 10a-25 (AOCS, 1990), utilizando-se um picnômetro sem abertura lateral. Em um picnômetro previamente pesado, adicionou-se água destilada recentemente fervida e imediatamente resfriada. O frasco foi totalmente imerso em um banho-maria a 25°C±0,1°C, no qual foi mantido durante 30min. Ao final deste tempo, o picnômetro foi cuidadosamente retirado do banho, limpo na parte externa e pesado. O mesmo procedimento foi adotado para a

amostra de óleo. A densidade relativa do óleo a 25°C (g/mL) foi calculada com base na Equação 5:

$$\rho_{25^{\circ}\text{C}} (\text{g / mL}) = \frac{m_{\text{total}} - m_p}{m_{\text{H}_2\text{O}(25^{\circ}\text{C})}}$$

**Equação 5**

onde:

$m_{\text{total}}$  = massa do picnômetro e do óleo(g);

$m_p$  = massa do picnômetro (g);

$m_{\text{H}_2\text{O}(25^{\circ}\text{C})}$  = massa da água a 25°C(g).

### 3.2.5 Determinação da viscosidade dos substratos

As viscosidades do óleo de peixe e do glicerol P.A. foram determinadas, na URI, no viscosímetro Programmable DV-III + Rheometer V5.0 Brookfield às temperaturas de 25, 40, 55 e 70°C. Utilizaram-se os *spindle* SC4-18 para o óleo de peixe e SC4-34 para o glicerol. A velocidade de rotação variou de 20 a 240rpm para as temperaturas de 40 a 70°C, e de 20 a 130rpm para a temperatura de 25°C. Os dados foram tratados com o auxílio do software Rheocalc V.2.4.

### 3.2.6 Composição em ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

A composição em ácidos graxos do óleo de peixe foi determinada, no Brasil, no cromatógrafo gasoso capilar CGC AGILENT 6850 SERIES. Utilizou-se a coluna capilar DB-23 (Agilent), com 60m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25µm de filme. As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes: fluxo coluna de 1,00mL/min; velocidade linear de 24cm/seg; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; temperatura do forno: 110°C por 5 minutos, 110-215°C (5°C/min), 215°C por 24 minutos; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1,0µL. Esta análise foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas, SP).

Na França, a composição em ácidos graxos do óleo de peixe foi determinada por CG, após a conversão dos triacilgliceróis em seus



respectivos ésteres metílicos, de acordo com o método NF T60-233/1977 (AFNOR, 1985). Os ésteres foram então analisados no cromatógrafo gasoso Agilent 6890 Series, equipado com injetor automático e *on-column*, acoplado a um detector de ionização de chama (CG-DIC). Utilizou-se a coluna capilar Supelcowax (30m x 0,25mm x 0,25µm, Supelco). As condições de análise foram: temperatura do detector 270°C; temperatura da coluna: 185°C por 2min; 185-225°C a 4°C/min; gás de arraste: hélio. O volume de injeção foi de 1,0µL.

### 3.2.7 Análise posicional dos triacilgliceróis

Esta determinação foi feita na França. Inicialmente, realizou-se a purificação dos triacilgliceróis presentes no óleo de peixe, conforme descrito na Norma ISO 6800:1997. Para tanto, 5g de óleo foram dissolvidos em 25mL de *n*-hexano. Esta solução foi eluída em uma coluna de alumina previamente ativada. O solvente dos triacilgliceróis purificados foi eliminado em evaporador rotativo a vácuo.

A análise da regiodistribuição dos triacilgliceróis purificados foi determinada utilizando-se  $\alpha$ -monoacilgliceróis preparados por deacilação com brometo de magnésio etílico, de acordo com Turon, Bachain *et al.* (2002). Quarenta miligramas (40mg) dos triacilgliceróis foram dissolvidos em 2mL de éter etílico (previamente tratado com sulfato de sódio anidro) em um tubo com tampa, e então hidrolisados utilizando-se 670µL de brometo de magnésio etílico 3M. A solução foi agitada manualmente em um banho com gelo durante 15 segundos. A reação foi interrompida adicionando-se 300µL de ácido acético. A solução etérea obtida foi lavada duas vezes: primeiro com 5mL de uma solução aquosa de ácido bórico 0,4M e depois com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub> 2%/ácido bórico 0,4M (50:50, v/v).

Uma parte da solução etérea obtida após as etapas de lavagem foi imediatamente aplicada em cromatoplasmas preparativas para a recuperação dos  $\alpha$ -monoacilgliceróis. A placa de CCD havia sido previamente impregnada por imersão total em um banho de solução metanólica de ácido bórico (5%, m/v) durante 20 minutos, sendo posteriormente ativada a 120°C durante 1h.

O sistema de solventes clorofórmio/acetona/ácido acético (85:15:1, v/v/v) foi utilizado para a eluição da amostra. Após a migração, 1cm da placa de CCD foi cortada, imersa em uma solução de revelação (solução de sulfato de cobre em ácido fosfórico) e aquecida a

180°C por 15min em uma estufa. Após a revelação, a banda de  $\alpha$ -monoacilgliceróis ( $R_f=0,26$ ) foi identificada e recuperada do restante da placa de CCD.

A composição em ácidos graxos dos triacilgliceróis purificados e do  $\alpha$ -monoacilglicerol recuperado foi determinada por CG após a conversão destas frações em seus respectivos ésteres metílicos, conforme metodologia descrita no item 3.2.5.

A composição na posição central ( $\beta$ ) dos triacilgliceróis foi então estimada a partir da composição dos ácidos graxos presentes nos  $\alpha$ -monoacilgliceróis ( $AG_{\alpha-MAG}$ ) e nos triacilgliceróis ( $AG_{TAG}$ ) de acordo com a fórmula  $3 \times AG_{TAG} - 2 \times AG_{\alpha-MAG}$ .

### 3.2.8 Teor de água

O teor de água do material de partida (óleo de peixe, glicerol, *tert*-butanol, surfactantes) foi determinado na URI, utilizando-se o equipamento Karl Fischer Modelo DL 50 Graphix (Mettler Toledo). O teor de água foi estimado tomando-se por base a quantidade de reagente padronizado necessária para titular a água presente na alíquota da amostra em ensaio. O teor de água foi obtido por cálculo, utilizando-se a Equação 6:

$$Umidade = \frac{v \cdot f_c}{AAE}$$

**Equação 6**

onde:

$v$  = volume de reagente de Karl Fischer gasto para titular a água presente na amostra (mL);

$f_c$  = fator de correção do equivalente em água capaz de ser neutralizado pelo reagente de Karl Fischer;

$AAE$  = amostra de alíquota ensaiada (mL).

### 3.2.9 Determinação da atividade de água ( $a_w$ ) da enzima

A atividade de água ( $a_w$ ) da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 foi determinada na França, em AquaLab (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EUA).

### 3.2.10 Determinação da atividade enzimática

O procedimento adotado no Brasil para a determinação da atividade de esterificação da lipase foi o descrito na literatura (Oliveira, Feihrmann *et al.*, 2006). A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico e *n*-propanol (razão molar 1:1), a 60°C, com a enzima na proporção de 5% (m/m), mantida sob agitação magnética. Alíquotas de 150µL foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40min de reação e foram diluídas em 20mL de acetona:etanol (1:1). O tempo de reação havia sido previamente determinado pelos autores acima para a Novozym<sup>®</sup> 435. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio 0,01M até pH 11. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de ácido láurico, em µmols, consumido por minuto, nas condições experimentais descritas.

A atividade de esterificação (U) da lipase imobilizada, determinada antes e após as reações, foi calculada utilizando-se a Equação 7:

$$\text{Atividade(U)} = \frac{(V_{\text{NaOH}}^0 - V_{\text{NaOH}}^{40}) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot V_a} \cdot V_r \quad \text{Equação 7}$$

onde:

M = molaridade do NaOH padronizado (mmol/mL);

$V_{\text{NaOH}}^0$  = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

$V_{\text{NaOH}}^{40}$  = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra ao final da reação (mL);

$V_a$  = volume da amostra (mL);

$V_r$  = volume do meio reacional, levando-se em conta a densidade dos substratos à temperatura de 60°C (mL);

t = tempo de reação (minutos);

1U = µmols de ácido/min.

A atividade de esterificação específica (U/mg) da preparação de lipase foi obtida dividindo-se a Equação 7 pela massa de enzima imobilizada utilizada na reação, através da Equação 8:

$$\text{Atividade(U / mg)} = \frac{(V_{\text{NaOH}}^0 - V_{\text{NaOH}}^{40}) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot V_a \cdot m_{\text{enz}}} \cdot V_r \quad \text{Equação 8}$$

onde:

$m_{\text{enz}}$  = massa de lipase imobilizada utilizada na reação (mg).

A atividade enzimática determinada na França seguiu a metodologia acima com as modificações descritas a seguir. Utilizou-se ácido oléico como agente acilante. A reação foi conduzida durante 120min, com a retirada de alíquotas do meio reacional (cerca de 20mg) no tempo zero e após 10, 20, 30, 40, 60 e 120min de reação. As amostras foram diluídas em *n*-hexano, obtendo-se soluções com concentração de 1 ou 5mg/mL. Estas soluções foram aplicadas em placas de vidro para cromatografia em camada delgada (CCD) e eluídas com o sistema de solventes hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v). Após a eluição das amostras, a quantidade de ácido oléico consumido foi determinada por densitometria (200nm), utilizando-se solução de ácido oléico para a construção das curvas de calibração.

Após a quantificação, construiu-se a curva da quantidade de ácido oléico ( $\mu\text{mol}$ ) versus o tempo de reação (min). O coeficiente angular da parte linear da curva assim obtida fornecia o valor da velocidade inicial da reação de consumo do ácido oléico, o qual corresponde à atividade da enzima. Sendo assim, uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima imobilizada que conduz ao consumo de  $1\mu\text{mol}$  de ácido oléico por minuto nas condições experimentais descritas.

### **3.3 AÇÃO DA NOVOZYM<sup>®</sup> 435 SOBRE OS SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO**

Esta etapa foi realizada no Laboratoire de Lipotechnie do CIRAD em Montpellier, França.

#### **3.3.1 Protocolo experimental para as reações para verificar a ação da Novozym<sup>®</sup> 435 sobre os surfactantes**

A não ser que estabelecido de outra forma, 3g de glicerol, previamente tratado com sulfato de sódio anidro, foram misturados com 0,3g de cada um dos surfactantes listados no item 3.1. A lipase foi adicionada na proporção de 10% (em massa, em relação à mistura de reagentes). As reações foram conduzidas a 55°C em uma estufa, sob agitação magnética.

Após estes ensaios preliminares, avaliou-se, com maior profundidade, a ação da lipase sobre o surfactante Tween 85, utilizando-se diferentes meios reacionais. As reações conduzidas nesta etapa estão detalhadas a seguir: (a) mistura de glicerol e de Tween 85 (10%, m/m em relação ao glicerol); (b) água e Tween 85 (10%, m/m em relação à água); (c) glicerol e óleo de peixe (2:1, mol/mol); (d) glicerol e óleo de peixe (2:1, mol/mol) com 10% (m/m, em relação ao total de reagentes) de Tween 85. Nestes sistemas, a lipase foi adicionada na proporção de 10% (m/m) em relação aos reagentes (glicerol+surfactante ou glicerol+água ou glicerol+óleo+surfactante ou glicerol+óleo). Algumas reações foram conduzidas na ausência da lipase (controle). Todas as reações foram conduzidas a 55°C durante intervalos de tempo variáveis.

Algumas das reações descritas acima foram conduzidas na ausência e na presença de nitrogênio, para verificar a ocorrência de oxidação do óleo de peixe e/ou do surfactante Tween 85 durante a reação.

Ao final do tempo de reação, o meio foi dissolvido em 5mL de *n*-hexano e etanol (1:1, v/v) e filtrado com uma micro-seringa para a remoção do catalisador. Este procedimento foi repetido três vezes, para a lavagem da enzima. Os solventes foram evaporados em um banho-maria sob temperatura de 35°C e corrente de nitrogênio.

### 3.3.2 Análise qualitativa

As reações foram acompanhadas qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD), mediante a separação das frações lipídicas presentes nas amostras ao final do tempo de reação. As amostras recuperadas conforme descrito na seção 3.3.1 foram dissolvidas em *n*-hexano (20mg/mL). Um volume de 10 $\mu$ L desta solução foi aplicado, com o auxílio de um aplicador automático (Linomat IV, CAMAG), em placas de vidro para CCD (10cm comprimento x 20cm largura) contendo sílica gel 60 (Merck, Alemanha). Testaram-se dois sistemas de solventes para a eluição das amostras: clorofórmio/metanol/água (95:20:2,5, v/v/v) e hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v). Este foi selecionado para os experimentos desta etapa. Após o desenvolvimento das amostras, uma solução de sulfato de cobre em ácido fosfórico (solução 50:50, v/v, de sulfato de cobre saturado e ácido fosfórico 85%) foi borrifada sobre as placas, as quais foram imediatamente ativadas em estufa (100°C, 10min)

para a revelação das manchas. Para esta análise, foram aplicadas nas placas de CCD as soluções listadas a seguir, utilizadas como padrões: ácido oléico (AGL), 1-oleína (MAG), 1,3-dioleína (DAG), óleo de peixe OmegaPure (TAG), oleato de etila (EEAG C18:1) e glicerol P.A. Soluções dos surfactantes puros também foram aplicadas nas placas.

### 3.3.3 Identificação de substâncias formadas durante as reações

Para identificar substâncias formadas nas reações com o Tween 85 descritas na seção 3.3.1, e não identificadas com base nos padrões utilizados na análise qualitativa por CCD, realizou-se uma placa de CCD preparativa. Para isto, preparou-se uma solução de 500mg de meio reacional/mL de hexano. Aplicou-se um volume de 400 $\mu$ L desta solução em uma placa de vidro com sílica gel 60G, em uma largura de 17cm. Após a eluição da amostra com hexano/éter etílico /ácido acético (80:20:1, v/v/v), sistema de solventes previamente selecionado, as manchas referentes às substâncias não identificadas foram raspadas da placa, extraídas com *n*-hexano e analisadas por cromatografia líquida/espectrometria de massa (CL-EM).

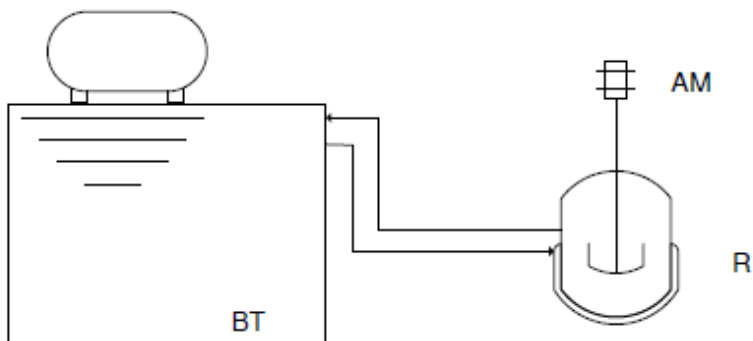
## 3.4 REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS

As reações em meio contendo *tert*-butanol e em meio contendo surfactante de grau alimentício foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI-Campus de Erechim, em Erechim, RS, Brasil. As reações em meio livre de solvente e de surfactante foram realizadas no Laboratoire de Lipotechnie do CIRAD em Montpellier, França.

### 3.4.1 Descrição do aparato experimental para as reações de glicerólise

A unidade experimental utilizada para a condução das reações de glicerólise enzimática desenvolvidas no Brasil consistiu em um reator de vidro encamisado com volume útil de 40mL, fechado, coberto com papel alumínio, dotado de um agitador mecânico e conectado a um banho termostático, para o controle da temperatura da reação. Na Figura

12, é apresentado um esquema do aparato utilizado nos experimentos realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI-Campus de Erechim, em Erechim (RS).



**Figura 12** – Diagrama esquemático do aparato experimental para as reações de glicerólise enzimática com *tert*-butanol e com surfactantes. BT – Banho termostático de recirculação, AM – Agitador mecânico e R – Reator de vidro encamisado com capacidade de 40mL.

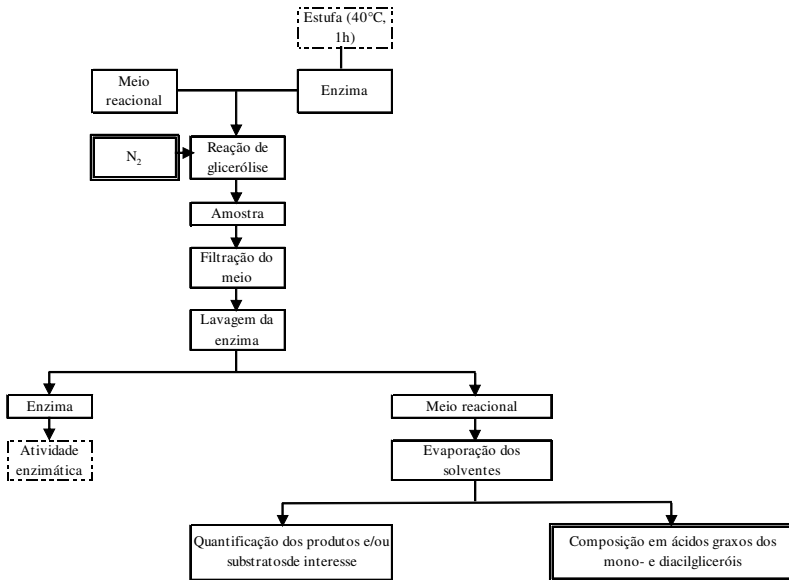
A unidade experimental utilizada para a condução das reações de glicerólise enzimática na França consistiu em um frasco de vidro com tampa, com volume útil de 30mL, agitado em um banho termostatizado do tipo Dubnoff.

### 3.4.2 Protocolo experimental para as reações de glicerólise

O protocolo experimental geral adotado para as reações de glicerólise seguiu o fluxograma indicado na Figura 13.

Em relação aos ensaios desenvolvidos no Brasil, antes das reações de glicerólise enzimática, a lipase imobilizada era condicionada em estufa a 40°C por 1 hora, segundo indicação do fornecedor da enzima. Para as reações, as quantidades pré-determinadas de óleo de peixe, glicerol, surfactante e/ou solvente eram pesadas em balança analítica e adicionadas ao reator de vidro encamisado conectado ao banho termostático, com temperatura previamente ajustada e constante. Em seguida, adicionava-se a quantidade necessária da enzima, já condicionada, e acoplava-se o agitador. Fechava-se o reator, ajustava-se

a agitação, mantida em 600rpm em todos os experimentos, e iniciava-se a reação.



**Figura 13** - Esquema do procedimento adotado para as reações de glicerólise e para o tratamento das amostras. Borda simples: etapas realizadas no Brasil e na França; borda pontilhada: etapa realizada no Brasil; borda dupla: etapa realizada na França.

Ao final do tempo de reação, o agitador e o banho termostático eram desligados e a haste do agitador era retirada do reator. Retirava-se uma alíquota (cerca de 500µL) do meio reacional para análise por cromatografia em fase gasosa (CG). Em seguida, o meio era filtrado a vácuo para a separação da enzima imobilizada e dos produtos da reação. A enzima recuperada era lavada com *n*-hexano (três lavagens com 20mL cada de *n*-hexano) e armazenada sob refrigeração, para a determinação posterior da atividade enzimática residual. Alternativamente, testou-se a mistura *n*-hexano/etanol 96% (1:1, v/v) para a lavagem da enzima recuperada no fim da reação, realizando-se três lavagens com 20mL cada desta mistura de solventes. Amostras sem a enzima eram transferidas para frascos de amostragem e armazenadas a -20°C sob atmosfera inerte. Testou-se a eliminação dos solventes utilizando-se três técnicas diferentes: estufa a vácuo (60°C; 0,5bar) até peso constante; estufa a vácuo por 1h seguido de aquecimento sob corrente de



nitrogênio até peso constante; evaporador rotativo a vácuo a 65°C e 60mmHg.

Para os experimentos desenvolvidos na França, inicialmente, testou-se o condicionamento da enzima pela temperatura, mas, com base nos resultados obtidos, os demais experimentos foram conduzidos sem a realização deste procedimento. Para as reações, as quantidades pré-determinadas de óleo de peixe e glicerol eram pesadas em balança analítica (Sartorius) e adicionadas ao frasco de vidro com tampa. Em seguida, adicionava-se a quantidade necessária da enzima, inertizava-se o frasco com nitrogênio e colocava-se no banho-maria termostaticado, com a temperatura previamente ajustada. Iniciava-se a agitação, para dar início à reação. A reação foi acompanhada durante 48h, retirando-se alíquotas (3 gotas, referentes a cerca de 20mg) em intervalos regulares, com uma pipeta Pasteur. Após cada retirada de amostra, injetava-se nitrogênio dentro do frasco de reação, que era imediatamente fechado e recolocado no banho-maria. As amostras retiradas eram dissolvidas em 3mL de uma mistura de *n*-hexano/etanol (1:1, v/v) e filtradas em microseringa, para a remoção do catalisador. Este procedimento de adição de solventes era repetido 3 vezes, para a lavagem da enzima. Os solventes eram evaporados em banho-maria a 35°C, sob corrente de nitrogênio. As amostras eram inertizadas e armazenadas sob refrigeração para análise posterior.

### 3.4.3 Acompanhamento qualitativo das reações de glicerólise

O perfil lipídico das amostras, para o monitoramento qualitativo das reações, foi realizado, no Brasil, por CCD, utilizando-se cromatofolhas de alumínio contendo sílica gel e revelador de fluorescência. Foram testadas diferentes fases eluentes: hexano/éter etílico/ácido fórmico (80:20:2, v/v/v), *n*-hexano/acetato de etila (9,8:0,2, v/v) e clorofórmio/acetona/metanol (95:4,5:0,5, v/v/v), sendo que o primeiro sistema de eluição foi escolhido para a análise. A visualização das manchas foi feita com luz ultravioleta (254nm) e com vapor de iodo (Christie, 1982). Para esta análise, foram utilizados os seguintes padrões: ácido oléico (AGL), monooleína (MAG), dioleína (DAG) e dipalmitina (DAG). O óleo de peixe OmegaPure foi utilizado como padrão de triacilgliceróis (TAG).

Na França, as reações também foram acompanhadas qualitativamente por CCD, de acordo com a metodologia descrita acima, utilizando-se o sistema de solventes hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v) para a eluição das amostras.

### 3.4.4 Determinação dos produtos de interesse

No Brasil, a determinação do teor de di- e triacilgliceróis presentes nas amostras foi realizada por cromatografia em fase gasosa (CG).

Para esta quantificação, foram utilizados *n*-heptano, piridina, derivatizante MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoracetamida), padrões externos: di- e triacilgliceróis do ácido oléico, de grau cromatográfico e de procedência Sigma-Aldrich. Padrões externos de di- e triacilgliceróis dos ácidos palmítico, linoléico e linolênico foram utilizados para a verificação da região de eluição destas frações lipídicas.

As condições de análise e o preparo das soluções de calibração e das amostras foram realizados segundo Norma DIN EN nº 14105 do Comitê Europeu para Padronizações (2003), com as modificações propostas na literatura (Valério, Krüger *et al.*, 2009).

Antes da injeção, as amostras foram previamente fundidas em banho-maria e homogeneizadas em vórtex. Em um balão volumétrico de 10mL, previamente tarado, adicionaram-se cerca de 3 gotas da amostra (50-60mg). Anotou-se a massa e adicionou-se uma quantidade correspondente do derivatizante MSTFA (previamente homogeneizado no vórtex), em volume. Após agitação com o vórtex, a mistura permaneceu sob repouso durante 15min. Ao final deste tempo, completou-se o balão com *n*-heptano. As amostras silanizadas foram analisadas em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010, com injetor automático e *on-column* e detector de ionização de chama (CG-DIC). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (J&W Scientific, nº de série: US7162944H), com dimensões 30m x 0,25mm x 0,1µm. As condições de operação foram: Temperatura do detector: 380°C; Programação da temperatura da coluna: 50°C por 1 minuto, 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C, 10°C/min até 380°C, permanecendo nesta temperatura por 8 min. Gás de arraste: Hidrogênio (pressão 80kPa); Volume injetado: 1,0µL. Esta análise foi realizada no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI-Campus de Erechim. As amostras foram injetadas em duplicata e os resultados foram expressos em teor percentual mássico, em relação ao total de amostra.

Na França, determinou-se o teor de mono- e diacilgliceróis produzidos ao longo das reações de glicerólise, utilizando-se a técnica de cromatografia de camada delgada de alto desempenho (CCD-AD) aliada à densitometria, com base em método previamente descrito na literatura (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a), com as modificações descritas a seguir. Para isto, as amostras foram dissolvidas em *n*-hexano (1, 4 ou

20mg/mL). A solução lipídica resultante foi aplicada em placas de vidro para CCD e as frações lipídicas de interesse foram detectadas por densitometria. O sistema de análise (CAMAG) consistia de um aplicador automático de amostras (Linomat 5, CAMAG), um Scanner de densitometria (TLC Scanner 3, CAMAG), e o Software Wincats. Placas de vidro para CCD (20 x 10cm, sílica gel 60, Merck, Darmstadt, Alemanha) foram previamente desenvolvidas (lavadas) com clorofórmio, em uma câmara de desenvolvimento horizontal CCD-AD (CAMAG), e secas a 115°C por 30min antes do uso. Cinco a dez microlitros da amostra diluída em *n*-hexano foram aplicados em cromatoplasas de vidro utilizando-se o equipamento Linomat 5. Em cada placa, soluções de padrões (ácido oléico, mono-, di- e triacilgliceróis em *n*-hexano) também foram aplicadas. Soluções de mono- e diacilgliceróis foram usadas para calibração. Diferentes proporções de solventes foram testadas como sistema de eluição, de forma a haver uma separação adequada dos ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis, conforme segue: hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1; 60:40:1; 70:30:1; 80:20:1, v/v/v), hexano/éter etílico (50:50, v/v), clorofórmio/acetona (90:10, v/v). Para a análise, a câmara de desenvolvimento horizontal foi saturada durante 2min com o sistema de eluição selecionado (hexano/éter etílico/ácido acético, 65:35:1, v/v/v) antes da migração. Após o desenvolvimento das amostras, a placa foi seca durante 3min. A placa foi então lida, linha por linha, a 200nm (faixa da luz ultravioleta, UV) sem revelação prévia, utilizando-se o densitômetro TLC Scanner 3 (CAMAG). Este comprimento de onda foi selecionado previamente, para a identificação das frações lipídicas de interesse. É importante mencionar que a resposta da UV é fortemente dependente do grau de insaturação de cada ácido graxo que constitui a amostra. Os dados da leitura da placa foram processados pelo software Wincats. O teor de mono- e diacilgliceróis foi expresso com base na massa total de amostra. Os valores apresentados são a média de duas análises. Quando avaliada, a conversão molar dos triacilgliceróis foi calculada com base na estequiometria da reação de glicerólise.

Para a quantificação dos mono- e diacilgliceróis, testou-se também a revelação das placas de CCD e posterior quantificação por densitometria. As placas foram imersas em uma solução de sulfato de cobre em ácido fosfórico e secas a 180°C por 15min em uma estufa para a revelação das manchas. Após resfriamento à temperatura ambiente, as placas foram lidas no densitômetro a 510nm (TLC Scanner 3, CAMAG) e os dados foram tratados no software Wincats. Alternativamente, as cromatoplasas reveladas foram digitalizadas e salvas no nível de cinza.

Os picos obtidos foram analisados utilizando-se o software ImageJ (ImageJ 1.43u/Java 1.6.0\_10, 32 bit). Neste caso, os picos foram integrados vale a vale ou utilizando-se a área total abaixo deles. Observou-se que nenhum dos métodos de leitura das placas reveladas foi eficaz, já que as soluções das amostras encontravam-se demasiadamente concentradas, provocando a saturação dos picos para estes tratamentos. Além disso, houve uma grande interferência da coloração da placa (“ruído de fundo”) para a quantificação dos picos a 510nm. Por estes motivos, todos os resultados apresentados são referentes às placas que não haviam sido submetidas à revelação e que foram lidas a 200nm por densitometria.

#### ***3.4.4.1 Produção de padrões de mono- e diacilgliceróis para análise por CCD-AD/Densitometria***

Para a quantificação de mono- e diacilgliceróis por CCD-AD/Densitometria, etapa desenvolvida na França, definiu-se um protocolo para a hidrólise do óleo de peixe, visando à produção dos padrões de mono- e diacilgliceróis. As condições da reação de hidrólise foram as seguintes: 55°C, 250rpm (incubadora com agitação orbital), 3g de água, 0,3g de óleo de peixe, 0,3g da Novozym<sup>®</sup> 435. A reação foi acompanhada durante 24h.

Após a produção dos mono- e diacilgliceróis no tempo adequado (4h), estes acilgliceróis parciais foram diluídos em *n*-hexano (200mg/mL) e purificados por CCD preparativa. Os sistemas de eluição clorofórmio/metanol (90:10, v/v) e hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v) foram empregados para o isolamento dos mono- e diacilgliceróis, respectivamente.

#### **3.4.5 Composição em ácidos graxos dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis**

Para os experimentos desenvolvidos na França, determinou-se a composição em ácidos graxos dos mono- e diacilgliceróis produzidos nas reações de glicerólise. Para tanto, amostras do meio reacional, recuperadas como descrito na seção 3.4.2, foram diluídas em *n*-hexano (200mg/mL) e purificadas por CCD preparativa. O sistema de eluição hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v) foi utilizado para o isolamento dos mono- e diacilgliceróis produzidos durante as reações de

glicerólise. Após migração, 1cm da placa de CCD foi cortado, imerso em uma solução de revelação (solução de sulfato de cobre em ácido fosfórico) e aquecido a 180°C por 15min em uma estufa. Após revelação, as bandas de mono- e diacilgliceróis foram identificadas e recuperadas do restante da placa.

A sílica recuperada da placa de CCD, contendo as frações de mono- e diacilgliceróis, foi imediatamente submetida à esterificação para a obtenção dos respectivos ésteres metílicos, os quais foram analisados por CG, conforme descrito anteriormente no item 3.2.6.

### 3.4.6 Condicionamento da Novozym<sup>®</sup> 435 pela temperatura

Nesta etapa, realizada na França, avaliou-se a influência do condicionamento prévio da enzima sobre o teor de mono- e diacilgliceróis formados durante a reação de glicerólise. Para tanto, a lipase imobilizada foi previamente colocada em estufa a 40°C, durante 1h, com o objetivo de reduzir sua atividade de água e, conseqüentemente, a possibilidade de reações de hidrólise do óleo utilizado como substrato nas reações de glicerólise. Para estas reações, os substratos foram adicionados numa proporção molar de 2:1 (glicerol:óleo de peixe), totalizando uma massa de 3g de reagentes. A lipase condicionada foi adicionada em uma proporção mássica de 10% (em relação ao total de substratos). As reações de glicerólise foram conduzidas a 55°C por 24h em um incubador com agitação orbital constante (250rpm). Amostras do meio reacional (3 gotas) foram retiradas ao longo do tempo, dissolvidas em 2mL de uma solução de *n*-hexano/etanol (1:1, v/v) e filtradas com uma micro-seringa para a remoção do catalisador, sendo diretamente transferidas para um tubo de vidro com tampa. Esta operação de lavagem da enzima foi repetida 3 vezes. Os solventes foram eliminados em um banho-maria a 35°C, sob corrente de nitrogênio. O meio reacional foi inertizado e armazenado sob temperatura de refrigeração para posterior análise qualitativa por CCD. Para fins de comparação, esta reação também foi realizada com a lipase não condicionada.

Posteriormente, esta etapa do trabalho foi realizada novamente, em banho-maria do tipo Dubnoff, conforme descrito na seção 3.4.2, para utilizar o mesmo sistema reacional utilizado nos experimentos de glicerólise em meio livre de solvente e de surfactante. Estas amostras foram analisadas quantitativamente por CCD-AD/Densitometria.

### 3.4.7 Ensaios preliminares

Foram realizados ensaios preliminares, no Brasil, para comparar o teor de diacilgliceróis obtidos utilizando-se os diferentes meios reacionais testados neste trabalho. Para tanto, as condições experimentais da glicerólise do óleo de peixe foram mantidas fixas, conforme especificado a seguir para cada meio reacional. Nesta etapa, o Índice de Peróxido do meio e a atividade enzimática foram determinados após as reações.

As condições indicadas foram escolhidas com base em diferentes estudos sobre reações de glicerólise catalisadas pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, em diferentes meios reacionais (Torres, Lin *et al.*, 2002; Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005b; a; Pawongrat, Xu *et al.*, 2008; Valério, 2009; Valério, Krüger *et al.*, 2009). Também levou-se em conta a faixa de temperatura de trabalho para esta lipase (40-70°C), informada pelo fabricante (Novozymes). A relação molar glicerol:óleo de peixe utilizada (2:1) foi definida considerando-se a relação estequiométrica para a formação de monoacilgliceróis, na reação de glicerólise de triacilgliceróis (Bornscheuer, 1995). Para a escolha do *terc*-butanol como solvente orgânico, levou-se em conta que a literatura indica que, ao contrário de outras lipases, a enzima Novozym<sup>®</sup> 435 não apresenta redução na atividade quando utilizada em meio contendo este álcool terciário (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a).

#### 3.4.7.1 Meio reacional com surfactante

A reação foi realizada nas condições seguintes: cerca de 15g de substratos (mistura de glicerol e óleo), adicionados na proporção molar glicerol/óleo de peixe 2:1. O surfactante e a lipase foram adicionados na proporção de 10% cada (m/m, em relação à mistura de óleo e glicerol). A reação foi realizada a 55°C sob agitação mecânica constante, durante 2 horas. Nesta etapa, foram testados todos os surfactantes listados no item 3.1.

#### 3.4.7.2 Meio reacional com solvente orgânico

O reator foi alimentado com o glicerol e o óleo de peixe (2:1, mol/mol). Em seguida, adicionou-se *terc*-butanol (1:1, v/v, em relação

ao total de glicerol e óleo), totalizando 35mL de meio reacional, e a enzima (10%, m/m, em relação à mistura glicerol e óleo). A reação foi realizada a 55°C sob agitação mecânica constante, durante 2 horas.

### **3.4.7.3 Meio reacional livre de solvente orgânico e de surfactante**

O reator foi alimentado com o glicerol e o óleo de peixe (2:1, mol/mol), sendo que o teor total destes substratos foi de aproximadamente 15g. A enzima foi adicionada na proporção de 10% em massa, em relação ao total de glicerol e de óleo. A reação foi realizada a 55°C sob agitação constante, durante 24 horas. Este tempo foi definido com base nos estudos encontrados na literatura para reações na ausência de solvente orgânico, considerando-se a baixa transferência de massa neste sistema.

### **3.4.8 Planejamento experimental**

Após as reações preliminares, definiu-se um planejamento experimental para avaliar os efeitos e as interações dos fatores mais influentes sobre a obtenção dos produtos de interesse nas reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe, para cada meio reacional selecionado nos ensaios preliminares (item 3.4.7).

Em relação aos experimentos realizados no Brasil para o meio na presença de Tween 65 (selecionado na etapa anterior) e para o meio na presença de *tert*-butanol, definiu-se um planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central (Tabela 4). As variáveis estudadas foram proporção molar de substratos (glicerol e óleo), concentração de enzima e temperatura da reação, concentração de Tween 65 e/ou *tert*-butanol. Nestes ensaios, a agitação foi mantida em 600rpm e o tempo de reação foi fixado em 2 horas, com base em pesquisa com sistema semelhante (Krüger, Valério *et al.*, 2010). Os resultados (fração mássica percentual de diacilgliceróis) foram analisados em um nível de confiança de 95% com o auxílio do software Statística<sup>®</sup> 7.0 (Statsoft Inc). Nesta etapa, também determinou-se o teor de triacilgliceróis presentes ao final da reação.

**Tabela 4.** Nível das variáveis investigadas no planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  para a reação de glicerólise enzimática em meio com surfactante e em meio com *tert*-butanol.

Níveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40	55	70
Glicerol:óleo de peixe, G:O (mol/mol)	1:1	2:1	3:1
Enzima imobilizada, [E] (% , m/m, em relação ao óleo de peixe e glicerol)	5	10	15
Solvente:substratos (v/v)	1:1	3:1	5:1
Surfactante (% , m/m, em relação ao óleo de peixe e glicerol)	5	10	15

Para o meio contendo somente glicerol e óleo de peixe, investigado na França, definiu-se um planejamento fatorial completo  $2^3$  com triplicata no ponto central. O delineamento experimental teve por objetivo o cálculo dos efeitos principais e a identificação, dentre as variáveis estudadas, daquelas que influenciam significativamente a obtenção de mono- e diacilgliceróis durante as reações de glicerólise de óleo de peixe catalisadas pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435. As variáveis estudadas foram proporção molar de substratos (glicerol e óleo), concentração de enzima e temperatura de reação, avaliados nos níveis indicados na Tabela 5. Nestes ensaios, as reações foram conduzidas durante 48 horas, a não ser que especificado de outra forma. Realizou-se um estudo cinético da formação de mono- e diacilgliceróis para cada uma das reações do planejamento experimental. As amostras foram analisadas quantitativamente por CCD-AD/Densitometria. Os resultados foram expressos em termos da fração mássica (%) de mono- e diacilgliceróis (em relação ao total de substratos) formados ao longo do tempo. Os resultados obtidos nesta etapa também foram tratados estatisticamente, em um nível de confiança de 95%, pelo software Statística 7.0 no tempo de 24 horas, no qual o equilíbrio havia sido atingido para a maioria das reações.

Os níveis apresentados nas Tabelas 4 e 5 para os diferentes fatores foram definidos com base em diferentes publicações (Torres, Lin *et al.*, 2002; Damstrup, Jensen *et al.*, 2005; Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005b; a; Pawongrat, Xu *et al.*, 2008; Valério, Krüger *et al.*, 2009).



**Tabela 5.** Nível das variáveis investigadas no planejamento fatorial completo  $2^3$  para a reação de glicerólise enzimática em meio livre de solvente e de surfactante.

Níveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40	55	70
Glicerol:óleo de peixe, G:O (mol/mol)	1:1	4:1	7:1
Enzima imobilizada, [E] (% m/m, em relação ao óleo de peixe e glicerol)	5	10	15

### 3.4.9 Velocidade inicial de reação, produtividade e conversão

Com base no estudo cinético das reações de glicerólise no meio livre de solvente e de surfactante, realizadas na França, construiu-se o gráfico do teor molar específico de mono- e diacilgliceróis ( $\text{mmol.g}^{-1}$  de meio reacional) em função do tempo de reação (h). O coeficiente angular da parte linear da curva assim obtida, calculado utilizando-se o *software* OriginPro 7.5, corresponde à velocidade inicial específica da reação, expressa em  $\text{mmol}$  de mono- ou diacilgliceróis. $\text{g}^{-1}$  de meio reacional. $\text{h}^{-1}$ .

Para estes experimentos, a produtividade em mono- e diacilgliceróis foi determinada para avaliar o desempenho do processo enzimático sob diferentes condições, tendo sido calculada conforme a Equação 9:

$$P_x = \frac{C - C_0}{t}$$

**Equação 9**

onde:

$P_x$  = produtividade em mono- ou diacilgliceróis ( $\text{mmol.g}^{-1}$  meio reacional. $\text{h}^{-1}$ ) no equilíbrio da reação;

$C$  = teor de mono- ou diacilgliceróis ( $\text{mmol.g}^{-1}$  meio reacional) no tempo  $t$  (equilíbrio da reação);

$C_0$  = concentração de mono- ou diacilgliceróis ( $\text{mmol.g}^{-1}$  meio reacional) no tempo zero;

$t$  = tempo no equilíbrio da reação (h).

Quando avaliada, a conversão molar de triacilgliceróis foi calculada com base na Equação 10:

$$\text{Convers\~{a}o}_{TAG,t} \% = \frac{TAG_t}{TAG_i} * 100$$

**Equação 10**

onde:

Convers\~{a}o<sub>TAG,t</sub> ,% = convers\~{a}o molar de triacilgliceróis, no tempo *t* de rea\~{c}\~{a}o;

TAG<sub>t</sub>= quantidade de triacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo *t*, obtida por c\~{a}lculo, com base na estequiometria da rea\~{c}\~{a}o;

TAG<sub>i</sub>= quantidade de triacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo zero de rea\~{c}\~{a}o, calculada com base na quantidade adicionada de \~{o}leo de peixe, em massa, e na massa molar do \~{o}leo.

Para o c\~{a}lculo da quantidade de triacilgliceróis (mmol), presentes no tempo *t* (TAG<sub>t</sub>), utilizou-se a Equa\~{c}\~{a}o 11. Para este c\~{a}lculo, considerou-se a aus\~{e}ncia de \~{a}cidos graxos livres no meio reacional.

$$TAG_t = \frac{3 * TAG_i + 2 * DAG_i - 2 * DAG_t - MAG_t}{3}$$

**Equação 11**

onde:

TAG<sub>t</sub>= quantidade de triacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo *t*;

TAG<sub>i</sub>= quantidade de triacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo zero de rea\~{c}\~{a}o, calculada com base na quantidade adicionada de \~{o}leo de peixe, em massa, e na massa molar do \~{o}leo;

DAG<sub>i</sub>= quantidade de diacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo zero de rea\~{c}\~{a}o, obtida com base na quantifica\~{c}\~{a}o por CCD-AD/Densitometria;

DAG<sub>t</sub>= quantidade de diacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo *t* de rea\~{c}\~{a}o, obtida com base na quantifica\~{c}\~{a}o por CCD-AD/Densitometria;

MAG<sub>t</sub>= quantidade de monoacilgliceróis, em mmol, presentes no tempo *t* de rea\~{c}\~{a}o, obtida com base na quantifica\~{c}\~{a}o por CCD-AD/Densitometria.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos relacionados à caracterização do óleo de peixe e dos demais substratos, à ação da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 sobre os surfactantes de grau alimentício, bem como às reações de glicerólise enzimática, objetivando a produção de mono- e diacilgliceróis, em diferentes meios reacionais. Estes resultados serão apresentados separadamente, de acordo com as etapas realizadas no Brasil (seções 4.1, 4.3.1 e 4.3.2) e na França (seções 4.1.1, 4.2 e 4.3.3).

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Na Tabela 6, é apresentada a caracterização do óleo de peixe OmegaPure, utilizado como substrato para as reações de glicerólise.

**Tabela 6.** Caracterização do óleo de peixe comercial refinado OmegaPure.

Análise	Valor	Metodologia
Índice de acidez (% em ácido oléico)*	0,137	AOCS Ca 5a-40 (1989)
Índice de acidez total (%)*	0,272	AOCS Ca 5a-40 (1989)
Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg óleo)**	0,449	AOCS Cd 8-53 (1990)
Índice de saponificação (mg KOH/g óleo)**	202,37	AOCS Cd 3-25 (1990)
Densidade relativa (g/mL)	0,930	AOCS Cc 10a-25 (1990)
Viscosidade a 25°C (cP)	40,03	Viscosímetro Brookfield
Viscosidade a 40°C (cP)	24,51	Viscosímetro Brookfield
Viscosidade a 55°C (cP)	15,96	Viscosímetro Brookfield
Viscosidade a 70°C (cP)	11,11	Viscosímetro Brookfield

\* Média de duas determinações. \*\* Média de três determinações.

Os resultados encontrados para índices de acidez, peróxido e saponificação, e para a densidade relativa do óleo de peixe OmegaPure condizem com as especificações do fornecedor (OmegaProtein). O índice de peróxido encontrado, no valor de 0,449 miliequivalentes de oxigênio/kg óleo, atende os padrões das regulamentações nacionais e internacionais referentes a óleos para consumo humano (FAO-WHO, 1981, revisão 1999; FDA, 1995, revision 2003; Brasil, 2005).

Na Tabela 7, está apresentada a composição em ácidos graxos do óleo de peixe OmegaPure, determinado conforme procedimento descrito na seção 3.2.6. Este óleo apresenta seis ácidos graxos majoritários: ácidos mirístico (8,65%), palmítico (18,48%), palmitoléico (11,47%), oléico (10,15%), EPA (13,34%) e DHA (13,34%). Este substrato é, portanto, rico nos ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA, os quais totalizam 26,68%, o que é uma característica comum para óleos de origem marinha (Pigott e Tucker, 1990; Stansby, 1990; Gunstone, Harwood *et al.*, 1994; Pessatti, 2001). Constitui-se, portanto, em um substrato com potencialidades para a elaboração de emulsificantes (mono- e diacilgliceróis) funcionais.

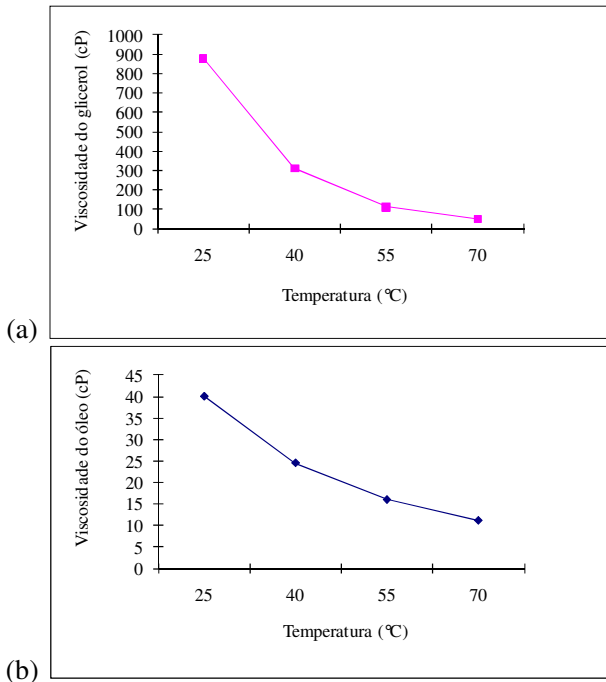
**Tabela 7.** Composição em ácidos graxos do óleo de peixe comercial refinado OmegaPure.

	Ácido graxo	% (m/m)
C14:0	Mirístico	8,65
C16:0	Palmítico	18,48
C16:1	Palmitoléico	11,47
C18:0	Esteárico	3,60
C18:1	Oléico	10,15
C18:2	Linoléico	2,10
C18:3	Linolênico	1,71
C18:4	Estearidônico	3,14
C20:4	Araquidônico	1,21
C20:5	EPA	13,34
C22:5	Docosapentaenóico (DPA)	2,47
C22:6	DHA	13,34

Análise por CG realizada na UNICAMP, conforme descrito em 3.2.6.

Na Figura 14, está apresentada a variação da viscosidade do glicerol e do óleo de peixe em função da temperatura, sendo que os valores para a viscosidade do óleo já haviam sido indicados na Tabela 6. Observa-se que o aumento da temperatura provoca uma redução considerável na viscosidade destas substâncias. A utilização de ambos substratos torna-se interessante às temperaturas aplicadas nas reações de glicérolise, especialmente no caso do glicerol, cuja viscosidade à temperatura ambiente (25°C) é extremamente alta. A literatura indica viscosidades de  $29,8 \pm 0,7$  a  $39,2 \pm 0,4$  cP para óleos de canola e óleos vegetais de fritura (Dmytryshyn, Dalai *et al.*, 2004). A redução observada na viscosidade do glicerol e do óleo de peixe com as

temperaturas aplicadas nas reações deve contribuir para o aumento da transferência de massa durante a glicerólise enzimática.



**Figura 14** – Variação da viscosidade (a) do glicerol e (b) do óleo de peixe OmegaPure em função da temperatura.

Dados da viscosidade do óleo de peixe já apresentados na Tabela 6. Os eixos das ordenadas não têm a mesma escala para os dois gráficos.

Na Tabela 8 está apresentado o teor de água dos substratos, solvente e surfactantes utilizados nas reações de glicerólise enzimática, a saber: óleo de peixe, glicerol, *tert*-butanol, Tween 65, 80 e 85, e lecitina de soja, conforme resultados da análise das amostras por Karl Fischer, descrita no item 3.2.8.

Para direcionar a reação enzimática para a hidrólise ou para a síntese de moléculas, é fundamental controlar a atividade de água, o teor de água e/ou a água contida na preparação de lipase, na mistura de substratos e aquela porventura formada durante a reação (Halling, 2002). A atividade de síntese apresentada pelas lipases geralmente é potencializada em um meio com teor de água residual de 0,5 a 1% (podendo chegar a 11%, m/v) (Villeneuve, 2007).

**Tabela 8.** Teor de água dos substratos, solvente e surfactantes utilizados nas reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe.

Amostra	Teor de água*
Óleo de peixe OmegaPure	0,54%
Glicerol P.A.	0,60%
<i>Terc</i> -butanol	0,73%
Tween 65	n.d.
Tween 80	2,88%
Tween 85	5,49%
Lecitina de soja	n.d.

\* Média de três determinações. n.d.: não determinado. Análise por Karl Fischer, descrita no item 3.2.8.

Sendo assim, os substratos (óleo de peixe e glicerol P.A.) utilizados neste trabalho apresentam um teor de água suficiente para que a Novozym<sup>®</sup> 435 atue de forma satisfatória como catalisador da reação de interesse. Entre os resultados apresentados na tabela acima, entretanto, supõe-se que a aplicação dos surfactantes Tween 80 e, principalmente, Tween 85, possa influenciar significativamente no teor de água do meio reacional, em especial quando adicionados na proporção de 15% (m/m) em relação ao total dos substratos. O teor de água do Tween 85 pode explicar a reatividade deste surfactante nas reações enzimáticas investigadas na seção 4.2.

#### 4.1.1 Regiodistribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis do óleo de peixe

Na França, realizou-se novamente a determinação da composição em ácidos graxos, e dos índices de acidez e peróxido do óleo de peixe OmegaPure, para o monitoramento da qualidade deste substrato. Paralelamente, realizou-se a análise da regiodistribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis deste lipídio, descrita na seção 3.2.7. Os resultados das análises por CG, para a determinação da composição do óleo, estão apresentados na Tabela 9. Os índices de acidez e peróxido apresentados por este substrato foram de 0,056% (em ácido oléico) e 0,7536meq O<sub>2</sub>/kg óleo, respectivamente, segundo metodologia da AFNOR (1985).

**Tabela 9.** Composição em ácidos graxos<sup>1</sup> (%) do óleo de peixe OmegaPure e análise da regiodistribuição dos seus triacilgliceróis purificados.

Ácido graxo	Óleo de peixe (%)	TAG purificado (%)	$\alpha$ -MAG (%)	$\beta$ -MAG (%)
Mirístico	7,89	8,77	9,22	7,88
Palmítico	16,77	19,71	23,43	12,27
Palmitoléico	10,46	11,95	12,11	11,64
Esteárico	3,24	3,93	7,33	0
Oléico (n-9)	6,24	7,88	12,76	0
Oléico (n-7)	3,05	3,43	4,88	0,52
Linoléico	1,49	1,74	3,40	0
Linolênico	1,55	1,71	1,91	1,31
Estearidônico	2,83	2,79	2,16	4,07
Araquidônico	1,11	1,82	1,88	1,69
EPA	11,84	12,66	8,92	20,14
DPA	2,22	2,77	1,65	4,99
DHA	11,64	13,89	4,80	32,08

MAG: monoacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis.

<sup>1</sup> Os valores apresentados são a média de duas determinações. Composição em ácidos graxos determinada por CG, conforme método NF T60-233/1977 (AFNOR, 1985), descrito em 3.2.6. Análise de regiodistribuição descrita no item 3.2.7 (Turon, Bachain *et al.*, 2002).

Pode-se observar que os ácidos DHA (32,08%) e EPA (20,14%) são os principais ácidos graxos presentes na posição central ( $\beta$ ) dos triacilgliceróis do óleo de peixe OmegaPure. Por outro lado, o ácido palmítico (23,43%) é o principal ácido graxo presente nas posições externas dos triacilgliceróis, seguido pelos ácidos oléico (17,64%) e palmitoléico (12,11%). Neste óleo de peixe, as posições externas ( $\alpha$ ) do esqueleto do glicerol estão esterificadas principalmente a ácidos graxos saturados (40%) e monoinsaturados (29,8%), enquanto a posição central das moléculas é ocupada preferencialmente por ácidos graxos insaturados (62,7%).

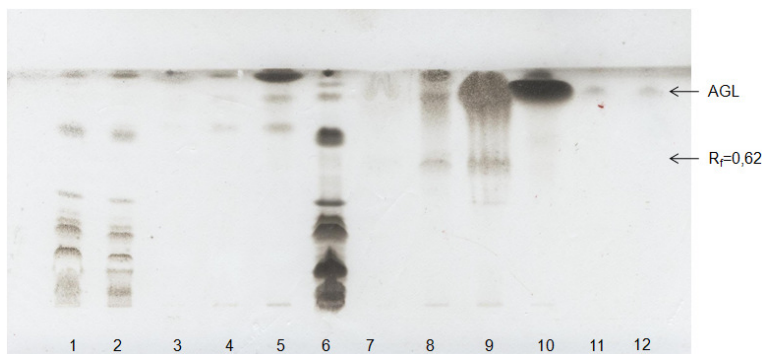
Esta distribuição dos ácidos graxos na molécula, em que a posição central é ocupada principalmente por ácidos graxos insaturados, especialmente EPA e DHA, é particular de óleo de peixe (Brockerhoff, Hoyle *et al.*, 1966; Turon, Rwabwogo *et al.*, 2005). Além disso, nestes óleos, a posição 1 do esqueleto do glicerol é ocupada tanto por ácidos graxos saturados quanto por monoinsaturados, enquanto a posição 3 desta molécula é ocupada principalmente por ácidos graxos monoinsaturados (Gunstone, Harwood *et al.*, 1994).



#### 4.2 AÇÃO DA LIPASE NOVOZYM<sup>®</sup> 435 SOBRE SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO

Os surfactantes de grau alimentício utilizados no presente trabalho (Tween, lecitina de soja) têm sido aplicados como aditivos em reações de glicerólise enzimática (Hossain, Takeyama *et al.*, 1999; Valério, Krüger *et al.*, 2009; Krüger, Valério *et al.*, 2010). Sua adição ao meio reacional tem por objetivo melhorar a homogeneidade do sistema, o qual é composto por substratos imiscíveis (glicerol e óleo). Os surfactantes citados apresentam funções químicas que podem ser modificadas por lipases, conforme já verificado por Bendikienė, Surinènaitė *et al.* (2005).

Com o objetivo de verificar a reatividade destes surfactantes na presença da lipase comercial Novozym<sup>®</sup> 435, foram realizadas reações nas quais se adicionaram como substratos somente o glicerol e cada um dos surfactantes testados, conforme descrito na seção 3.3.1. Estas reações, em que não se adicionou óleo de peixe, tiveram o intuito de simular o meio das reações de glicerólise, utilizando-se os surfactantes como fase lipídica. Os resultados obtidos por CCD estão apresentados na Figura 15, conforme metodologia descrita no item 3.3.2.

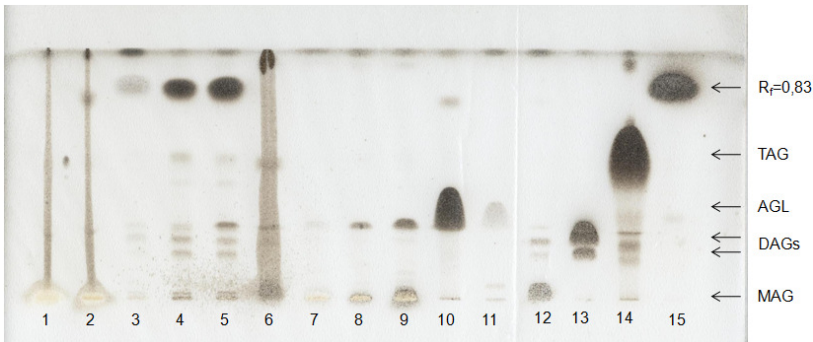


**Figura 15** - Placa de CCD das amostras do meio reacional com glicerol e diferentes surfactantes de grau alimentício. Meio reacional com lecitina de soja depois de (1) 2h e (2) 6h; (3) Tween 65 depois de 2h; (4) Tween 80 depois de 2h; (5) Tween 85 depois de 2h; (6) Lecitina de soja pura; (7) Tween 65 puro; (8) Tween 80 puro; (9) Tween 85 puro; (10) Ácido oléico; (11) Ácido esteárico; (12) Ácido palmítico.

AGL: ácidos graxos livres.  $R_f$ : fator de retenção. Concentração das amostras aplicadas: 50mg/mL (amostras 1 a 5, 11 e 12); 20mg/mL (amostras 6 a 10). Volume aplicado: 30 $\mu$ L (Amostras 1-5); 15 $\mu$ L (Amostras 6-12). Revelação: sulfato de cobre e ácido fosfórico. Sistema de eluição: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (95:20:2,5, v/v/v).

Pode-se observar a presença de diferentes frações lipídicas em todos os surfactantes testados (amostras 6, 8 e 9), especialmente na lecitina de soja (amostra 6). Também pode-se perceber a presença de uma mancha de fração lipídica próxima à frente de solvente para todos os meios testados. No sistema de solventes utilizado para a migração das amostras na placa acima, esta mancha apresentou um fator de retenção próximo ao dos ácidos graxos livres ( $R_f=0,94$ ). Quando se compara a solução de lecitina de soja pura (amostra 6) e o meio reacional contendo glicerol e este fosfolípido (amostra 1), pode-se observar sua modificação pela Novozym<sup>®</sup> 435 já após 2h de reação. A comparação dos meios contendo Tween 80 (amostra 4) e Tween 85 (amostra 5) indica a ausência de bandas ( $R_f=0,62$ ) que estavam presentes nas soluções puras destas substâncias (amostras 8 e 9, respectivamente).

Testou-se outro sistema de eluição (hexano/éter etílico/ácido acético, 70:30:1, vol), para se obter uma separação mais adequada das frações lipídicas apolares presentes nas amostras dos Tween, conforme metodologia descrita no item 3.3.2. Os resultados estão mostrados na Figura 16.

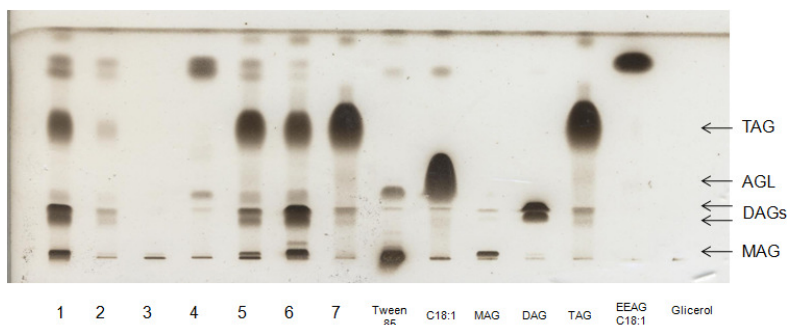


**Figura 16** - Placa de CCD do meio reacional com glicerol e diferentes surfactantes de grau alimentício. Meio reacional com lecitina de soja depois de (1) 2 e (2) 6h; (3) Tween 65 depois de 2h; (4) Tween 80 depois de 2h; (5) Tween 85 depois de 2h; (6) Lecitina de soja pura; (7) Tween 65 puro; (8) Tween 80 puro; (9) Tween 85 puro; (10) Ácido oléico; (11) Ácido esteárico; (12) 1-oleína; (13) 1,3-dioleína; (14) Triacilgliceróis do óleo de peixe OmegaPure; (15) Oleato de etila.

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis; AGL: ácidos graxos livres;  $R_f$ : fator de retenção. Concentração: 50mg/mL (amostras 1 a 5, 11, 12 e 15); 20mg/mL (amostras 6 a 10). Volume da amostra aplicada: 30 $\mu$ L (amostras 1-5; 11-15); 10 $\mu$ L (amostras 6-10). Revelação: sulfato de cobre e ácido fosfórico. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v).

Com este sistema de solventes, obteve-se uma melhor separação das frações lipídicas de interesse para as amostras em estudo, referentes aos meios reacionais contendo Tween. Nesta placa de CCD, observa-se a presença de manchas referentes a ácidos graxos livres nos Tween puros (amostras 8 e 9). Com base nesta análise, pode-se perceber que os Tween (amostras 3 a 5) foram parcialmente convertidos a mono- ( $R_f=0,03$ ) e diacilgliceróis ( $R_f=0,17$  e  $0,24$ , referente aos isômeros), bem como a uma substância não identificada com base nos padrões disponíveis, cujo fator de retenção ( $R_f$ ) foi de  $0,83$ . Verificou-se que este fator de retenção era próximo, mas não idêntico, ao do oleato de etila utilizado como padrão (amostra 15 da placa acima).

Como a modificação dos surfactantes de grau alimentício foi pronunciada quando se utilizou o Tween 85 (amostra 5), esta substância foi escolhida para uma investigação mais aprofundada. Realizaram-se reações sob diferentes condições, para verificar a ocorrência de modificação ou hidrólise deste surfactante pela lipase, ou de oxidação durante a reação. Os resultados estão apresentados na Figura 17, conforme análise detalhada no item 3.3.2.



**Figura 17** - Placa de CCD das amostras do meio reacional com (1) glicerol e óleo de peixe após 48h, (2) glicerol e Tween 85 após 2h, (3) controle (reação sem a enzima) com glicerol e Tween 85 após 62h, (4) água e Tween 85 após 2h, (5) glicerol, óleo de peixe e Tween 85 após 2h, (6) glicerol e óleo de peixe após 62h sob atmosfera inerte, (7) controle (reação sem a enzima) com glicerol e óleo de peixe após 62h sob atmosfera inerte.

MAG: monoacilgliceróis. DAG: diacilgliceróis. TAG: triacilgliceróis. AGL: ácidos graxos livres. C18:1: ácido oléico. EEAG (C18:1): oleato de etila. Revelação: sulfato de cobre e ácido fosfórico. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v).

Na Figura 17, pode-se observar que o Tween 85 foi modificado pela Novozym<sup>®</sup> 435 em todas as condições testadas (amostras 2, 4 e 5). Na placa de CCD, observa-se a presença de duas manchas cujos fatores

de retenção foram de 0,80 e 0,87, respectivamente. Ambas são referentes à mancha com fator de retenção 0,83, verificada na Figura 16. Estas manchas, referentes a substâncias desconhecidas com base nos padrões utilizados para esta análise, foram observadas no meio reacional com Tween 85 na presença de oxigênio (amostra 2) e na presença de água (amostra 4). Isto sugere que tais substâncias, que não se tratavam de ésteres alquílicos, devem ser referentes a produtos da oxidação, modificação ou da hidrólise enzimática deste surfactante. Estas manchas não foram observadas quando não havia lipase no meio reacional (amostra 3), e estavam presentes na reação tanto entre o óleo de peixe e o glicerol (amostra 1), quanto na presença destes substratos e de Tween 85, mesmo depois de apenas 2h de reação (amostra 5). A produção destas substâncias foi minimizada no meio que havia sido inertizado com nitrogênio (amostra 6). Este gás inerte se mostrou eficaz para a proteção dos ácidos graxos poliinsaturados, presentes no óleo de peixe, contra a oxidação, inclusive após um longo tempo de reação (62h, amostra 7).

Na Figura 17, pode-se observar que foi possível produzir mono- e diacilgliceróis em 2 horas de reação de glicerólise do óleo de peixe, na presença de Tween 85 (amostra 5).

Para a identificação das manchas desconhecidas ( $R_f=0,80$  e  $0,87$ ), presentes na Figura 17, aplicou-se uma solução do meio contendo Tween 85, após 2 horas de reação, em uma placa de CCD preparativa. As manchas de interesse foram recuperadas da sílica, extraídas e analisadas por CL-EM. A identificação das amostras por esta técnica analítica não foi conclusiva, mas verificou-se que não se tratavam de ácido oléico, monooleína, dioleína, trioleína, oleato de etila ou Tween 85, os quais também foram analisados por esta técnica. Uma análise destas substâncias por RMN  $H^{+1}$  poderia ser útil para elucidar sua estrutura.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho confirmam observações feitas por Bendikienė, Surinėnaitė *et al.* (2005), para a investigação da hidrólise de Tween por lipase de *Pseudomonas mendocina* 3121-1. Estes autores mostraram que diferentes Tween (20, 40, 60, 80 e 85) podem ser usados tanto como surfactantes quanto como substratos na presença desta enzima. A lipase testada no trabalho citado foi capaz de hidrolisar todos os Tween testados, mostrando atividade maior frente ao Tween 85, cuja estrutura é próxima à da trioleína. Esta substância, entretanto, agiu como surfactante ao invés de substrato quando seu teor mássico estava na faixa de 0,4 a 0,8%, em relação ao total do meio reacional.

A presença de surfactante no meio reacional pode afetar a atividade da lipase. Hossain, Takeyama *et al.* (1999) mostraram que a atividade hidrolítica da lipase de *Chromobacterium viscosum* apresentou um incremento em um sistema de micela reversa AOT/Tween 85, quando comparada com um sistema simples de micela reversa contendo AOT.

Por outro lado, Gao, Cao *et al.* (2000) verificaram que uma nova lipase isolada de uma cepa de *Pseudomonas* foi inativada por diferentes surfactantes, em especial por Tween e sulfonatos, em reação de hidrólise de azeite de oliva.

Apesar da modificação enzimática dos surfactantes testados no presente trabalho, estas reações não devem apresentar um impacto considerável na formação de mono- e diacilgliceróis durante as reações de glicerólise de óleo de peixe, já que estes aditivos são adicionados ao meio reacional em uma proporção pequena, comparada à quantidade de óleo de peixe e de glicerol presentes no sistema. É importante mencionar, entretanto, que a degradação ou modificação dos surfactantes adicionados ao meio, sob ação da lipase, pode alterar as propriedades da emulsão formada, com a conseqüente perda da eficácia deste aditivo no sistema. Adicionalmente, a ação da Novozym<sup>®</sup> 435 sobre os surfactantes testados poderá implicar na necessidade de purificação do meio ao final das reações de glicerólise nas quais estes aditivos tenham sido utilizados.

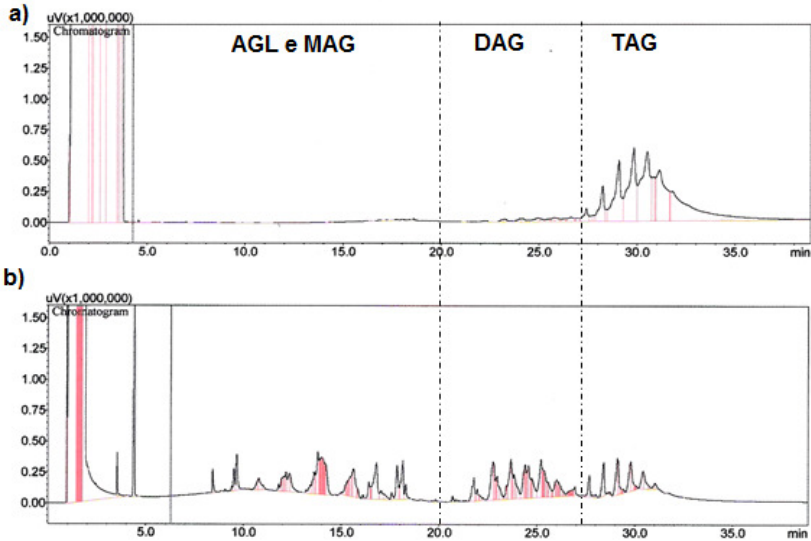
## 4.3 REAÇÕES DE GLICERÓLISE EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS

### 4.3.1 Ensaios preliminares

Inicialmente, foi feita uma comparação de três meios para a consecução das reações de glicerólise enzimática: meio contendo *tert*-butanol, meio livre de solvente orgânico contendo surfactante de grau alimentício, e meio livre de solvente e de surfactante. Estas reações estão descritas na seção 3.4.7. No meio contendo surfactante, foram testados quatro surfactantes de grau alimentício: Tween 65 (BHL 10,5), Tween 80 (BHL 15,0), Tween 85 (BHL 13,5) e lecitina de soja (BHL 8,0). O emprego destes emulsificantes como aditivos em alimentos é permitido nos Estados Unidos (FDA, 2008b) e pela legislação brasileira (Brasil, 1999c; b; a).

A título ilustrativo, dois cromatogramas característicos obtidos nas análises das amostras por cromatografia em fase gasosa (CG),

segundo as condições descritas na Norma DIN EN n° 14105, com as modificações propostas na literatura (Valério, Krüger *et al.*, 2009), são apresentados na Figura 18.



**Figura 18** - Perfis cromatográficos característicos, obtidos por cromatografia em fase gasosa, de amostras do meio reacional (a) antes e (b) após 2 horas de reação na presença de *terc*-butanol.

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis; AGL: ácidos graxos livres. Condições reacionais: 600rpm, 55°C, razão molar glicerol:óleo de peixe 2:1, 10% de enzima imobilizada (m/m, em relação ao total de substratos), proporção *terc*-butanol:substratos 1:1 (v/v). Concentração da solução injetada: (a) 3.950ppm; (b) 6.840ppm. Volume injetado: 1,0µL.

Através da avaliação destes cromatogramas, percebe-se a conversão de triacilgliceróis (retenção na região de 27 a 35 minutos) a outras frações lipídicas (ácidos graxos livres, mono- e diacilgliceróis).

A análise dos cromatogramas, entretanto, revelou a sobreposição dos picos referentes aos ácidos graxos livres e aos monoacilgliceróis, o que dificultou a quantificação de cada uma destas frações lipídicas presentes nas amostras. É oportuno mencionar que os padrões de EPA e de DHA e de seus respectivos acilgliceróis parciais são caros ou inexistentes, e não estavam disponíveis no laboratório onde foi realizada a análise cromatográfica, embora pudessem ter sido obtidos por hidrólise do óleo de peixe. Nas condições da análise, os cromatogramas permitem quantificar somente as frações de diacilgliceróis (tempo de

retenção entre 20 e 27 minutos) e de triacilgliceróis presentes nas amostras.

Cabe ressaltar que as condições que foram utilizadas neste trabalho na análise por CG são correntemente aplicadas para a análise dos acilgliceróis formados na glicerólise de azeite de oliva. Para este substrato, a região de cada acilglicerol é bem definida, sendo que os picos entre 10,5 a 12,5 minutos correspondem à região de ácidos graxos livres, de 15 a 19 minutos correspondem à região de monoacilgliceróis, de 23 a 28 minutos correspondem à região de diacilgliceróis, e de 30 a 35 minutos correspondem à região de triacilgliceróis. O azeite de oliva é composto majoritariamente por ácido oléico (Krüger, 2010), ao contrário do óleo de peixe, que apresenta uma composição bastante diversificada de ácidos graxos.

Frete às considerações expostas, optou-se por apresentar somente o teor de di- e triacilgliceróis presentes nas amostras, conforme resultados indicados na Tabela 10 para os diferentes meios reacionais testados.

**Tabela 10.** Teor mássico (%) de di- e triacilgliceróis usando diferentes meios reacionais.

Meio reacional	DAG (%)	TAG remanescente (%)
Antes da reação	2,90	80,00
Sem solvente, sem surfactante*	34,90	15,19
<i>terc</i> -butanol**	20,27	4,29
Tween 65**	19,41	43,47
Tween 80**	15,51	42,72
Tween 85**	17,04	46,31
Lecitina de soja**	15,19	37,95

Média de duas determinações. Análise das amostras por cromatografia em fase gasosa.

Condição reacional: 600rpm, 55°C, razão molar glicerol:óleo de peixe 2:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada (em relação ao total de glicerol e óleo). Meio contendo surfactante: 10% (m/m) surfactante (em relação aos substratos). Meio contendo *terc*-butanol: proporção solvente:substratos 1:1 (v/v).

\* 24 horas de reação. \*\* 2 horas de reação.

Através dos resultados apresentados, verifica-se que o meio livre de solvente e de surfactante proporcionou a maior formação de diacilgliceróis (34,90%) em 24 horas de reação. Neste caso, salienta-se que o tempo de reação foi superior ao tempo de 2 horas, aplicado para os demais meios reacionais testados no presente estudo, devido à baixa

transferência de massa existente no meio em que há somente glicerol e óleo.

Na glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial imobilizada de *C. antarctica* B, Torres, Lin *et al.* (2002) obtiveram 20% de monoacilgliceróis e 42% de diacilgliceróis após 24 horas de reação à temperatura de 60°C, com agitação de 300rpm, em meio livre de solvente orgânico, ou seja, contendo somente o óleo e o glicerol. A enzima foi adicionada na proporção de 7% (m/m) em relação aos substratos, os quais foram empregados na proporção molar de 0,89 (triacilglicerol:glicerol). Em reação de glicerólise de óleo de peixe mediada por lipase comercial imobilizada de *R. miehei*, utilizada na proporção de 8,5%, os mesmos autores obtiveram um total de 40% de mono- e diacilgliceróis após 24 horas de reação conduzida a 45°C, utilizando uma proporção molar de 5,5 (triacilgliceróis:glicerol) e agitação de 300rpm.

Yang, Fruekilde *et al.* (2003) relatam a obtenção de 5% de monoacilgliceróis, 50% de diacilgliceróis e 35% de triacilgliceróis, com a formação de 8% de ácidos graxos livres, na glicerólise de óleo de girassol. Neste estudo, estes pesquisadores utilizaram a enzima comercial Lipozyme TL IM, de *T. lanuginosus*, na proporção de 20% em relação ao total de substratos. A reação foi conduzida em meio sem solvente, à temperatura de 40°C e 300rpm durante 17 horas, com a redução da temperatura e da agitação para 5°C e 200rpm, respectivamente, até completar um total de 24 horas de reação. Esta estratégia de redução da temperatura e da agitação foi adotada para proceder ao fracionamento dos mono- e diacilgliceróis formados durante a glicerólise, sendo uma alternativa para aumentar o rendimento da reação em sistema livre de solvente. A quantidade de enzima empregada nesta reação, entretanto, poderia ser otimizada, para reduzir os custos do processo.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, observa-se que, no meio contendo *tert*-butanol, obteve-se um teor mássico de 20,27% de diacilgliceróis e de apenas 4,29% de triacilgliceróis em 2 horas de reação. A maior conversão de triacilgliceróis em um curto tempo de reação, em comparação aos demais meios testados, pode ser atribuída à presença do solvente utilizado no meio, já que este melhora a homogeneidade do sistema.

O *tert*-butanol tem se mostrado um solvente bastante útil para reações de glicerólise, conforme observado por Yang, Rebsdorf *et al.* (2005a). Estes autores relatam que a eficácia da reação de glicerólise de óleo de girassol catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 pode ser aumentada em



mais de 20 vezes quando se utiliza meio contendo *tert*-butanol, quando em comparação com meio livre de solvente. Deve-se considerar, entretanto, que o *tert*-butanol é sólido à temperatura ambiente (ponto de fusão 25-26°C), o que torna o processo trabalhoso. Para aplicações industriais, portanto, deve-se levar em conta a relação custo-benefício para a aplicação deste solvente, conforme já discutido por Pawongrat, Xu *et al.* (2008).

Estudo de Krüger, Valério *et al.* (2009) indicou a obtenção de teores mássicos superiores a 60% (total de mono- e diacilgliceróis) na glicerólise de azeite de oliva catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 (10%, em massa, em relação aos substratos) em apenas 4 horas de reação na presença de *tert*-butanol.

Na otimização da glicerólise de óleo de girassol catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 em meio contendo *tert*-pentanol, observou-se que o maior teor de monoacilgliceróis (76%) foi obtido em apenas 115min a 50°C, utilizando-se a enzima na proporção de 18% (m/m, em relação ao óleo), com os substratos na proporção molar de 7:1 (glicerol:óleo) e com uma quantidade de solvente de 500% (v/m de óleo) (Damstrup, Jensen *et al.*, 2006).

A condução das reações em meio livre de *tert*-butanol e contendo surfactante de grau alimentício mostrou-se bastante promissora para o sistema avaliado, confirmando a possibilidade de uso destas substâncias para aumentar o contato entre a enzima e os substratos, conforme sugerido no item 4.2. Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, observa-se que o tipo de surfactante influenciou o teor de diacilgliceróis formados. Entre os surfactantes avaliados, o sistema reacional contendo Tween 65 proporcionou o maior teor de diacilgliceróis (19,41%, m/m) após duas horas de reação.

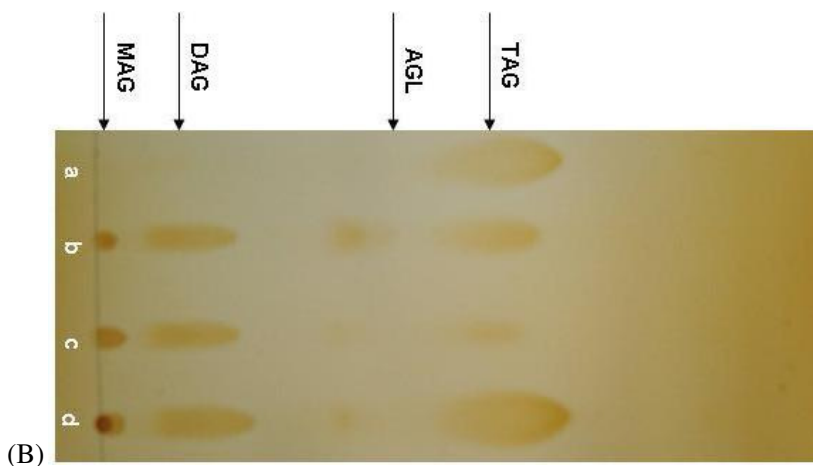
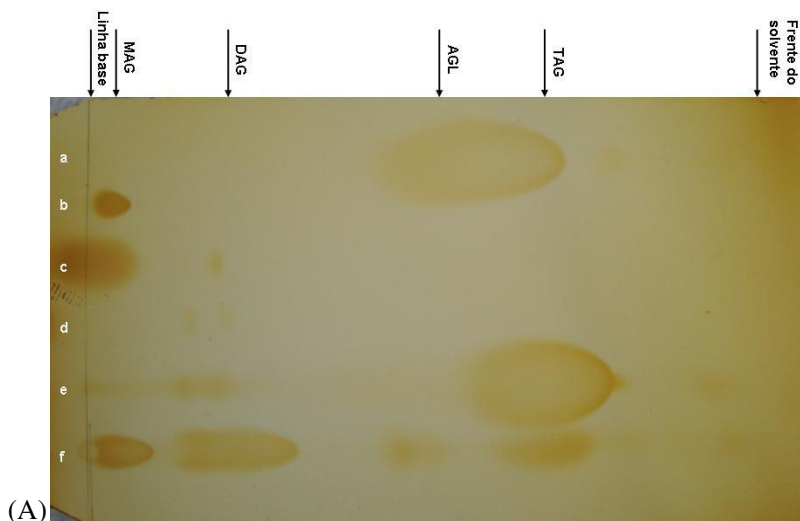
No caso da lecitina de soja, observou-se uma dificuldade de dissolução deste fosfolípido no meio reacional. Isto implicou na formação de agregados no meio, dificultando a transferência de massa neste sistema.

A variação no teor de diacilgliceróis formados quando se utilizam diferentes surfactantes pode ser atribuída à diferença existente na conformação molecular e nas características químicas de cada surfactante testado, entre as quais o valor de BHL (Desai e Banat, 1997). No sistema em estudo, a fase oleosa tende a ser a fase contínua da emulsão, sendo que, entre os Tween testados, o Tween 65 é o mais solúvel nesta fase, de acordo com seu BHL (Leon-Calderon, Schmitt *et al.*, 2007).

A influência do tipo de surfactante sobre a formação de mono- e diacilgliceróis já foi observada em estudo sobre glicerólise de azeite de oliva, utilizando-se a Novozym<sup>®</sup> 435 como catalisador (Valério, Rovani *et al.*, 2010). No estudo mencionado, o surfactante Tween 65 conduziu ao maior teor de mono- e diacilgliceróis (36,21%) após duas horas de reação, seguido pelo surfactante Tween 85 (31,09%). Estas concentrações de acilgliceróis parciais foram obtidas a 70°C, com agitação mecânica de 600rpm, razão molar glicerol:azeite de oliva 2:1, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada e 16% de surfactante.

Nesta etapa do trabalho, decidiu-se analisar qualitativamente as amostras por cromatografia em camada delgada (CCD), como um método alternativo para verificar a presença de ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis após as reações. A CCD é uma técnica analítica simples, sendo útil para uma análise rápida do meio reacional. Esta técnica já foi aplicada na literatura, por exemplo, para a avaliação do progresso da reação de etanólise de óleo de peixe, visando à formação de 2-monoacilgliceróis (Pfeffer, Freund *et al.*, 2007).

As amostras que apresentaram o maior teor de diacilgliceróis – conforme resultado obtido por CG – foram aplicadas em placas de CCD. Os resultados estão obtidos nesta etapa estão apresentados na Figura 19A. Esta análise foi realizada segundo metodologia descrita no item 3.4.3. A revelação das placas com vapor de iodo mostrou-se mais eficaz do que a luz ultravioleta para a visualização de todas as frações lipídicas presentes nas amostras. Levando-se em conta que o objetivo desta análise, neste momento, foi qualitativo e não preparativo, decidiu-se apresentar os resultados utilizando-se somente vapor de iodo como revelador.



**Figura 19** – (A) Análise por CCD dos padrões de (a) ácido oléico, (b) monooleína, (c) dioleína, (d) dipalmitina, do meio (e) antes e (f) após a reação com *terc*-butanol;  
 (B) Análise por CCD do meio (a) antes e após a reação  
 (b) na ausência de solvente e de surfactante, (c) na presença de *terc*-butanol e  
 (d) na presença do surfactante Tween 65.

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis; AGL: ácidos graxos livres. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido fórmico (80:20:2, vol). Condições reacionais: vide Tabela 10. Concentração das soluções aplicadas: 500mg/mL.

Conforme se observa na figura Figura 19A, a análise por CCD indicou a conversão parcial dos triacilgliceróis ( $R_f=0,67$ ) a mono- ( $R_f=0,03$ ) e diacilgliceróis ( $R_f=0,15$  e  $0,18$ , referente aos isômeros) no meio contendo *tert*-butanol, em 2 horas de reação. Neste sistema, esta análise qualitativa sugere a presença de ácidos graxos livres ( $R_f=0,58$ ) após a reação na presença de solvente orgânico. A presença de ácidos graxos livres no produto final está associada a problemas de sabor e de aroma nos produtos alimentícios aos quais os mono- e diacilgliceróis são incorporados (Grompone, 2011). Além disso, a formação de ácidos graxos livres implica na redução do rendimento do processo e no aumento dos custos de purificação do produto final (Pawongrat, Xu *et al.*, 2008).

Através da análise por CCD (Figura 19B) também foi possível verificar que a Novozym<sup>®</sup> 435 foi capaz de converter os triacilgliceróis ( $R_f=0,68$ ) a acilgliceróis parciais (MAG,  $R_f=0,05$ , e DAG,  $R_f=0,23$ ) e ácidos graxos livres ( $R_f=0,43$ ) em todos os meios reacionais testados, nas condições aplicadas nos ensaios preliminares, corroborando os resultados obtidos por CG. A conversão, entretanto, não foi total no tempo de reação avaliado, o que pôde ser verificado mediante a presença de manchas de triacilgliceróis em todas as amostras, resultado que também condiz com aqueles obtidos por CG.

#### 4.3.1.1 Avaliação da atividade enzimática

O monitoramento da atividade enzimática ao final da reação é um dado importante para a avaliação de possíveis modificações na atividade do catalisador, como decorrência das características de determinado meio reacional ou das condições reacionais. A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para a atividade de esterificação da lipase imobilizada Novozym<sup>®</sup> 435 no início e no final de 2 horas de reação, para os meios contendo solvente ou surfactante, e após 24 horas de reação em meio livre de solvente e de surfactante. Nesta análise, utilizaram-se ácido láurico e *n*-propanol como substratos, conforme descrito na seção 3.2.10.

Os resultados apontam que, nas condições aplicadas nos ensaios preliminares, a maioria dos meios utilizados neste trabalho provocou variações menores que 10%, para mais ou para menos, na atividade de esterificação da enzima Novozym<sup>®</sup> 435. Uma perda mais acentuada da atividade de síntese desta lipase foi verificada no meio contendo lecitina

de soja. Para este experimento, a lipase apresentou retenção de apenas 83,94% de sua atividade de esterificação original.

**Tabela 11.** Efeito do meio reacional sobre a atividade de esterificação específica (A.E.<sub>esp</sub>) da Novozym<sup>®</sup> 435, expressa em U/mg de lipase imobilizada\*.

Meio reacional	A.E. <sub>esp</sub> inicial (U/mg)	A.E. <sub>esp</sub> final (U/mg)	Atividade residual (%)**
Sem solvente, sem surfactante	1,331 <sup>a</sup>	1,278	96,05%
<i>Terc</i> -butanol	1,331	1,314	98,71%
Tween 65	1,690 <sup>b</sup>	1,546	91,46%
Tween 80	1,331	1,417	106,42%
Tween 85	1,690	1,512	89,47%
Lecitina de soja	1,690	1,418	83,94%

(a), (b): Atividade enzimática referente à Novozym<sup>®</sup> 435 proveniente de lotes diferentes.

\* U: unidade de atividade de esterificação, definida como a quantidade de ácido láurico, em μmols, consumido por minuto, nas condições descritas na seção 3.2.10.

\*\* Atividade residual, % = (atividade final)/(atividade inicial)\*100.

Condições das reações: vide Tabela 10.

Em trabalho sobre glicerólise de azeite de oliva, também foi observada variação inferior a 10%, para mais ou para menos, na atividade de esterificação da Novozym<sup>®</sup> 435, quando se utilizaram os mesmos surfactantes de grau alimentício que foram empregados no presente estudo. Os resultados do trabalho citado indicaram, entretanto, que não houve perda significativa da atividade da lipase em meio contendo lecitina de soja (Valério, 2009).

O efeito de diferentes surfactantes sobre a atividade enzimática foi avaliado em trabalho sobre produção e caracterização de lipase obtida a partir de uma cepa de *Pseudomonas* sp. isolada do solo (Gao, Cao *et al.*, 2000). No estudo mencionado, observou-se a perda da atividade de hidrólise da enzima, em diferentes graus, frente a todos os surfactantes testados, sendo que a inativação foi total nos meios contendo Tween e sulfonatos. Isto não foi verificado no presente trabalho, em que se utilizou a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 na presença de diferentes Tween.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que, nos sistemas e nas condições avaliados, a Novozym<sup>®</sup> 435 não

apresentou perda significativa da atividade de síntese. Isto sugere a possibilidade de recuperação e reutilização deste biocatalisador em ciclos subseqüentes com a manutenção do rendimento das reações, o que é extremamente interessante para a redução dos custos operacionais nos processos em que esta lipase é aplicada.

#### ***4.3.1.2 Avaliação da recuperação da enzima após as reações***

Ao final do tempo de reação de glicerólise enzimática, verificou-se, na etapa de lavagem do biocatalisador, que o uso de *n*-hexano não estava sendo adequado para a remoção total dos resíduos, em especial de glicerol, aderidos à enzima. Mesmo após três lavagens do meio reacional com aproximadamente 20mL de *n*-hexano em cada lavagem, tanto o papel filtro quanto a enzima apresentavam resíduos do meio reacional, em especial nos meios em que não havia sido utilizado *tert*-butanol durante a reação de glicerólise. Supôs-se, então, que tanto a quantificação dos produtos presentes no meio reacional quanto a atividade da enzima recuperada poderiam estar sendo afetados pela lavagem insuficiente da enzima, utilizando-se somente *n*-hexano como solvente.

Sendo assim, decidiu-se realizar uma reação de glicerólise do óleo de peixe na presença de Tween 85, nas condições dos ensaios preliminares. Em seguida, recuperou-se a enzima, a qual foi lavada utilizando-se diferentes solventes: em um teste, realizaram-se três lavagens seguidas, utilizando-se 20mL de *n*-hexano a cada lavagem; em outro teste, realizaram-se três lavagens seguidas, utilizando-se 20mL de uma mistura contendo *n*-hexano e etanol 96% (1:1, v/v) em cada lavagem, conforme descrito em 3.4.2. Na Figura 20, são apresentadas as fotos da enzima após estas lavagens.

A análise visual indicou a ineficiência do *n*-hexano, isoladamente, para a remoção do meio aderido à lipase, ao final do tempo de reação de glicerólise, já que a enzima lavada mostrou-se em forma de grumos e sua consistência estava pegajosa. Por outro lado, o emprego de uma mistura de *n*-hexano e de etanol 96% mostrou-se eficaz para a lavagem da Novozym<sup>®</sup> 435. A enzima recuperada com tais solventes não apresentava resíduos aderidos. Supõe-se que a polaridade mais alta deste sistema de solventes, quando em comparação com a utilização de *n*-hexano isoladamente, deve ter facilitado a recuperação do glicerol aderido à Novozym<sup>®</sup> 435 ao final da reação de glicerólise.



**Figura 20** – Lipase Novozym<sup>®</sup> 435 submetida a três lavagens sucessivas com 20mL de *n*-hexano cada (foto à esquerda) e com uma mistura de *n*-hexano e etanol 96%, 1:1, v/v (foto à direita), após recuperação do meio de reação de glicerólise de óleo de peixe na presença de Tween 85.

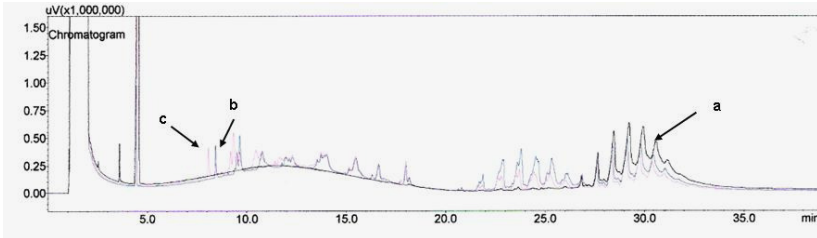
Nesta etapa de experimentos, amostras da enzima recuperada ao final da reação e lavada utilizando-se *n*-hexano, isoladamente ou em conjunto com etanol 96%, foram submetidas à análise de atividade de esterificação. O resultado foi comparado com o valor da atividade de esterificação da enzima original.

Observou-se que não houve diferença na atividade de esterificação apresentada pela Novozym<sup>®</sup> 435 lavada com os diferentes solventes. Esta lipase, que apresentava inicialmente uma atividade específica de esterificação de 1,754U/mg, teve uma perda de 18,7% de atividade quando lavada com *n*-hexano após a reação de glicerólise na presença do Tween 85. Já quando a enzima foi lavada com uma mistura de *n*-hexano e etanol ao final da reação de glicerólise, a atividade foi reduzida em 16,4%.

Após as reações de glicerólise enzimática do óleo de peixe na presença de Tween 85, amostras do meio foram analisadas por CG (Figura 21), para verificar se os solventes utilizados para a lavagem da lipase poderiam influenciar no perfil lipídico quantificado por esta técnica analítica.

A análise do meio proveniente das reações de glicerólise do óleo de peixe na presença do Tween 85, por CG, indica que as amostras “b” e “c”, lavadas com solventes diferentes (Figura 21), apresentaram o mesmo perfil lipídico (ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis). Com base nos cromatogramas, pode-se inferir que os solventes utilizados para a lavagem da enzima não afetaram o perfil de

acilgliceróis presentes no meio reacional. Percebe-se também a presença de um pico eluído no tempo entre 3 e 4 minutos, referente ao glicerol, conforme identificação feita por CG-EM.



**Figura 21** – Cromatogramas, obtidos por cromatografia em fase gasosa, do meio reacional de glicérolise de óleo de peixe com Tween 85, catalisada pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, (a) no tempo zero e após 2h de reação após a recuperação da enzima com (b) *n*-hexano e (c) *n*-hexano e etanol.

Estudo sobre a lavagem de diferentes enzimas ao final do processo já foi desenvolvido na literatura para reações visando à obtenção de biodiesel utilizando diferentes óleos vegetais como substrato. Concluiu-se que a enzima Novozym<sup>®</sup> 435 reteve 90% de sua atividade de transesterificação após sete ciclos de uso, quando havia sido lavada com *n*-hexano ao final de cada reação. A lavagem desta lipase com outros solventes, inclusive etanol, provocou a perda de sua atividade ao longo de ciclos repetidos de uso. Deve-se considerar, entretanto, que, no sistema mencionado, a camada de substratos e produtos sobre o suporte da enzima era formada principalmente por óleo e biodiesel, de caráter apolar (Rodrigues, Volpato *et al.*, 2008), ao contrário do que ocorre na presente pesquisa, em que se observou, ao final da reação, a presença de quantidade significativa de glicérol no meio, de caráter polar.

#### 4.3.1.3 Avaliação do índice de peróxido

O monitoramento do índice de peróxido do meio ao final da reação é uma determinação fundamental para a verificação da ocorrência de oxidação do óleo de peixe, como decorrência das condições aplicadas durante a glicérolise deste substrato. A Tabela 12 apresenta os valores de índice de peróxido das amostras obtidas nos ensaios preliminares, segundo análises realizadas com base no Método AOCS Cd 8-53 (1990), descrito na seção 3.2.3. É importante ressaltar



que as amostras foram submetidas à evaporação dos solventes em estufa a vácuo (60°C) e armazenadas sob atmosfera inerte durante um mês, sob temperatura de congelamento, antes da determinação do índice de peróxido.

**Tabela 12.** Índice de peróxido do óleo de peixe original e do meio reacional após armazenagem sob temperatura de congelamento e atmosfera inerte durante um mês.

Meio reacional	Índice de Peróxido* (meq O <sub>2</sub> /kg amostra)
Óleo de peixe OmegaPure	0,45
Sem solvente, sem surfactante	7,80
<i>Terc</i> -butanol	11,04
Tween 65	29,05
Tween 80	7,63
Tween 85	12,95
Lecitina de soja	2,28

\* Média de duas determinações. Condições reacionais: vide Tabela 10. Metodologia analítica: AOCS Cd 8-53 (1990).

Os valores encontrados para índice de peróxido das amostras dos meios reacionais foram superiores ao valor obtido para o óleo de peixe original (0,45meq O<sub>2</sub>/kg óleo), indicando que houve oxidação lipídica durante as reações de glicerólise. Os resultados obtidos podem ser considerados altos, embora a maioria esteja próxima ao limite superior de 10meq O<sub>2</sub>/kg óleo estipulado pelo Codex Alimentarius para óleo extraído de arenque (FDA, 1995, revision 2003). Um aumento considerável no índice de peróxido foi observado para os meios contendo Tween 65, Tween 85 e *terc*-butanol. O óleo de peixe OmegaPure, utilizado neste trabalho, é rico nos ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA, os quais são extremamente suscetíveis à oxidação, o que leva a sua destruição, conforme já verificado na literatura para sistemas semelhantes (Borg, Girardin *et al.*, 2000).

Estudo sobre a estabilidade oxidativa de lipídios estruturados ricos em ácidos graxos poliinsaturados e de leite acrescido destes lipídios demonstrou que o processo de oxidação lipídica está estritamente relacionado à composição em ácidos graxos das amostras (Timm-Heinrich, Nielsen *et al.*, 2004). Além disso, a pesquisa indicou

que as condições de armazenagem são determinantes para a manutenção da qualidade do produto.

Uma importante contribuição sobre diferentes sistemas para minimizar a oxidação lipídica de óleo de peixe, durante reações de glicerólise, foi dada por Borg, Girardin *et al.* (2000). Estes autores verificaram que a aplicação de nitrogênio durante as reações de glicerólise é eficaz para inibir a oxidação lipídica, enquanto a aplicação de vácuo no sistema só apresentou efeito protetor quando associada à aplicação de nitrogênio.

Cabe mencionar que, na literatura, grande parte dos trabalhos sobre glicerólise enzimática são realizados em reatores com agitação magnética ou orbital, sem a aplicação de atmosfera inerte ou de vácuo. No presente estudo, optou-se por trabalhar com agitação mecânica, para garantir um contato adequado entre os substratos. No sistema escolhido no presente estudo, o reator de vidro foi coberto com papel alumínio, de maneira que a oxidação lipídica não fosse acelerada, embora este método aparentemente não tenha sido efetivo para a inibição deste processo, já que as reações foram conduzidas em atmosfera contendo oxigênio. Além disso, o tratamento dispensado às amostras após a reação seguiu protocolo atualmente aplicado no laboratório para amostras obtidas a partir da glicerólise de azeite de oliva, a saber, evaporação dos solventes em estufa a vácuo até peso constante. É importante considerar que o azeite de oliva contém majoritariamente ácido oléico, o que confere a esta matéria-prima uma estabilidade oxidativa maior do que a observada para o óleo de peixe.

A partir dos resultados obtidos, também pode-se inferir que o tipo de emulsificante exerce grande influência sobre a oxidação lipídica do meio reacional. O fato de que os emulsificantes exercem um papel na estabilidade oxidativa das gotas lipídicas já foi comprovado na literatura (Fomuso, Corredig *et al.*, 2002). Em emulsões de óleo/água formadas por lipídios estruturados obtidos a partir de óleo de canola e ácido caprílico, por exemplo, verificou-se que a proteína isolada de soja oferece uma inibição maior da oxidação lipídica do que sacarose esterificada com ácidos graxos (Osborn e Akoh, 2004).

No presente estudo, o menor valor de índice de peróxido (2,28meq O<sub>2</sub>/kg amostra) foi observado para o meio contendo lecitina de soja. Este resultado pode ser atribuído à ação antioxidante apresentada por este fosfolipídio e potencializada por um sinergismo entre a lecitina e os tocoferóis adicionados ao óleo de peixe, efeito já observado para óleos vegetais (Judde, Villeneuve *et al.*, 2003). O emprego da lecitina de soja como aditivo alimentício, desempenhando a função tanto de

antioxidante quanto de emulsificante, é permitido pela legislação brasileira na Resolução n° 386 de 1999 (Brasil, 1999c). Na seleção de diferentes antioxidantes para estabilizar uma mistura de mono- e diacilgliceróis obtidos a partir da glicerólise de óleo de babaçu, sugeriu-se que este fosfolípido apresenta um efeito protetor (Freitas, Castro *et al.*, 2009). Entretanto, de acordo com o que já foi comentado na seção 4.3.1, a dissolução da lecitina de soja não foi satisfatória no sistema estudado, razão pela qual o estudo da glicerólise neste sistema não foi aprofundado.

Com base nas observações apresentadas, percebeu-se a necessidade de identificar, neste trabalho, em qual etapa das reações de glicerólise e/ou do tratamento dispensado às amostras a oxidação lipídica foi mais pronunciada. Assim, optou-se por realizar novos ensaios, nos meios contendo Tween 65, Tween 85 e *terc*-butanol, com a retirada de alíquotas em diferentes etapas do processo para a determinação de índice de peróxido. No meio contendo Tween 85, foi realizada uma investigação mais aprofundada (Tabela 13). É importante ressaltar que, nestes experimentos, o índice de peróxido foi determinado imediatamente após as reações.

**Tabela 13.** Índice de peróxido do meio reacional em diferentes etapas do processo e analisado imediatamente após a evaporação dos solventes.

Etapa	Índice de Peróxido*		
	(meq O <sub>2</sub> /kg amostra)		
	Tween 65	Tween 85	<i>Terc</i> - butanol
Imediatamente após a reação	2,88	2,40	1,99
Após evaporação do(s) solvente(s) em estufa a vácuo (60°C)	n.d.	8,03	n.d.
Após evaporação do(s) solvente(s) em evaporador rotativo a vácuo a 75°C	3,62	3,77	1,99
Após evaporação do(s) solvente(s) em estufa a vácuo por 1 hora a 60°C, seguido de aquecimento a 30°C sob corrente de nitrogênio	n.d.	6,42	n.d.

Condições reacionais: vide Tabela 10.

\* Média de duas determinações. n.d.: não determinado. Metodologia analítica: AOCS Cd 8-53 (1990).

Através dos resultados apresentados na Tabela 13, percebe-se que, nas condições aplicadas, houve certo nível de oxidação do óleo de peixe durante a reação, quando comparado com o valor de I.P. do óleo de peixe original (0,45meq O<sub>2</sub>/kg óleo). Isto pode ser atribuído às temperaturas aplicadas durante o processo e ao fato de a atmosfera do reator conter oxigênio. Observou-se também que a evaporação dos solventes em estufa a vácuo acentuou a oxidação do óleo, mesmo em tempos curtos (1h). Este procedimento, portanto, não se mostrou adequado para o tratamento destas amostras. Com base nos valores de índice de peróxido, percebe-se que a eliminação dos solventes em evaporador rotativo a vácuo mostrou-se mais adequada para a conservação da qualidade do óleo após as reações, e decidiu-se adotar este tratamento para as amostras obtidas no planejamento experimental apresentado na seção 4.3.2.

Apesar dos benefícios nutricionais dos ácidos graxos poliinsaturados presentes no óleo de peixe, principalmente EPA e DHA, é importante ressaltar que ambos são prontamente oxidáveis à temperatura ambiente (Pigott e Tucker, 1990; Kulas, Olsen *et al.*, 2003). O processo de oxidação é um parâmetro crítico para a vida-de-prateleira de óleo de peixe e de produtos alimentícios aos quais este tipo de óleo é incorporado (Pigott e Tucker, 1990). Por esta razão, é preciso tomar o máximo cuidado no processamento do peixe e na obtenção do óleo de peixe, de maneira a garantir uma manipulação rápida, minimizando o contato com o oxigênio do ar e evitando a exposição a temperaturas elevadas (Kulas, Olsen *et al.*, 2003). É importante mencionar que os antioxidantes naturalmente presentes no peixe são perdidos durante o manuseio do peixe e durante as etapas de extração e processamento do óleo (Pigott e Tucker, 1990; Wanasundara e Shahidi, 1997a; Kulas, Olsen *et al.*, 2003). Conseqüentemente, o óleo obtido necessita de proteção adequada por meio da adição de antioxidantes, injeção de gases inertes e embalagem em recipientes hermeticamente fechados, garantindo sua qualidade para o consumo humano (Lands, 2005). Após as reações de glicerólise e processos de purificação dos produtos de interesse, recomenda-se a adição de uma quantidade extra de antioxidantes, de maneira a garantir a estabilidade oxidativa dos emulsificantes obtidos durante seu armazenamento e consumo.

### 4.3.2 Reações em meio contendo *terc*-butanol e em meio contendo Tween 65

Levando-se em conta não somente o consumo de triacilgliceróis e a formação de diacilgliceróis, mas também a atividade enzimática e o índice de peróxido obtidos para cada meio reacional testado, definiu-se a continuidade do estudo de produção de mono- e diacilgliceróis utilizando-se os seguintes meios reacionais: meio contendo *terc*-butanol; meio livre de solvente orgânico contendo o surfactante Tween 65; e meio livre de solvente e de surfactante. Adicionalmente, o Tween 65 foi selecionado por ter sofrido poucas modificações na presença da lipase Novozym<sup>®</sup> 435. Nesta seção, serão apresentados os resultados para os planejamentos experimentais realizados para o meio contendo *terc*-butanol e para o meio contendo Tween 65, descritos no item 3.4.8.

Com o objetivo de identificar as variáveis importantes para a produção de diacilgliceróis e definir uma região ótima para sua obtenção, foram realizados os ensaios do planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  com triplicata no ponto central em meio reacional livre de solvente utilizando o surfactante Tween 65 e em meio contendo *terc*-butanol. Os resultados, expressos em função do teor mássico de di- e triacilgliceróis presentes no meio, estão apresentados nas Tabelas 14 e 15 para os meios contendo *terc*-butanol e Tween 65, respectivamente.

Os resultados obtidos no planejamento de experimentos para os dois meios foram tratados estatisticamente, em um nível de 95% de confiança. A Tabela 16 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste *t* de Student.

**Tabela 14.** Matriz do planejamento experimental fracionado (valores reais e codificados) em termos de teor mássico (%) de di- e triacilgliceróis, em meio contendo *terc*-butanol.

Ensaio	T (°C)	G:O* (mol/mol)	[E]* (%, m/m)	Proporção solvente:meio (v/v)	DAG (%)	TAG remanescente (%)
a	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	1:1 (-1)	28,40	14,61
b	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	5:1 (+1)	37,92	23,49
c	40 (-1)	3:1 (+1)	5 (-1)	5:1 (+1)	6,80	14,00
d	70 (+1)	3:1 (+1)	5 (-1)	1:1 (-1)	29,71	3,54
e	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	5:1 (+1)	18,65	7,42
f	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	1:1 (-1)	43,30	11,80
g	40 (-1)	3:1 (+1)	15 (+1)	1:1 (-1)	17,14	1,73
h	70 (+1)	3:1 (+1)	15 (+1)	5:1 (+1)	7,22	0,96
i	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	18,57	1,82
j	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	19,13	2,53
k	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	17,53	2,25

\* G:O: proporção molar de glicerol e óleo; [E]: concentração de enzima (% , m/m, em relação ao total de substratos). Condição experimental: 600rpm e 2 horas de reação. Metodologia analítica: cromatografia em fase gasosa.

**Tabela 15.** Matriz do planejamento experimental fracionado (valores reais e codificados) em termos de teor mássico (%) de di- e triacilgliceróis, em meio contendo Tween 65 como surfactante de grau alimentício.

Ensaio	T (°C)	G:O (mol/mol)	[E] (% , m/m)	Concentração de surfactante (% , m/m)	DAG (%)	TAG remanescente (%)
a	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	7,30	66,88
b	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	15 (+1)	19,88	35,70
c	40 (-1)	3:1 (+1)	5 (-1)	15 (+1)	3,98	54,52
d	70 (+1)	3:1 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	30,69	35,17
e	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	15 (+1)	11,69	52,14
f	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	43,10	27,36
g	40 (-1)	3:1 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	18,12	53,81
h	70 (+1)	3:1 (+1)	15 (+1)	15 (+1)	30,73	19,56
i	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	16,39	46,30
j	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	18,60	35,32
k	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	18,90	40,44

Abreviaturas: vide Tabela 14 - Condição experimental: 600rpm e 2 horas de reação. Metodologia analítica: cromatografia em fase gasosa.

**Tabela 16.** Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste *t* de Student para a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise com (a) *terc*-butanol e (b) Tween 65.  $\alpha=0,05$ .

a)				
Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de <i>t</i>	p
Média	22,22	0,24	90,75	0,000
Temperatura (°C), $x_1$	11,79	0,57	20,54	0,002
G:O (mol/mol), $x_2$	-16,85	0,57	-29,35	0,001
[E] (%), $x_3$	-4,13	0,57	-7,19	0,019
Proporção de solvente (v/v), $x_4$	-11,99	0,57	-20,88	0,002
Interação $x_1x_2$	-5,30	0,57	-9,22	0,011
Interação $x_1x_3$	-4,43	0,57	-7,71	0,016
Interação $x_1x_4$	-1,95	0,57	-3,39	0,077
b)				
Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de <i>t</i>	p
Média	19,94	0,41	48,25	0,000
Temperatura (°C)	20,83	0,97	21,49	0,002
G:O (mol/mol)	0,39	0,97	0,40	0,728
[E] (%), $x_3$	10,45	0,97	10,78	0,008
Proporção de surfactante (%)	-8,23	0,97	-8,49	0,014

Abreviaturas: vide Tabela 14.

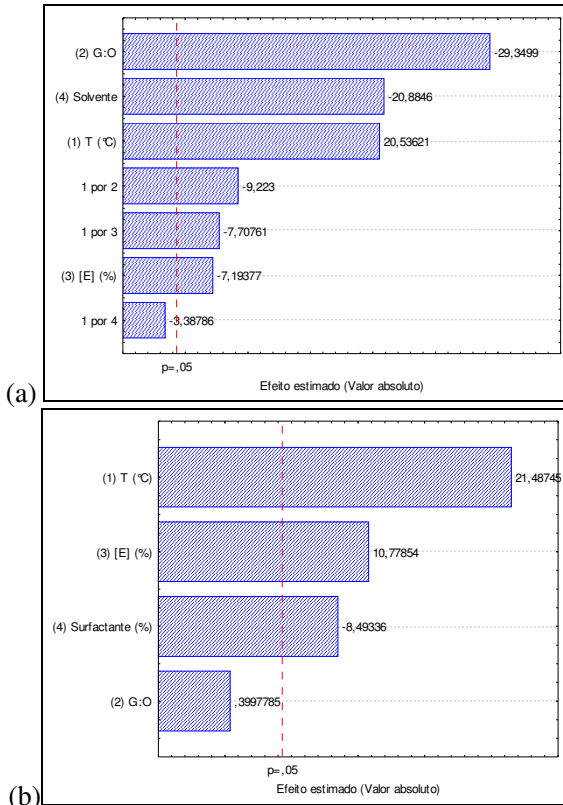
Os efeitos encontrados para as variáveis nos dois meios reacionais podem ser observados nos Gráficos de Pareto apresentados na Figura 22 (a e b). Os gráficos da distribuição normal e dos valores preditos e observados são apresentados no Apêndice A (Figuras A1 e A2).

A comparação da composição em di- e triacilgliceróis obtidos nos dois sistemas testados permite concluir que, de maneira geral, o meio contendo *terc*-butanol (Tabela 14) conduziu a um consumo mais acentuado de triacilgliceróis em 2 horas de reação do que o meio contendo Tween 65 (Tabela 15), nas condições avaliadas.

Em trabalho sobre glicerólise de óleo de girassol catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435, também se observou o consumo dos triacilgliceróis, em sua quase totalidade, após 2 horas de reação (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a).

Os resultados confirmam outros estudos da literatura, que demonstram que o *terc*-butanol é um solvente útil para reações de glicerólise, já que suas características hidrofóbicas e predominantemente hidrofílicas permitem a dissolução tanto do glicerol quanto do óleo

(Damstrup, Jensen *et al.*, 2005). Isto implica em um maior contato entre os substratos, aumentando sua difusão no meio e facilitando a conversão dos triacilgliceróis a outras frações lipídicas (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005b).



**Figura 22** – Gráfico de Pareto para a análise do efeito das variáveis sobre a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe na presença de (a) *tert*-butanol e (b) Tween 65.

Abreviaturas: vide Tabela 14.

Em algumas reações do presente estudo, o sistema contendo Tween 65 proporcionou a formação de quantidades de diacilgliceróis comparáveis às obtidas nas reações com *tert*-butanol. Os resultados encontrados em meio contendo surfactante do tipo Tween foram, de maneira geral, superiores aos obtidos na glicerólise de azeite de oliva catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 (Valério, Rovani *et al.*, 2010). No estudo



mencionado, foi possível obter um total de 41,4% e 37,4% de mono- e diacilgliceróis para os surfactantes Tween 65 e Triton X-100, respectivamente, a 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo 6:1, 16% (m/m) de surfactante e 9% (m/m) de enzima imobilizada em 2 horas de reação. Esta pesquisa relatou a formação de um teor mássico de diacilgliceróis inferior a 20 e 13% nos meios contendo Tween 65 e Triton X-100, respectivamente.

Cabe salientar que, na literatura disponível até o momento, os únicos estudos encontrados, referentes à glicerólise enzimática na presença de surfactantes de grau alimentício, estão citados no presente trabalho, e referem-se à modificação de azeite de oliva, visando à produção de mono- e diacilgliceróis (Valério, Rovani *et al.*, 2010).

Nos dois meios testados, observou-se que o produto da reação apresentou o teor máximo de diacilgliceróis, em torno de 43%, no ensaio f, no qual se utilizou a temperatura de 70°C, a enzima na concentração de 15% e uma proporção molar de 1:1 (glicerol:óleo). Nestes experimentos, o solvente foi utilizado na proporção de 1:1 (v/v, com base nos substratos) e o surfactante foi adicionado na proporção de 15% (m/m, com base nos substratos).

Também foi observado que os experimentos do ponto central do planejamento experimental forneceram um produto com teor semelhante de diacilgliceróis (em torno de 18%, em massa) para os dois meios testados, em paralelo a um consumo de triacilgliceróis superior no meio contendo solvente orgânico.

Resultados semelhantes foram encontrados na glicerólise de azeite de oliva catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435 (10%, m/m) em cerca de 2 horas de reação a 55°C, relação *terc*-butanol:substratos de 1:1 (v/v), relação glicerol:óleo de 0,5:1,5 e 600rpm (Valério, Krüger *et al.*, 2009). Um teor de cerca de 40% de diacilgliceróis pôde ser obtido na glicerólise de óleo de peixe utilizando lipase comercial imobilizada de *C. antarctica* fração B em sistema livre de solvente em cerca de 12 horas de reação a 45°C (Torres, Lin *et al.*, 2002). No presente estudo, foi possível obter um teor similar em apenas 2 horas de reação.

Pela análise da Tabela 16a, pode-se observar que, para o sistema contendo *terc*-butanol, em um nível de significância de 5%, a temperatura apresentou um efeito significativo positivo sobre o teor de diacilgliceróis, enquanto as demais variáveis (proporção molar glicerol:óleo, concentração de enzima e proporção de solventes) apresentaram um efeito significativo negativo sobre a obtenção deste produto. Percebe-se que as interações entre a temperatura e a proporção de glicerol e óleo, bem como entre a temperatura e a concentração de

enzima, também foram significativas nas condições avaliadas. Estes resultados são confirmados com a análise dos resultados apresentados na Figura 22a.

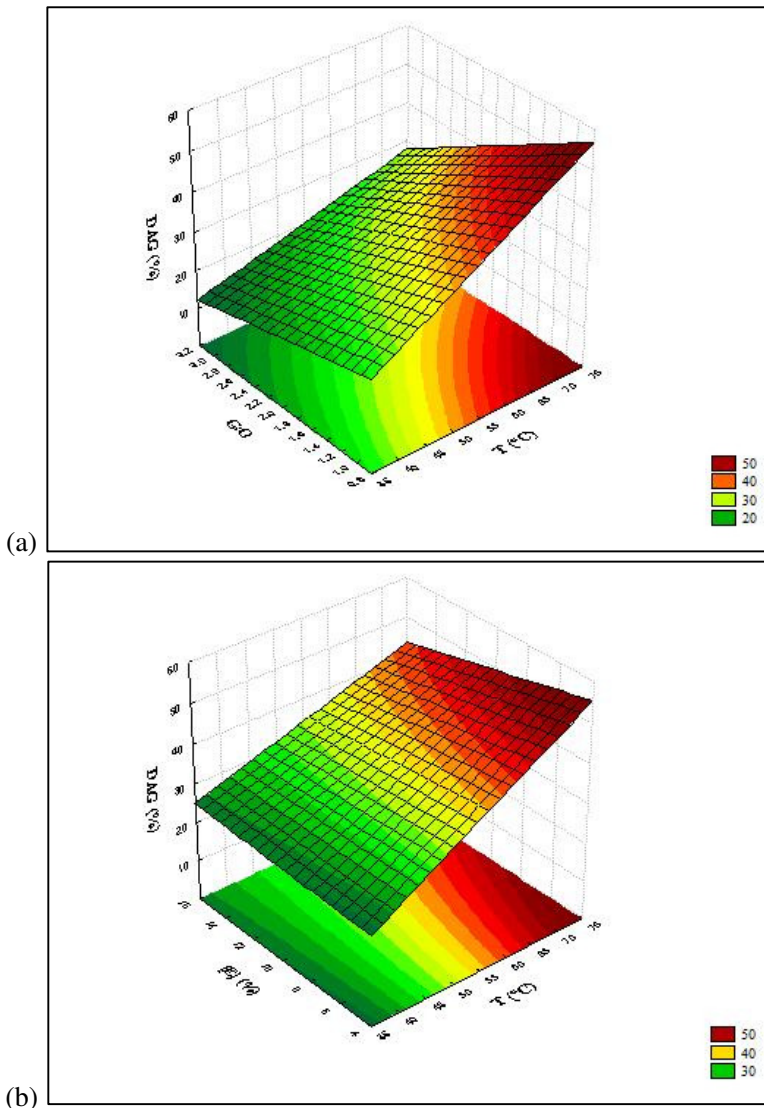
Para o sistema contendo Tween 65 (Tabela 16b), observa-se que todos os fatores, exceto a proporção molar glicerol:óleo, foram significativos para a obtenção de diacilgliceróis ( $\alpha=0,05$ ). A temperatura e a concentração de enzima apresentaram efeito significativo positivo sobre a obtenção destes acilgliceróis parciais, enquanto um incremento na proporção de surfactante causou uma redução na obtenção destes produtos. Estes resultados também são verificados na Figura 22b. As observações feitas para os dois meios indicam que o sistema reacional pode influenciar fortemente o desempenho do processo.

As superfícies de resposta para a produção enzimática de diacilgliceróis estão mostradas na Figura 23 (na presença de *tert*-butanol) e na Figura 24 (na presença de Tween 65), lembrando que as condições do processo ainda não estão otimizadas, razão pela qual, neste momento, os dados não foram ajustados a modelos matemáticos.

No meio contendo *tert*-butanol, percebe-se que houve um aumento pronunciado do teor de diacilgliceróis nas temperaturas de reação mais elevadas, em especial quando em conjunto com baixas proporções molares dos substratos (Figura 23a). A temperatura de reação apresentou forte influência sobre a produção de diacilgliceróis para toda a faixa avaliada de concentração de enzima (Figura 23b). Nas temperaturas mais altas investigadas nestes experimentos, a concentração de enzima de 5% mostrou-se mais vantajosa do que as demais quantidades avaliadas.

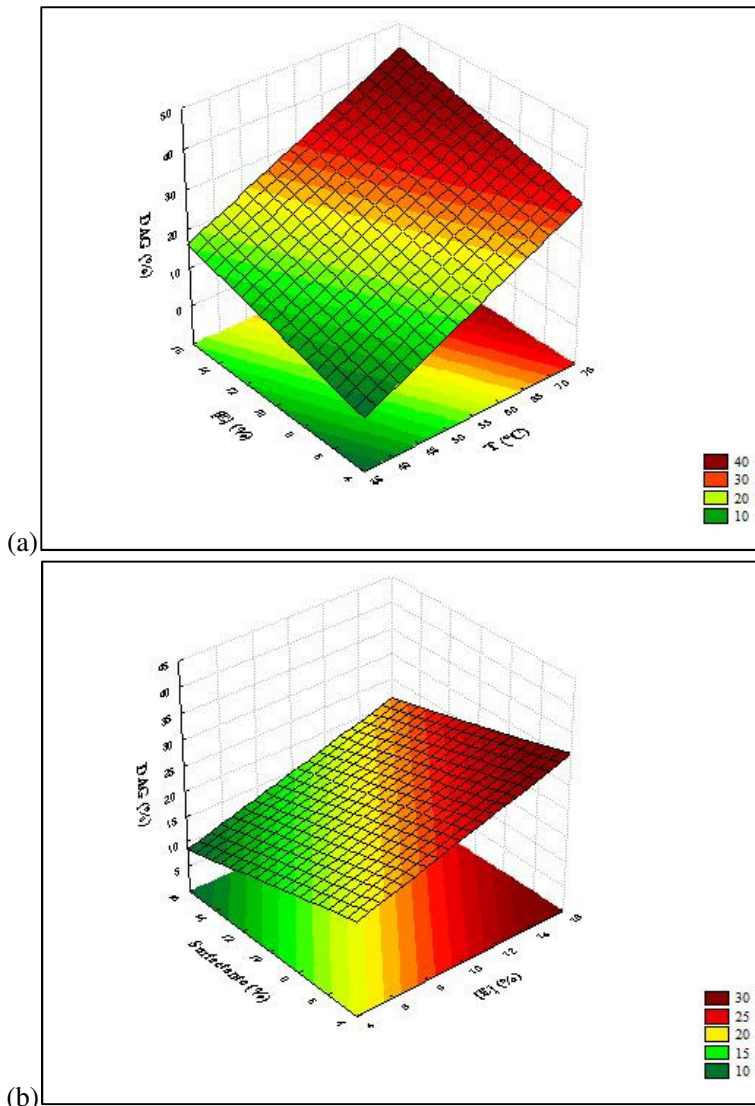
Na presença de Tween 65, houve uma maior produção de diacilgliceróis nas temperaturas mais elevadas avaliadas neste trabalho, para todas as concentrações de enzima avaliadas (Figura 24a). Para este sistema, o uso de uma temperatura de reação intermediária (55°C) também é viável para a obtenção do produto de interesse, mediante o uso de teores intermediários a altos de enzima (10 a 15%).

Pela análise da Figura 24b, percebe-se que a região de trabalho que combina as menores concentrações de surfactante (5 a 10%) e as concentrações de enzima mais elevadas (10 a 15%) é mais interessante para direcionar a reação para a produção de diacilgliceróis. Deve-se ressaltar, entretanto, que a escolha dos níveis avaliados deve priorizar a melhor relação custo-benefício.



**Figura 23** – Superfícies de resposta para a produção de diacilgliceróis (teor mássico, %) em *tert*-butanol, em função (a) da proporção molar de glicerol e óleo (G:O) e da temperatura (5% de lipase e proporção de solvente de 1:1) e (b) da concentração de enzima e da temperatura (proporção molar de glicerol e óleo de 1:1 e proporção de solvente de 1:1).

Abreviaturas: vide Tabela 14.



**Figura 24** - Superfícies de resposta para a produção de diacilgliceróis (teor mássico, %) em Tween 65, em função (a) da concentração de enzima e da temperatura (proporção molar de substratos de 1:1 e 5% de surfactante) e (b) da concentração de surfactante e de enzima (55°C, proporção molar de glicerol e óleo de 1:1).

Abreviaturas: vide Tabela 14.

Com base na análise dos gráficos apresentados na Figura 23 (*tert*-butanol) e Figura 24 (Tween 65), na análise estatística desenvolvida, na discussão dos resultados e nas informações disponíveis na literatura sobre o processo, pode-se sugerir uma região de trabalho a ser avaliada em um novo projeto experimental, para a maximização da produção de diacilgliceróis.

No caso do meio contendo *tert*-butanol, pode-se trabalhar na faixa de 55 a 70°C, utilizando-se a enzima na faixa de 5 a no máximo 10%, fixando-se a proporção molar de substratos em 1:1 (glicerol:óleo) e o solvente na proporção de 1:1 (solvente:substratos, v/v). Opcionalmente, pode-se também investigar um excesso molar de triacilgliceróis no meio, podendo-se trabalhar, por exemplo, numa faixa de 1:1 (glicerol:óleo, mol/mol) a 1:5 (glicerol:óleo, mol/mol).

Relatos da literatura indicam que a formação de diacilgliceróis é favorecida em meios em que há um excesso de triacilgliceróis, levando-se em conta que a proporção molar estequiométrica para a formação de monoacilgliceróis é de 2:1 (glicerol:óleo), o que justifica a faixa de trabalho sugerida (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a; Krüger, Valério *et al.*, 2010).

Para a reação na presença de Tween 65, sugere-se um novo projeto experimental que compreenda as temperaturas de 55 a 70°C, a enzima, por razões econômicas, na concentração de 7 a 12%, o surfactante na faixa de 1 a 5%, fixando-se a proporção molar de glicerol e óleo em 1:1.

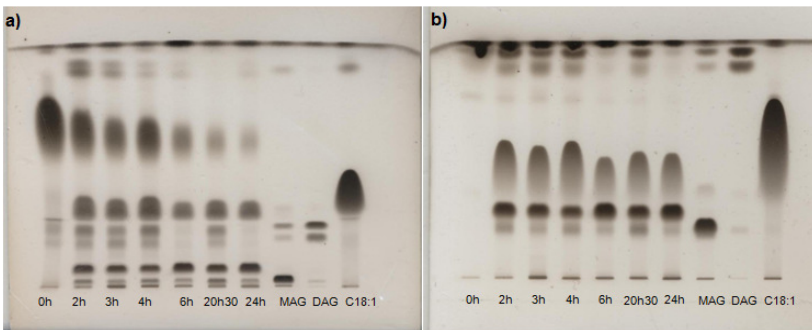
Apesar de a temperatura de 70°C ter oferecido o maior rendimento em diacilgliceróis nos ensaios realizados nesta etapa, são necessários estudos adicionais para avaliar o reuso da Novozym<sup>®</sup> 435 a esta temperatura. Desta forma, pode-se verificar se o teor de diacilgliceróis formados mantém-se constante em ciclos subsequentes de utilização desta enzima ou se a temperatura de 70°C afeta a atividade deste biocatalisador.

A partir dos resultados obtidos, percebe-se que o uso de Tween 65 como surfactante no sistema reacional pode ser uma solução simples para contornar o problema da imiscibilidade dos substratos em reações de glicerólise, especialmente quando se objetiva o uso dos produtos obtidos na indústria alimentícia. Deve-se, entretanto, avaliar a necessidade e a facilidade de purificação dos produtos em sistema contendo surfactantes.

### 4.3.3 Reações de glicerólise enzimática em meio sem solvente e sem surfactante

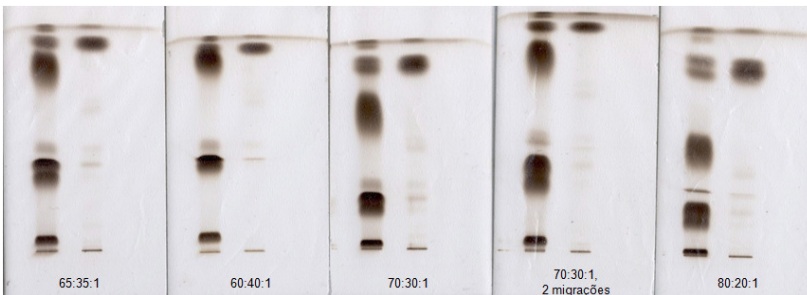
#### 4.3.3.1 Análise de mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres por cromatografia em camada delgada

Na tentativa de isolar os mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres por CCD, para a posterior quantificação dos mono- e diacilgliceróis por densitometria, diferentes sistemas de eluição foram testados (item 3.4.4), conforme indicado nas Figuras 25 e 26.



**Figura 25** - Placas de CCD com amostras de reação de hidrólise de óleo de peixe, eluídas com os sistemas de solventes (a) hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v) e (b) clorofórmio/acetona (90:10, v/v).

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; C18:1: ácido oléico. Concentração das soluções: 10mg/mL. Volume aplicado: 10 $\mu$ L.



**Figura 26** - Placas de CCD com amostras do meio de reação de glicerólise eluídas com diferentes proporções volumétricas de hexano/éter etílico/ácido acético (indicadas na figura). Ordem de eluição (a partir da linha base): MAG, DAG, AGL, TAG, ésteres alquílicos.

Concentração das soluções: 10mg/mL. Volume aplicado: 10 $\mu$ L.

O uso do sistema hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v) mostrou-se eficaz para a separação adequada de todas as frações lipídicas de interesse, cujos fatores de retenção estão indicados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Fator de retenção ( $R_f$ ) de mono- di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres com o sistema hexano/éter etílico/ácido fórmico (65:35:1, v/v/v).

Classe lipídica	$R_f$
Monoacilgliceróis	0,04
Diacilgliceróis	0,31
Ácido oléico	0,37
Triacilgliceróis	0,77

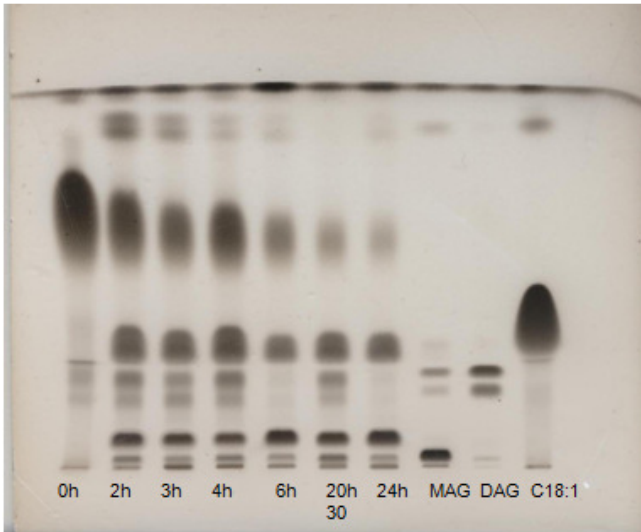
Testou-se o uso de duas placas de CCD diferentes, na tentativa de isolar e quantificar os monoacilgliceróis em uma placa, e isolar os di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres em outra placa, mas os resultados para a quantificação dos mono- e diacilgliceróis não foram válidos.

Fez-se uma tentativa de realizar a quantificação dos mono- e diacilgliceróis utilizando-se padrões puros de monooleína e dioleína, mas sua quantificação foi sempre abaixo dos valores esperados. Por esta razão, os padrões destes acilgliceróis parciais foram produzidos mediante a hidrólise enzimática do óleo de peixe OmegaPure. Inicialmente, a formação dos mono- e diacilgliceróis foi acompanhada durante 24h, conforme indicado na Figura 27 e descrito na seção 3.4.4.1. A reação foi então realizada durante 4h para a produção dos padrões de mono- e diacilgliceróis, os quais foram isolados e recuperados por placas de CCD preparativas.

Durante a implementação da análise para a quantificação dos produtos por CCD-AD/Densitometria, verificou-se que volumes abaixo de 2 microlitros não eram adequados para aplicação nas placas de CCD, pois a quantificação das frações lipídicas de interesse apresentava grande interferência do ruído de fundo. Isto implicava em grandes diferenças na quantificação das substâncias na mesma placa ou em placas diferentes.

Testou-se a construção de curvas de calibração em diferentes placas, para o uso da média dos resultados. Verificou-se, entretanto, que os resultados não eram válidos, devido principalmente a variações na

migração das amostras, provocadas por condições ambientais (umidade do ar, temperatura do ambiente). Decidiu-se então preparar uma mistura dos padrões de mono- e diacilgliceróis e aplicá-los nas placas de CCD, construindo-se as curvas de calibração a cada análise. Os volumes aplicados e a respectiva massa dos padrões estão apresentados na Tabela B1 do Apêndice B. A identificação dos picos e alguns exemplos de curvas de calibração obtidos em uma placa de CCD também estão indicados nas Figuras B1 a B3 do Apêndice B. Também estão apresentadas as figuras (B4 a B6 do Apêndice B) referentes à visualização das manchas a 510nm. Este comprimento de onda, entretanto, não foi utilizado para a quantificação dos mono- e diacilgliceróis. As soluções das amostras encontravam-se demasiadamente concentradas, provocando a saturação dos picos para estes tratamentos. Além disso, houve uma grande interferência da coloração da placa (“ruído de fundo”) para a quantificação dos picos a 510nm, conforme já comentado no item 3.4.4.

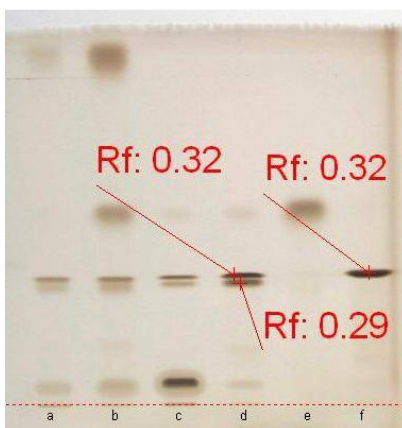


**Figura 27** - Placa de CCD do meio reacional da hidrólise do óleo de peixe pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435.

Abreviaturas: vide Figura 25. Concentração: 10mg/mL hexano. Volume aplicado: 10 $\mu$ L. Revelação: sulfato de cobre e ácido fosfórico. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v).

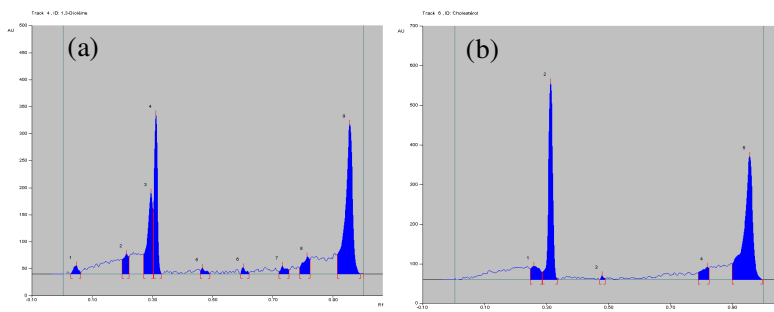


Durante o desenvolvimento da técnica para a quantificação dos mono- e diacilgliceróis por CCD-AD/Densitometria, verificou-se que os esteróis ( $R_f=0,32$ ) apresentavam fator de retenção similar ao dos diacilgliceróis ( $R_f=0,29$  e  $0,32$ , referentes aos isômeros), com o sistema de eluição hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v), como pode ser observado na Figura 28 e na Figura 29.



**Figura 28** - Placa de CCD referente às amostras (a) do meio reacional, e da mistura de padrões de (b) mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres, (c) mono- e diacilgliceróis, (d) diacilgliceróis, (e) ácido oléico e (f) colesterol.

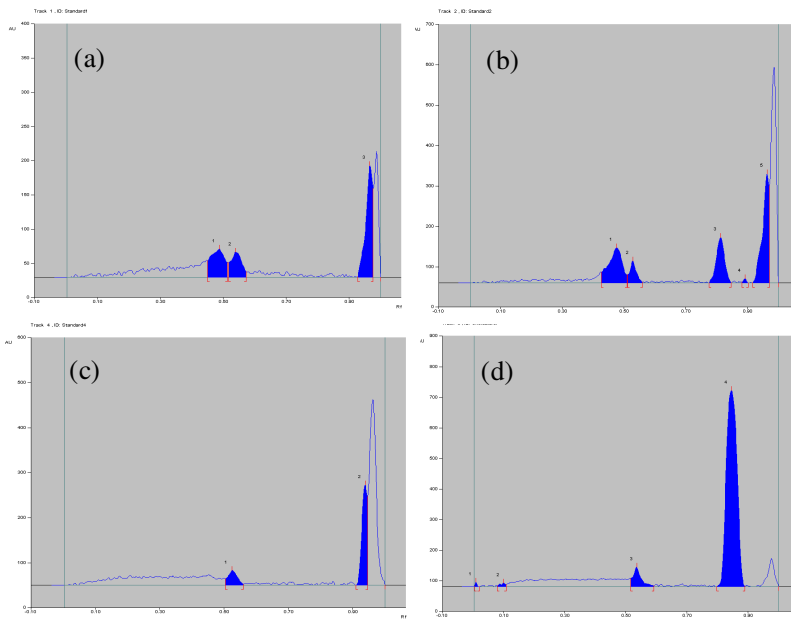
Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v). Revelação: sulfato de cobre. Fatores de retenção determinados com o software Wincats.



**Figura 29** – Picos referentes aos padrões de (a) diacilgliceróis (picos 3 e 4) e (b) colesterol (pico 2), visualizados a 200nm por densitometria, após a migração das amostras por CCD.

Nos gráficos, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorvância. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v).

Para verificar a presença de esteróis nas amostras, o sistema de solventes clorofórmio/acetona/ácido acético (85:15:1, v/v/v) foi utilizado para o desenvolvimento das placas. As bandas foram analisadas a 200nm utilizando-se o software Wincats. Os resultados estão apresentados na Figura 30. Verificou-se que os esteróis ( $R_f=0,84$ ) não estavam presentes na mistura de padrões, nem no meio de reação de glicerólise. Com este sistema de eluição, os diacilgliceróis apresentavam um fator de retenção de 0,94. O pico número 4, visualizado na Figura 30b, é referente a ácidos graxos livres ( $R_f=0,81$ ). Posteriormente, as amostras presentes nesta placa foram reveladas com cloreto férrico. Com este agente revelador, observou-se que a mancha de colesterol, de coloração violeta, não estava presente no meio reacional, nem na mistura de padrões.



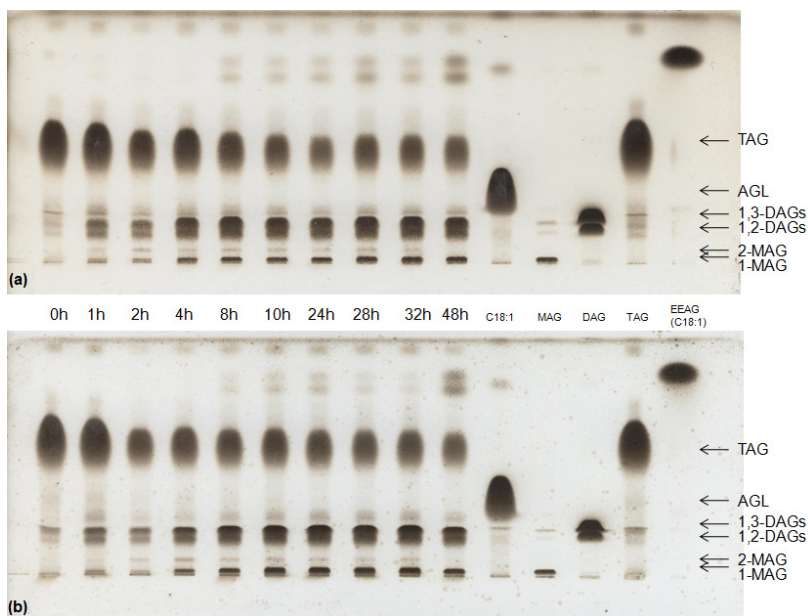
**Figura 30** – Picos referentes a amostras (a) do meio reacional, (b) da mistura de padrões, (c) do padrão de diacilgliceróis e (d) de colesterol, visualizados a 200nm por densitometria, após a migração das amostras por CCD.

Nos gráficos, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorbância. Sistema de eluição: clorofórmio/acetona/ácido acético (85:15:1, v/v/v).

### 4.3.3.2 Condicionamento da Novozym<sup>®</sup> 435 pela temperatura

Alguns experimentos foram realizados em incubadora com agitação orbital (*shaker*) para verificar se o condicionamento prévio da Novozym<sup>®</sup> 435, a 40°C durante 1h, poderia melhorar seu desempenho na produção de mono- e diacilgliceróis, em reação de glicerólise de óleo de peixe, conforme descrito na seção 3.4.6.

A atividade de água ( $a_w$ ) da lipase foi determinada em triplicata antes (0,41) e após o condicionamento (0,27) (metodologia descrita em 3.2.9). Apesar da diferença entre a atividade de água da lipase antes e após o condicionamento a 40°C, a análise qualitativa das amostras por CCD indicou que não houve diferença acentuada na formação de mono- e diacilgliceróis durante a reação de glicerólise (Figura 31).



**Figura 31** - Placas de CCD de amostras da reação de glicerólise do óleo de peixe (a) com e (b) sem condicionamento prévio da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 a 40°C durante 1h.

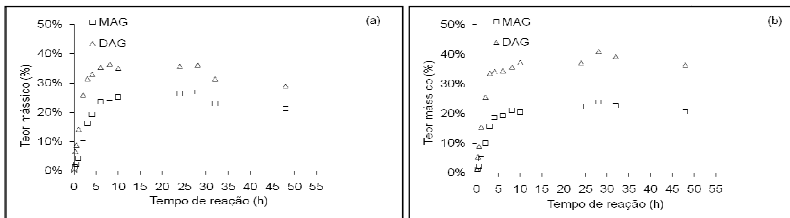
C18:1: ácido oléico; MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; TAG: triacilgliceróis; EEAG (C18:1): oleato de etila. Condições da reação: 55°C, 250rpm (*shaker*), proporção glicerol:óleo 2:1 (mol/mol), 10% de lipase (m/m, em relação ao total de substratos), 48h. Revelação da placa: sulfato de cobre. Sistema de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v).

O perfil das frações lipídicas formadas durante a reação de glicerólise foi similar para as amostras de lipase com e sem condicionamento prévio pela temperatura. Verificou-se que houve formação de mono- e diacilgliceróis já após 1h de reação, embora sua produção tenha sido mais pronunciada após 4h, para ambas as condições testadas. O teor de triacilgliceróis foi aproximadamente constante após 10h de reação.

Com base nas placas da figura acima e na ordem de eluição indicada por Christie (1982) para o sistema de solventes utilizado, pode-se observar que, em relação aos regioisômeros, houve formação preferencial de 1(3)-monoacilgliceróis ao invés de 2-monoacilgliceróis ao longo da reação. Foi possível obter quantidades consideráveis tanto de 1,2(2,3)-diacilgliceróis quanto de 1,3-diacilgliceróis. Nas condições avaliadas, houve a formação de um baixo teor de ácidos graxos livres, quando em comparação com as demais frações lipídicas formadas nestas reações de glicerólise.

Experimentos adicionais foram realizados em um banho de água do tipo Dubnoff, equipamento que posteriormente foi utilizado nos experimentos do planejamento experimental.

Durante as reações de glicerólise, amostras do meio reacional foram analisadas ao longo do tempo por CCD-AD/Densitometria, para quantificar os mono- e diacilgliceróis. Os resultados estão apresentados na Figura 32.



**Figura 32** – Teor mássico de mono- e diacilgliceróis (%) formados durante a reação de glicerólise de óleo de peixe (a) sem e (b) com condicionamento prévio da lipase Novozym® 435 a 40°C durante 1h.

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis. Condições da reação: 55°C, proporção glicerol:óleo 2:1 (mol/mol), 10% de lipase (m/m, em relação ao total de substratos), 48h. Metodologia analítica: CCD-AD/Densitometria.

O perfil de formação dos produtos foi bastante similar com e sem o condicionamento prévio da lipase pela temperatura. A aplicação do catalisador não condicionado proporcionou um teor de

monoacilgliceróis um pouco superior do que aquele obtido com o uso do catalisador condicionado. Após 10h de reação, um teor um pouco superior de monoacilgliceróis (25%, m/m) foi obtido quando o catalisador não havia sido condicionado, quando comparado com o teor (21%, m/m) após o condicionamento da enzima. Um teor similar de diacilgliceróis (35-37%, m/m) foi alcançado para os dois sistemas após 10h de incubação.

Para o experimento em que a lipase não havia sido previamente condicionada pela temperatura, foi possível obter, em 10h de reação, uma conversão molar de triacilgliceróis de 66% e uma produção de 0,713mmol e 0,569mmol de mono- e diacilgliceróis por grama de meio reacional, respectivamente.

Na reação de glicerólise de azeite de oliva na ausência de solvente, Krüger, Valério *et al.* (2010) descreveram a produção de uma quantidade de diacilgliceróis (cerca de 40%, em massa) um pouco superior e de monoacilgliceróis (15%, m/m) um pouco inferior à obtida na presente pesquisa. No trabalho mencionado, a reação ocorreu durante 12h, na presença de 10% da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 (em massa, em relação ao total de substratos), com uma proporção molar de glicerol e óleo de 3:1 sob agitação mecânica (600rpm).

Com base nestas considerações, e levando-se em conta a economia de energia no processo, as reações de glicerólise enzimática do óleo de peixe, visando à produção de mono- e diacilgliceróis, foram realizadas sem o condicionamento prévio da Novozym<sup>®</sup> 435 a 40°C durante 1 hora.

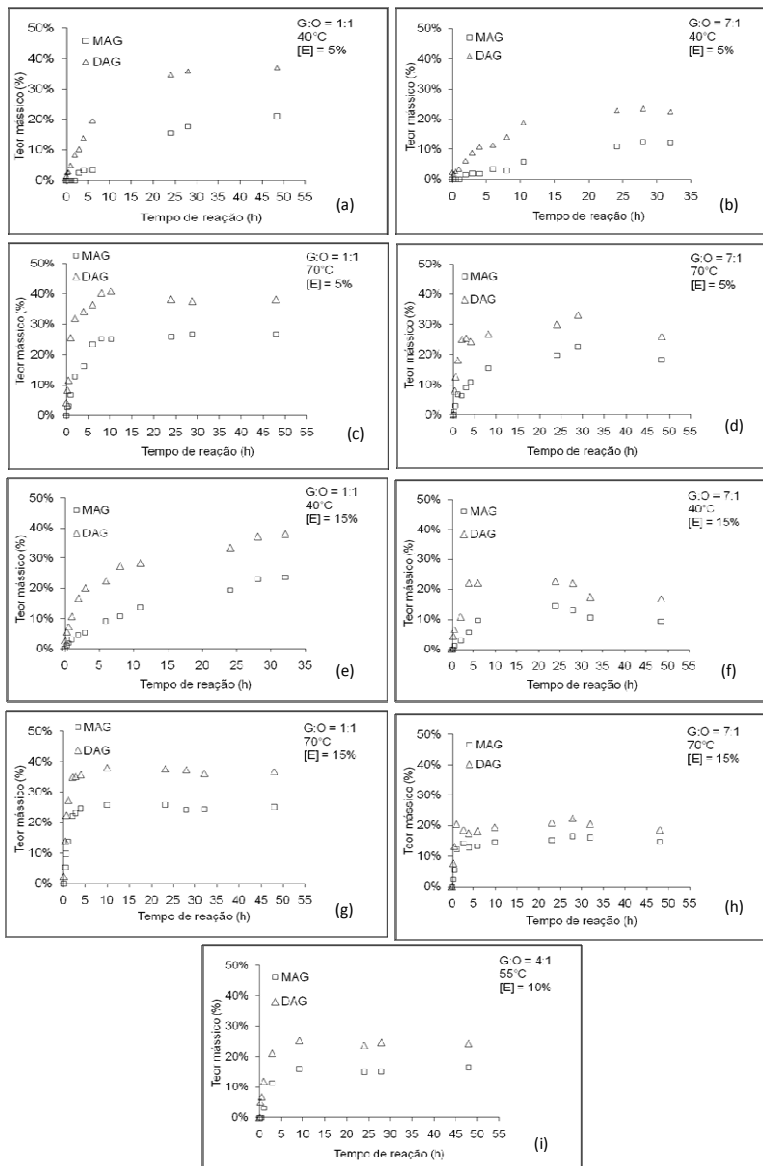
#### ***4.3.3.3 Planejamento experimental***

A atividade enzimática da Novozym<sup>®</sup> 435 utilizada nas reações de glicerólise foi de 398,13 $\mu$ mol/min (U), na reação de esterificação do *n*-propanol com o ácido oléico, de acordo com metodologia descrita na seção 3.2.10. Sua atividade de esterificação específica foi de 1,948U/mg de lipase imobilizada. Os dados e o gráfico que serviram de base para a determinação da atividade da enzima estão apresentados no Apêndice C.

Com o intuito de identificar as principais variáveis para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis, mediante a glicerólise de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante, bem como avaliar seus efeitos sobre a obtenção de tais produtos, realizou-se uma série de ensaios, nas condições definidas no planejamento experimental,

indicado na seção 3.4.8. As reações foram acompanhadas ao longo do tempo. Os resultados estão apresentados na Figura 33.

A partir das cinéticas de formação de mono- e diacilgliceróis apresentadas na Figura 33, calculou-se a velocidade inicial específica da reação para cada um destes produtos (Tabela 18). Adicionalmente, determinou-se a produtividade em mono- e diacilgliceróis no equilíbrio da reação (Tabela 19).



**Figura 33** – Perfil da produção de mono- e diacilgliceróis (teor mássico, %) na glicerólise de óleo de peixe catalisada pela Novozym® 435.

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis; G:O: proporção molar de glicerol e óleo; [E]: concentração de enzima (% m/m, em relação ao total de substratos). O eixo do tempo não tem a mesma escala para todos os gráficos. Metodologia analítica: CCD-AD/Densitometria.

**Tabela 18.** Velocidade inicial específica ( $v_{i,esp}$ ) de formação de monoacilgliceróis e diacilgliceróis (mmol de MAG ou DAG.g<sub>meio</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) nas reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe.

Ensaio	T (°C)	G:O <sup>a</sup> (mol/mol)	[E] <sup>b</sup> (% m/m)	$v_{i,esp}$ MAG (mmol MAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	$v_{i,esp}$ DAG (mmol DAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
a	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	0,021	0,96	0,049	0,99
b	40 (-1)	7:1 (+1)	5 (-1)	0,017	0,97	0,037	0,99
c	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	0,179	0,99	0,236	0,96
d	70 (+1)	7:1 (+1)	5 (-1)	0,197	0,99	0,280	0,97
e	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	0,086	0,99	0,130	0,99
f	40 (-1)	7:1 (+1)	15 (+1)	0,040	0,99	0,080	0,98
g	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	0,360	0,98	0,370	0,96
h	70 (+1)	7:1 (+1)	15 (+1)	0,357	0,99	0,327	0,98
i	55 (0)	4:1 (0)	10 (0)	0,121	0,98	0,157	0,99

<sup>a</sup>G:O = proporção molar de glicerol e óleo; <sup>b</sup>[E] = concentração de enzima (%<sup>a</sup>, m/m, em relação ao total de substratos).

**Tabela 19.** Produtividade (P) em monoacilgliceróis e diacilgliceróis (mmol de MAG ou DAG.g<sub>meio</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) alcançada no equilíbrio das reações de glicerólise enzimática de óleo de peixe.

Ensaio	T (°C)	G:O <sup>a</sup> (mol/mol)	[E] <sup>b</sup> (% m/m)	P <sub>MAG</sub> (mmol MAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	P <sub>DAG</sub> (mmol DAG.g <sub>meio</sub> <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	t (h) <sup>c</sup>
a	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	0,018	0,021	28,0
b	40 (-1)	7:1 (+1)	5 (-1)	0,013	0,014	28,0
c	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	0,069	0,064	10,3
d	70 (+1)	7:1 (+1)	5 (-1)	0,054	0,054	8,1
e	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	0,021	0,019	32,0
f	40 (-1)	7:1 (+1)	15 (+1)	0,017	0,015	24,0
g	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	0,073	0,062	10,0
H	70 (+1)	7:1 (+1)	15 (+1)	0,042	0,032	9,9
I	55 (0)	4:1 (0)	10 (0)	0,049	0,045	9,2

<sup>a</sup>G:O = proporção molar de glicerol e óleo; <sup>b</sup>[E] = concentração de enzima (%<sup>a</sup>, m/m, em relação ao total de substratos); <sup>c</sup>t = tempo no equilíbrio da reação.

Como pode se observar na Figura 33, as condições dos ensaios tiveram grande influência sobre a cinética de produção de mono- e diacilgliceróis. Com a proporção de 5% de lipase a 40°C, a formação de monoacilgliceróis foi observada somente após 3 e 2h de reação quando



se utilizou a proporção molar glicerol:óleo de 1:1 (Figura 33a) e 7:1 (Figura 33b), respectivamente. Para a maioria das reações conduzidas a 40°C (Figura 33a, b, “e” e f), o equilíbrio foi atingido no mínimo após 24h.

Para os ensaios mencionados acima, a velocidade inicial de reação foi em geral muito baixa (inferior a 0,10mmol de mono- ou diacilgliceróis.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), conforme se observa na Tabela 18 (Ensaio a, b e f). Estes resultados provavelmente estão relacionados à baixa temperatura utilizada nestes experimentos, implicando em uma interação inadequada entre o biocatalisador e os substratos imiscíveis, juntamente com uma quantidade insuficiente de catalisador.

Na reação apresentada na Figura 33e, entretanto, a velocidade inicial específica de formação de diacilgliceróis de 0,13mmol de diacilgliceróis.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Ensaio e, Tabela 18) foi um pouco superior às velocidades obtidas nas demais reações a 40°C. Isto provavelmente deveu-se à aplicação de uma alta quantidade de lipase (15%), aliada a uma baixa proporção molar de glicerol e óleo (1:1). As reações conduzidas a 40°C apresentaram baixa produtividade em mono- e diacilgliceróis (Tabela 19).

Para as reações conduzidas a 70°C, o equilíbrio foi atingido após cerca de 10h para a maioria das reações (Figura 33c, g e h). Um longo tempo, entretanto, foi necessário para atingir o equilíbrio na reação mostrada na Figura 33d, onde se utilizou a proporção molar 7:1 e 5% de lipase.

A velocidade inicial específica de produção de mono- e diacilgliceróis à temperatura de 70°C foi superior quando comparada à velocidade obtida nas demais temperaturas testadas (Tabela 18). Para as reações apresentadas na Figura 33g e h, em que se utilizou 15% de lipase, a velocidade inicial específica foi a mesma para a formação de monoacilgliceróis (0,36mmol de monoacilgliceróis.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e similar para a obtenção de diacilgliceróis (0,37 e 0,32mmol de diacilgliceróis.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para as proporções molares de glicerol e óleo de 1:1 e 7:1, respectivamente). A reação conduzida com a proporção molar de glicerol e óleo de 1:1, entretanto, mostrou uma produtividade mais alta (0,073 e 0,062mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de mono- e diacilgliceróis, respectivamente) após 10h de incubação, conforme se observa na Tabela 19.

Para a reação apresentada na Figura 33c (70°C, proporção molar de glicerol e óleo de 1:1, 5% de lipase), os teores mássicos de mono- e diésteres obtidos foram 25 e 41%, respectivamente. Nestas condições, as produtividades em mono- e diacilgliceróis foram 0,069 e 0,064mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente, após 10h de incubação (Tabela 19).

Para esta reação, apesar das menores velocidades iniciais específicas de formação de mono- ( $0,179\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e diacilgliceróis ( $0,236\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), em relação às reações com 15% de lipase (Tabela 18), a menor concentração de enzima é atrativa para o processo enzimático, que ainda apresenta alto custo. Velocidades iniciais superiores para a obtenção de mono- ( $0,197\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) e diacilgliceróis ( $0,280\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foram obtidas quando se utilizou a proporção molar de glicerol e óleo de 7:1 e 5% de enzima, mas um tempo maior de reação foi necessário para atingir o equilíbrio (no mínimo 24h) (Figura 33d).

Para a condição experimental apresentada na Figura 33i, atingiu-se o equilíbrio para a formação de mono- e diacilgliceróis após 10 horas de reação, apesar da menor temperatura ( $55^{\circ}\text{C}$ ) aplicada neste ensaio. Nas condições da reação mencionada, o produto final continha 15% de monoacilgliceróis e 25% de diacilgliceróis (em massa), sendo que a velocidade inicial específica de formação destes produtos foi 0,121 e  $0,157\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , respectivamente.

Na maioria dos ensaios, observou-se que a produção de diacilgliceróis apresentou uma velocidade inicial de reação maior do que a velocidade de produção de monoacilgliceróis (Tabela 18). Os diacilgliceróis são produtos intermediários da reação de glicerólise, formados principalmente no início da reação, como consequência da troca de radicais acila entre o glicerol e os triacilgliceróis do óleo. À medida que a reação avança, os diacilgliceróis inicialmente formados reagem com o glicerol, resultando na produção de monoacilgliceróis (Valério, Krüger *et al.*, 2009; Krüger, Valério *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, a glicerólise de óleo de peixe em meio livre de solvente, catalisada pela lipase Chirazym L2 de *C. antarctica* fração B a  $60^{\circ}\text{C}$ , resultou em maiores conversões dos triacilgliceróis originais a mono- e diacilgliceróis, bem como em maiores velocidades de reação, quando comparada com as reações a  $4^{\circ}\text{C}$  e  $45^{\circ}\text{C}$ . A  $60^{\circ}\text{C}$ , o equilíbrio foi alcançado após 12h de incubação. À temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , entretanto, foram necessários pelo menos oito dias para se atingir o equilíbrio na composição do meio (Myrnes, Barstad *et al.*, 1995).

Yang, Rebsdorf *et al.* (2005b) aplicaram a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 para catalisar a glicerólise de óleo de girassol em um sistema livre de solvente, a  $40^{\circ}\text{C}$ . Os autores obtiveram cerca de 30,0% de 1,3-DAG, 11,7% de 1,2-DAG, 11,7% de MAG, em massa, e um teor negligenciável de ácidos graxos livres após 24h de reação utilizando

10% de enzima (com relação ao total de substratos), proporção molar de glicerol e óleo de 4,5:1, respectivamente, sob agitação (500rpm).

Fregolente, Fregolente *et al.* (2008) estudaram a produção de mono- e diacilgliceróis através da glicerólise de óleo de soja em um sistema livre de solvente. Os autores mostraram que a lipase comercial imobilizada de *C. antarctica* B, CA-IM, produziu 24,02% de MAG e 48,76% de DAG, em massa, no equilíbrio da reação (24h) a 50°C, com uma baixa formação de ácidos graxos livres. Estes teores foram obtidos utilizando-se uma proporção molar de glicerol e óleo de 8 e 2% de lipase (em relação à massa de óleo). Teores similares de mono- e diacilgliceróis (24,64% e 48,28%, respectivamente) foram alcançados em 24h de reação com 10% de lipase, e, neste caso, o equilíbrio da reação foi rapidamente alcançado (dentro de 8h de incubação).

Pawongrat, Xu *et al.* (2008) investigaram a produção de monoacilgliceróis enriquecidos com EPA e DHA através da glicerólise óleo de atum catalisada pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435 em *tert*-butanol. A maior produção de monoacilgliceróis (90,8% em massa, em relação ao total de lipídios) foi alcançada após 3h a 40°C com uma proporção molar de glicerol e óleo de 4:1, uma proporção mássica de solvente e óleo de 2:1, adicionando-se 15% de lipase (em massa, em relação ao total de substratos). Apesar destas vantagens, o uso de solvente no sistema reacional implica em altos custos de processo e etapas de recuperação.

Com base na cinética de formação dos produtos de interesse, apresentada anteriormente na Figura 33, definiu-se o tempo de reação de 24h para a análise dos resultados do planejamento experimental (Tabela 20). A análise estatística dos dados de teor mássico de mono- e diacilgliceróis, em 24h de reação, está apresentada na Tabela 21a e b, respectivamente. Os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados nos gráficos de Pareto apresentados na Figura 34 (a e b). Os gráficos da distribuição normal e dos valores preditos e observados estão apresentados no Apêndice A (Figuras A3 e A4).

**Tabela 20.** Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  (níveis reais e codificados) e resultados para o teor mássico<sup>1</sup> (%) de monoacilgliceróis e diacilgliceróis obtidos após 24 horas de glicerólise enzimática de óleo de peixe.

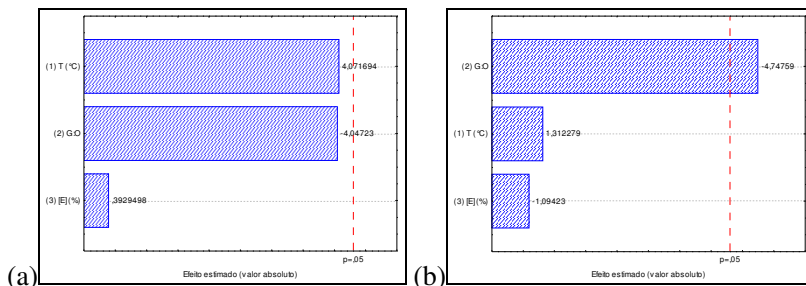
Ensaio	T (°C)	G:O <sup>a</sup> (mol/mol)	[E] <sup>b</sup> (% , m/m)	MAG (%)	DAG (%)
a	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	15,58	34,66
b	40 (-1)	7:1 (+1)	5 (-1)	10,90	22,90
c	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	25,93	38,24
d	70 (+1)	7:1 (+1)	5 (-1)	19,85	29,98
e	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	19,42	33,57
f	40 (-1)	7:1 (+1)	15 (+1)	14,33	22,51
g	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	25,85	37,74
h	70 (+1)	7:1 (+1)	15 (+1)	15,23	20,92
i	55 (0)	4:1 (0)	10 (0)	15,06	23,70
j	55 (0)	4:1 (0)	10 (0)	17,19	27,65
k	55 (0)	4:1 (0)	10 (0)	12,57	20,53

<sup>1</sup>Os resultados apresentados referem-se à média de duas determinações.

<sup>a</sup>G:O = proporção molar de glicerol e óleo; <sup>b</sup>[E] = concentração de enzima (% , m/m, em relação ao total de substratos).

**Tabela 21.** Estimativas dos efeitos, erros padrão e teste *t* de Student para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe.  $\alpha=0,05$ .

a)				
Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de <i>t</i>	p
Média	17,45	0,70	25,02	0,0016
Temperatura (°C)	6,66	1,64	4,07	0,0554
G:O (mol/mol)	-6,62	1,64	-4,05	0,0560
[E] (% , m/m)	0,64	1,64	0,39	0,7322
b)				
Variáveis	Efeitos	Erro-padrão	Valores de <i>t</i>	p
Média	28,40	1,08	26,41	0,0014
Temperatura (°C)	3,31	2,52	1,31	0,3198
G:O (mol/mol)	-11,98	2,52	-4,75	0,0416
[E] (% , m/m)	-2,76	2,52	-1,09	0,3881



**Figura 34** – Gráfico de Pareto para a análise do efeito das variáveis sobre a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante.

G:O: proporção molar de glicerol e óleo; [E]: concentração de enzima (% , m/m, em relação ao total de substratos).

Na Tabela 20, verificou-se uma produção total máxima de mono- e diacilgliceróis nas condições experimentais dos ensaios c e g, conduzidos à temperatura de 70°C.

Nas condições investigadas, em um nível de confiança de 95%, percebe-se que nenhuma das variáveis estudadas foi significativa para a produção de monoacilgliceróis (Tabela 21a). Entretanto, uma análise minuciosa dos resultados indica que tanto a temperatura ( $p=0,0554$ ) quanto a proporção molar de glicerol e óleo ( $p=0,0560$ ) são importantes para o processo em estudo, o que justifica que os efeitos destas variáveis sobre a produção de monoacilgliceróis sejam considerados. Observa-se que um incremento na temperatura de reação implicou no aumento da produção de monoacilgliceróis, enquanto um aumento na proporção de glicerol e óleo reduziu sua obtenção. Na faixa avaliada, em um nível de confiança de 95%, observa-se que a proporção molar dos substratos apresentou um efeito significativo negativo sobre a produção de diacilgliceróis. Além disso, nos experimentos realizados, as demais variáveis estudadas não apresentaram efeito estatístico significativo sobre a obtenção destes acilgliceróis (Tabela 21b). Os efeitos das variáveis sobre a formação dos produtos de interesse também podem ser visualizados nos gráficos de Pareto (Figura 34).

Encontra-se bem estabelecido na literatura que um aumento na temperatura implica em um aumento na frequência das colisões moleculares, provocando um aumento na velocidade de reação, conforme discutido por Zhong, Li *et al.* (2010) e Wang, Zhao *et al.* (2010b). Um aumento na temperatura de reação causa uma redução significativa na viscosidade dos substratos, em especial do glicerol,

conforme já verificado na seção 4.1. Isto implica em uma redução na limitação da transferência de massa durante as reações de glicerólise, melhorando o contato entre os substratos e, portanto, aumentando a velocidade inicial de reação, de acordo com conclusão já estabelecida por Wang, Zhao *et al.* (2010b). Além disso, é oportuno lembrar que a Novozym<sup>®</sup> 435 apresenta atividade em uma faixa de temperatura de 40 a 70°C.

Nas condições testadas no presente trabalho, foi possível obter teores consideráveis de mono- e diacilgliceróis utilizando-se uma baixa concentração de enzima (5% em relação ao total de substratos). Estes resultados condizem com estudo prévio que descreve que a formação de mono- e diacilgliceróis não aumenta a partir de certo limite de concentração de enzima (Valério, Krüger *et al.*, 2009). Estes autores comentaram que este fenômeno pode ser devido à formação de complexos enzima-substrato, tornando o sítio ativo da enzima indisponível para os substratos.

A literatura indica que a adição de glicerol em excesso no meio reacional pode aumentar a produção de monoacilgliceróis em reações de glicerólise (Bornscheuer, 1995). Esta estratégia foi avaliada no presente estudo, mediante o uso de diferentes proporções molares de substratos no planejamento experimental.

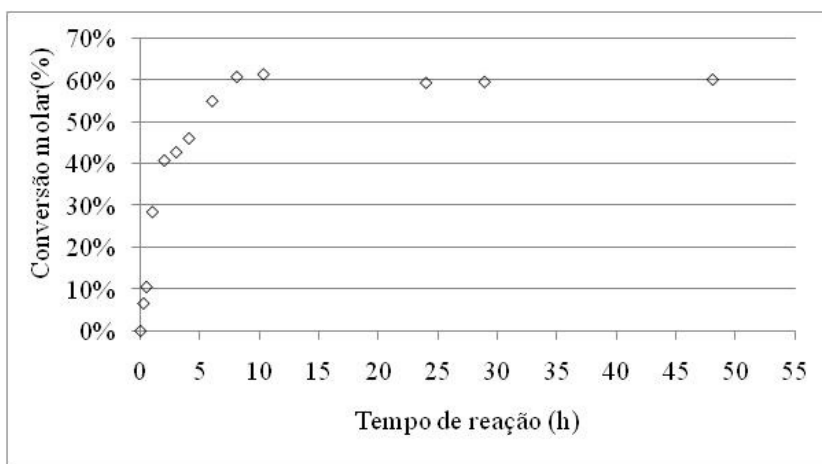
Os resultados, entretanto, mostraram que, nas condições avaliadas no presente trabalho, não foi possível aumentar a produção de monoacilgliceróis em meio contendo excesso de glicerol. Na literatura (Freitas, Da Rós *et al.*, 2009), sugere-se que uma grande quantidade de glicerol no meio pode causar a inibição da lipase, fato que pode ter ocorrido neste estudo.

Outra explicação para os resultados obtidos pode estar relacionada ao baixo nível de agitação do meio reacional, promovida pelo banho Dubnoff, resultando em limitações de transferência de massa. Isto poderia levar a um contato inadequado entre os substratos durante as reações de glicerólise, especialmente nas condições em que havia excesso de glicerol no meio, quando não se obteve um incremento na produção de monoacilgliceróis, ao contrário do que era esperado. Esta observação já foi feita em pesquisa sobre a produção de monoacilgliceróis a partir da glicerólise de óleo de girassol (Yang, Rebsdorf *et al.*, 2005a). No estudo mencionado, o aumento na quantidade de glicerol no meio reacional não implicou no aumento da formação de monoacilgliceróis. Os autores postularam que a proporção molar de substratos pode agir de duas maneiras. O aumento na quantidade de glicerol pode tanto deslocar o equilíbrio da reação no

sentido de formação de monoacilgliceróis, quanto influenciar na estabilidade e na homogeneidade do sistema. Na presente investigação, presume-se que o segundo efeito tenha predominado sobre o primeiro durante as reações.

Zhong, Li *et al.* (2010) também descreveram este problema em reações de glicerólise enzimática. No estudo destes autores, discutiu-se que a camada pesada do glicerol, juntamente com o catalisador químico utilizado, decantou no reator, causando um contato inadequado entre os substratos, resultando na ineficácia da reação.

A reação conduzida a 70°C, com 5% de lipase (em massa, em relação ao total de substratos) e com a proporção molar de glicerol e óleo de 1:1 (ensaio c, apresentado na Tabela 20) proporcionou o maior teor de mono- e diacilgliceróis entre todas as condições testadas, apesar de a velocidade de reação não ter sido a mais alta, conforme já discutido com base na cinética das reações. Nesta reação, foi possível produzir 0,733mmol monoacilgliceróis.g<sup>-1</sup> meio reacional e 0,621mmol diacilgliceróis.g<sup>-1</sup> meio reacional após 24h de reação. Na Figura 35, está apresentada a conversão molar de triacilgliceróis durante a reação de glicerólise nestas condições. Após 24h, 59% (mol/mol) dos triacilgliceróis presentes no meio reacional foram convertidos a outras espécies lipídicas. Neste tempo de reação, os produtos de interesse foram obtidos em uma fração molar relativa de 54% e 46% de mono- e diacilgliceróis, respectivamente.



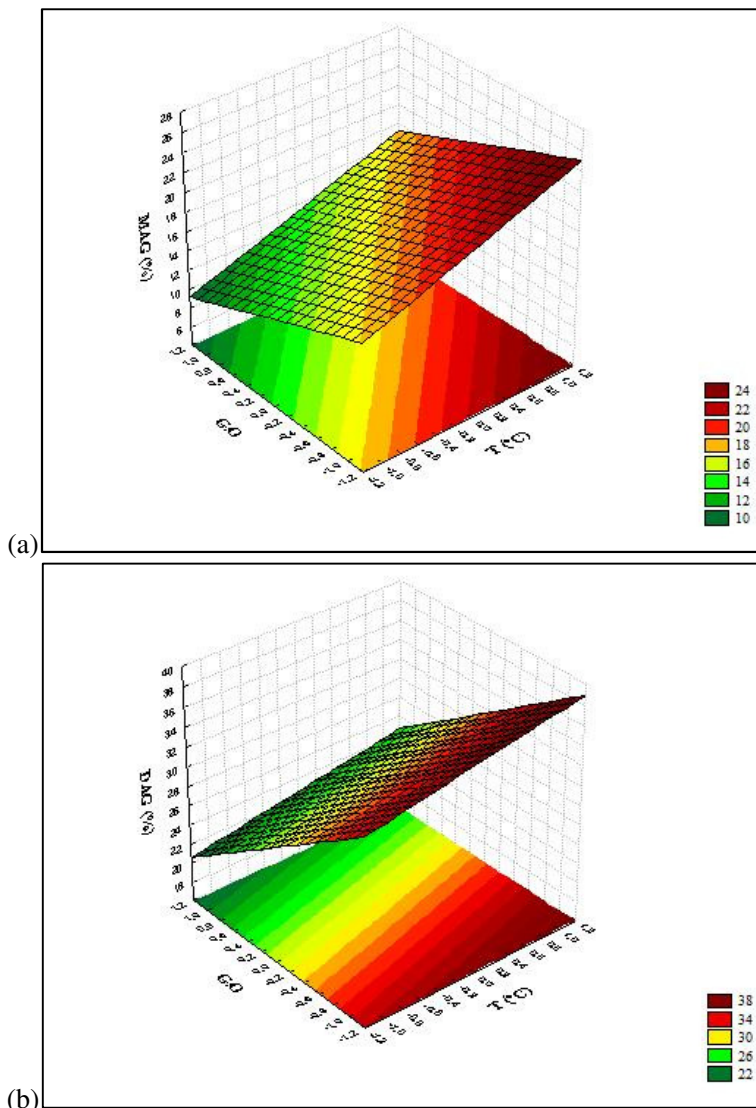
**Figura 35** – Conversão molar de triacilgliceróis na reação de glicerólise a 70°C, proporção 1:1 (glicerol:óleo, mol/mol) e 5% de lipase.

Apesar de a maioria das variáveis investigadas não ter sido estatisticamente significativa para as respostas de interesse, as superfícies de resposta para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis estão mostradas na Figura 36. Salienta-se que as condições do processo ainda não estão otimizadas para a maximização da formação de mono- e diacilgliceróis, razão pela qual os dados não foram ajustados a modelos matemáticos.

Com base na análise dos gráficos apresentados na Figura 36, na análise estatística já apresentada, na discussão dos resultados e no conhecimento prévio do processo, pode-se sugerir uma faixa de trabalho a ser investigada em um delineamento experimental futuro, visando à maximização da obtenção de mono- e/ou diacilgliceróis.

No que diz respeito à temperatura do processo, novos experimentos poderiam ser realizados entre 55 e 70°C para a maximização da obtenção de mono- e diacilgliceróis. A produção de diacilgliceróis pode ser maximizada trabalhando-se com uma proporção molar de glicerol e óleo de 1:1, sendo que pode-se avaliar uma faixa de trabalho que compreenda um excesso molar de triacilgliceróis no meio reacional. A proporção molar de substratos não apresentou influência significativa sobre a produção de monoacilgliceróis, no sistema avaliado. Deve-se reforçar, entretanto, que a baixa agitação do meio reacional pode ter prejudicado a obtenção destes produtos. Neste sentido, é interessante a realização de estudos adicionais sobre o efeito desta variável no processo, utilizando-se um sistema com agitação mecânica, que permita um contato adequado entre os substratos, a exemplo do aparato experimental que foi utilizado nos experimentos da seção 4.3.2. Neste caso, poderia ser avaliada uma faixa de 1:1 a 4:1 (proporção molar de glicerol e óleo), com base no gráfico da Figura 36a, utilizando-se as temperaturas mencionadas acima. Por razões econômicas, para a produção de mono e de diacilgliceróis, pode-se fixar a enzima no nível mais baixo estudado no presente trabalho (5%, em massa, em relação aos substratos), sendo que esta quantidade pode ser otimizada posteriormente mediante o estudo cinético da reação de glicerólise.





**Figura 36** – Superfície de resposta para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis em reação de glicerólise de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante, em função da proporção molar de glicerol e óleo (G:O) e da temperatura de reação, na presença de 5% (m/m) da lipase Novozym® 435.

G:O = proporção molar de glicerol e óleo; [E] = concentração de enzima (% m/m, em relação ao total de substratos).

É oportuno mencionar que estudos sobre o reuso da enzima seriam determinantes para verificar se a produção de mono- e diacilgliceróis mantém-se constante ao longo de ciclos subseqüentes de utilização do biocatalisador. Sabe-se que o rendimento do processo é reduzido com o uso repetido da enzima (Foglia e Villeneuve, 1997; Yang, Vali *et al.*, 2003a), especialmente quando se aplicam temperaturas de reação elevadas, o que pode não ser vantajoso para o processo. Adicionalmente, pode-se avaliar a configuração do reator, fator importante para o rendimento do processo (Borg, Girardin *et al.*, 2000).

Os reatores utilizados nos experimentos da presente seção foram inertizados antes da reação e após a retirada de cada alíquota. Deve-se ressaltar, entretanto, que é fundamental o monitoramento do índice de peróxido do meio durante a reação, para garantir a qualidade dos produtos obtidos, já que os substratos são ricos em ácidos graxos ômega-3.

#### 4.3.3.4 Composição em ácidos graxos dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis

Com o intuito de avaliar se a temperatura de reação afetou a qualidade do produto obtido, determinou-se a composição dos ácidos graxos majoritários presentes nos mono- e diacilgliceróis produzidos nas temperaturas de 55 e 70°C, no meio sem solvente e sem surfactante. Estas temperaturas proporcionaram a obtenção do maior teor destes acilgliceróis parciais nos experimentos realizados na seção 4.3.3.3. Os resultados estão apresentados na Tabela 22.

**Tabela 22.** Composição em ácidos graxos (%) dos monoacilgliceróis e diacilgliceróis obtidos após 24 horas de reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe.

T (°C)	G:O <sup>a</sup> (mol/mol)	[E] <sup>b</sup> (%, m/m)	Fração lipídica	Composição em ácidos graxos (%)					
				14:0	16:0	16:1	18:1	EPA	DHA
70	1:1	5	MAG	7,92	19,66	11,77	9,55	12,46	11,16
			DAG	10,04	18,45	11,92	8,64	14,57	13,70
55	4:1	10	MAG	8,91	22,38	11,49	10,32	7,74	20,68
			DAG	8,40	17,59	12,04	9,76	13,08	17,12

<sup>a</sup>G:O = proporção molar de glicerol e óleo; <sup>b</sup>[E] = concentração de enzima (% , m/m, em relação ao total de substratos).

Como se pode observar na tabela acima, é possível produzir mono- e diacilgliceróis ricos nos ácidos graxos ômega-3 EPA e DHA em temperaturas de 55 e 70°C. Observa-se que o teor de DHA nos mono- e diacilgliceróis foi bem superior quando se aplicou a temperatura de 55°C nas reações. Para a reação conduzida à temperatura de 55°C, os monoacilgliceróis apresentaram um teor de ácido palmítico maior e um teor de EPA menor do que na reação conduzida a 70°C.

Em estudo sobre a glicerólise enzimática de diferentes óleos de origem marinha a 5°C, em sistema livre de solventes, obteve-se, no equilíbrio, monoacilgliceróis com até 8,0% de EPA e 9,8% de DHA, 7,5% de EPA e 10,1% de DHA, e 6,4% de EPA e 7,5% de DHA utilizando-se, respectivamente, óleos de fígado de bacalhau, de foca e de baleia como substratos (Myrnes, Barstad *et al.*, 1995).

Pawongrat, Xu *et al.* (2007) descreveram a glicerólise de óleo de atum em *tert*-butil metil éter catalisada pela lipase IM-AK de *Pseudomonas fluorescens*. Na reação, foram produzidos 24,5% (em massa) de monoacilgliceróis, 18,9% de 1,2-diacilgliceróis, 9,2% de 1,3-diacilgliceróis, 41,6% de ácidos graxos livres e 5,8% de triacilgliceróis após 24h de incubação a 45°C. Monoacilgliceróis ricos em DHA (48,2%, em massa) foram os predominantes. Obtiveram-se 1,2-diacilgliceróis ricos nos ácidos palmítico (26,5%) e docosahexaenóico (25,3%). Os 1,3-diacilgliceróis obtidos eram ricos no ácido palmitoléico (41,6%).

O mesmo grupo de pesquisa descreveu a produção de monoacilgliceróis ricos nos ácidos graxos a seguir: 3,5, 29,7, 8,6, 17,1, 3,6, 6,3 e 30,5 (% em massa) dos ácidos mirístico, palmítico, oléico, linoléico, EPA e DHA, respectivamente, na glicerólise de óleo de atum em *tert*-butanol com a lipase Novozym<sup>®</sup> 435 (Pawongrat, Xu *et al.*, 2008).



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir do desenvolvimento deste trabalho permitem concluir que:

- As propriedades físicas e químicas do óleo de peixe indicaram que esta matéria-prima encontrava-se dentro dos padrões nacionais e internacionais para consumo humano;
- Verificou-se que todos os surfactantes de grau alimentício testados (Tween 65, Tween 80, Tween 85 e lecitina de soja) foram modificados pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435, em sistemas de glicerólise e de hidrólise. Apesar disto, verificou-se que houve formação de diacilgliceróis nas reações de glicerólise de óleo de peixe quando tais aditivos estavam presentes no meio. Presume-se, portanto, que todos agiram como surfactantes dos substratos imiscíveis (óleo e glicerol), ao invés de atuarem como substratos neste sistema;
- Houve conversão de triacilgliceróis em diacilgliceróis em todos meios reacionais testados nos ensaios preliminares, sendo que houve maior conversão no meio livre de solvente orgânico e de surfactante em 24 horas de reação, seguido do meio contendo *tert*-butanol, em 2 horas de reação. Os resultados nos meios contendo diferentes surfactantes de grau alimentício mostraram-se promissores;
- O uso dos solventes *n*-hexano e etanol 96% (1:1, v/v) mostrou-se eficaz para a lavagem da lipase Novozym<sup>®</sup> 435, pois promoveu uma remoção satisfatória dos resíduos aderidos à enzima, resultantes da reação de glicerólise, sem afetar a atividade do biocatalisador;
- Identificou-se que o método para a evaporação dos solventes é uma etapa crítica para a oxidação das amostras. Observou-se que a eliminação do(s) solvente(s) presente(s) nas amostras em evaporador rotativo a vácuo proporcionou o menor índice de peróxido do meio, após as reações de glicerólise, entre os diferentes sistemas de evaporação avaliados;
- Observou-se que a adição de antioxidantes ao óleo de peixe é fundamental, e recomenda-se sua reposição após as reações, já

que foi identificada a ocorrência de oxidação durante a glicerólise do óleo de peixe;

- Selecionou-se o Tween 65 como surfactante para as reações do planejamento experimental, pois este aditivo proporcionou a maior produção de diacilgliceróis nas reações preliminares (19,41%, em massa, após 2h de reação), sem perda considerável da atividade da enzima;
- Nas reações de glicerólise de óleo de peixe catalisadas pela Novozym<sup>®</sup> 435, nos ensaios do planejamento fracionado 2<sup>4-1</sup>, observou-se a formação de um alto teor de diacilgliceróis no meio livre de solvente contendo Tween 65 e no meio contendo *tert*-butanol, em 2 horas de reação. Os resultados mostraram um consumo superior de triacilgliceróis no meio contendo *tert*-butanol, provavelmente motivado pela maior homogeneidade do sistema em função do uso deste solvente orgânico. Foi possível a identificação das variáveis mais importantes e dos seus efeitos sobre a produção de diacilgliceróis;
- Nos sistemas contendo *tert*-butanol (1:1, v/v) e Tween 65 (5%, m/m), obteve-se cerca de 43% de diacilgliceróis em 2h de reação a 70°C, proporção molar de glicerol e óleo de 1:1 e 15% de enzima. Já no meio livre de solvente e de surfactante, obteve-se um teor comparável de diacilgliceróis (cerca de 40%) somente após 10 horas de reação a 70°C, proporção molar de glicerol e óleo de 1:1 e 5% de enzima. O maior contato entre os substratos, proporcionado nos meios contendo solvente e surfactante, aliada a uma intensa agitação do meio reacional, provavelmente favoreceram a obtenção de diacilgliceróis nestes sistemas, ao contrário do que ocorreu no meio contendo somente glicerol e óleo;
- Obteve-se um alto teor de monoacilgliceróis (cerca de 25%) nos ensaios a 70°C, proporção de glicerol e óleo de 1:1 e 5% de enzima no meio livre de solvente e de surfactante após 10 horas de reação de glicerólise;
- Foi possível obter um alto teor de mono- e diacilgliceróis ricos em EPA e DHA nas reações sem solvente nem surfactante conduzidas a 70°C. Neste meio, as reações conduzidas à temperatura de 55°C também proporcionaram uma quantidade satisfatória de mono- e diacilgliceróis apresentando um alto

teor destes ácidos graxos ômega-3, apesar de a velocidade inicial de reação ter sido menor nesta temperatura, quando em comparação com a reação conduzida a 70°C;

- Para todos os meios reacionais avaliados, foi possível definir as faixas de trabalho das variáveis importantes para o processo, para futuras investigações nos sistemas estudados, visando a maximização dos produtos de interesse;
- Observou-se, ainda, que a agitação mecânica do meio reacional é mais eficaz do que a agitação proporcionada pelo banho-maria do tipo Dubnoff para garantir um maior contato entre os substratos imiscíveis (óleo e glicerol).

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para uma melhor compreensão da reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe, visando à produção de mono- e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3. Estudos mais aprofundados poderão viabilizar economicamente este processo, de forma a reduzir o custo dos produtos finais, para atender às necessidades das indústrias e da população.





## 6 SUGESTÕES

A partir da consecução desta pesquisa e das conclusões delineadas anteriormente, pode-se sugerir, para a continuidade deste trabalho:

- Ajustar as condições analíticas das amostras por cromatografia gasosa utilizando detector de ionização de chama (CG-DIC), para uma melhor separação dos picos referentes às diferentes frações lipídicas produzidas nas reações de glicerólise de óleo de peixe, considerando-se as particularidades deste substrato. Desta forma, pretende-se dosar não só os diacilgliceróis, como também os monoacilgliceróis formados durante as reações;
- Ajustar as condições analíticas das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), determinando-se, em uma coluna apropriada, o teor de glicerol e, em outra coluna, os teores de ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis;
- Produzir os padrões de mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres de óleo de peixe mediante a hidrólise enzimática deste substrato, com posterior purificação de cada fração lipídica em coluna de separação, utilizando-se solventes adequados;
- Para o meio sem solvente nem surfactante, a homogeneidade dos substratos (glicerol e óleo) poderia ser melhorada mediante a aplicação de agitação mecânica durante as reações de glicerólise. Isto poderia implicar em velocidades iniciais de reação mais altas para a formação de mono- e diacilgliceróis;
- Aplicar etapas seqüenciais na estratégia da otimização das condições reacionais. Neste sentido, propõe-se desenvolver outro projeto experimental (delineamento composto central rotacional) para maximizar a produção de diacilgliceróis no meio contendo Tween 65, com base nos resultados obtidos no planejamento já realizado;
- Estudar a cinética da reação de glicerólise enzimática do óleo de peixe no meio reacional contendo Tween 65, nas condições maximizadas no planejamento de experimentos;

- Analisar a composição em ácidos graxos dos mono- e diacilgliceróis produzidos nas condições maximizadas no planejamento experimental para o meio contendo Tween 65;
- Estudar o reuso da enzima, nas condições otimizadas nas reações de glicerólise, para os diferentes meios testados;
- Aplicar a técnica de CCD-AD/Densitometria revelando-se as placas com sulfato de cobre e ácido fosfórico, realizando-se a leitura das manchas no densitômetro a 510nm, e utilizando-se concentrações adequadas das soluções de amostras. Realizar a quantificação de ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis;
- Quantificar os isômeros posicionais por CCD-AD/Densitometria, utilizando-se um sistema de solventes adequado, como, por exemplo, clorofórmio/acetona/ácido acético (96:4:1, v/v/v);
- Realizar a análise posicional dos isômeros formados, a saber, 1(3)-monoacilgliceróis, 2-monoacilgliceróis, 1,2(2,3)-diacilgliceróis, 1,3-diacilgliceróis, para os diferentes meios testados;
- Avaliar a extração líquido-líquido ou a centrifugação do meio ao final das reações, visando à remoção do glicerol presente no meio reacional, de forma a dosar o teor de mono- e diacilgliceróis em relação ao total de mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres presentes;
- Avaliar a reação de glicerólise de óleo de peixe utilizando-se outras lipases (comerciais ou não comerciais) como catalisadores;
- Avaliar a reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe em ultrassom, utilizando-se os meios reacionais testados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

ABOISSA. **Informativo Semanal - Glicerinas** 2009.

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 808-813, 2009.

ADHIKARI, S.; FERNANDO, S.; HARYANTO, A. Production of hydrogen by steam reforming of glycerin over alumina-supported metal catalysts. **Catalysis Today**, v. 129, n. 355-364, 2007.

ADLERCREUTZ, P. Modes of using enzymes in organic media. In: KOSKINEN, A. M. P. e KLIBANOV, A. M. (Ed.). **Enzymatic reactions in organic media**. London: Chapman & Hall, 1996. p.9-42.

AFNOR. **Norme AFNOR NF T 60-204**. NORMALISATION, A. F. D. Paris, France: AFNOR 1985.

ALLEN, D. A. Fish oil compositions. In: HAMILTON, R. J. e RICE, R. D. (Ed.). **Fish oil: technology, nutrition and marketing**. Bridgewater: PJ Barnes & Associates, 1995. cap. 6, p.95-108.

ANN, C. J.; STOCKENSTROM, G. N.; KUMAR, M. R.; JOHN, P. C.; MADRIE, P.; ANDREW, M. B.; DARYL, E.-D. M.; DEAN, B.; FRANCOIS, M. S.; SHAVANI, R. **Process for preparing (-) menthol and similar compounds**. PATENT, U. USA: CSIR. US Patent 7026144 2006.

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

\_\_\_\_\_. **Produção nacional de biodiesel puro - B100 (metros cúbicos)**. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, G. N. E. B. Brasília: ANP 2010.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 1989.

\_\_\_\_\_. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4. Champaign: AOCS Press, 1990.

ARCOS, J. A.; OTERO, C.; HILL JR., C. G. Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 6, p. 617-621, 1998.

ARO, T.; TAHVONEN, R.; MATTILA, T.; NURMI, J.; SIVONEN, T.; KALLIO, H. Effects of season and processing on oil content and fatty acids of baltic herring (*Clupea harengus membras*). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6085-6093, 2000.

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

BAILEY, A. E. **Aceites y Grasas Industriales**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Reverté, 1961. 741

\_\_\_\_\_. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 4. New York: John Wiley & Sons, 1979.

BAROUH, N.; PIOMBO, G.; GOLI, T.; BARÉA, B.; PINA, M.; LAGO, R.; VILLENEUVE, P. Enzymatic production of conjugated linoleic acid monoacylglycerols from dehydrated isomerized castor bean oil. **Journal of Food Lipids**, v. 15, p. 13-27, 2008.

BENDIKIENĒ, V.; SURINĒNAITĒ, B.; BACHMATOVA, I.; MARCINKEVICIENĒ, L.; JUODKA, B. The specificity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. Hydrolysis. **Biologija**, v. 1, p. 27-30, 2005.

BENDIKIENĒ, V.; SURINĒNAITĒ, B.; BACHMATOVA, I.; MARCINKEVICIENĒ, L.; JUODKA, B. Tweens and ionic detergents in the hydrolytic activity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. **Biologija**, v. 54, n. 4, p. 242-246, 2008.

BNF. Conference reports: n-3 fatty acids and health. 2000. Disponível em:

<[www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html](http://www.nutrition.org.uk/information/energyandnutrients/requirements.html)>. Acesso em: 13 de janeiro de 2006.

BOCKISCH, M. Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. In: (Ed.). **Fats and Oils Handbook**. Champaign: AOCS Press, 1993. p.53-120.

BORG, P.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; BARTH, D. Comparison between two processes for the enzymatic synthesis of tri-docosaheptaenoylglycerol in a solvent-free medium. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 777-781, 2000.

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

BOSLEY, J. A.; CASEY, J.; MACRAE, A. R.; MYCOCK, G. **Process for the esterification of carboxylic acids with tertiary alcohols using a lipase from *Candida antarctica***. PATENT, U. S. US Patent 5658769 1997.

BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J. A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, n. 1-4, p. 190-192, 2005.

BRASIL. **Portaria n. 371 de 26 de abril de 1999**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 1999a.

\_\_\_\_\_. **Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 3- Gelados Comestíveis**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 384 de 05 de agosto de 1999 1999b.

\_\_\_\_\_. **Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas funções**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 386 de 05 de agosto de 1999 1999c.

- BRASIL, L., DECRETOS, ETC. Resolução RDC n. 270 de 22 de setembro de 2005. 2005. Disponível em: < [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) >. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.
- BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R. J.; WOLMARK, N. Positional distribution of fatty acids in triglycerides of animal depot fats. **Biochimica et biophysica acta**, v. 116, p. 67-72, 1966.
- CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F. D.; ANDERSON, W. A. Fine Chemicals by Biotransformation using Lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F. D.; 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.
- CHEETHAM, P. S. J. Principles of Industrial Biocatalysis and Bioprocessing. In: WISEMAN, A. (Ed.). **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 3. Cornwall: Ellis Horwood Limited, 1995. p.83-234.
- CHO, K.; HONG, J.; LEE, K. Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 99-107, 2010.
- CHOJNACKA, A.; GLADKOWSKI, G.; KIELBOWICZ, G.; WAWRZENCZYK, C. Enzymatic enrichment of egg-yolk phosphatidylcholine with  $\alpha$ -linolenic acid. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 705-709, 2009.
- CHRISTIE, W. W. **Lipid analysis**. 2 ed. Oxford: Pergamon Press, 1982. 207
- CNPE. **Resolução CNPE nº 6 de 16/9/2009**. Brasília: Conselho Nacional de Política Energética 2009.

Comitê Europeu para Padronizações. **EN 14105 - Fat and oil derivatives - fatty acid methyl esters (FAME) - determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents - Reference method** Norma DIN EN nº 14105 do Comitê Europeu para Padronizações. European Committee for Standardization, 2003.

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

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

\_\_\_\_\_. Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in *tert*-pentanol: process optimization by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 1, p. 27-33, 2006.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P. SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, p. 225-231, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DEVI, P.; ZHANG, H.; DAMSTRUP, M.L.; GUO, Z.; ZHANG, L.; LUE, B.M.; XU, X. Enzymatic synthesis of designer lipids. **OCL**, v. 15, n. 3, p. 189-195, 2008.

DMYTRYSHYN, S. L.; DALAI, A. K.; CHAUDHARI, S. T.; MISHRA, H. K.; REANEY, M. J. Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 1, p. 55-64, 2004.

DUNFORD, N. T. Oil- and oilseed-based bioactive compounds and their health effects. In: DUNFORD, N. T. e DUNFORD, H. B. (Ed.). **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**. Champaign: AOCS Press, 2004. p.18.

EOM, T.-K.; KONG, C.-S.; BYUN, H.-G.; JUNG, W.-K.; KIM, S.-K. Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its anti-obesity effect in C57BL/6J mice. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 738-743, 2010.

ESMELINDRO, Â. F. A.; FIAMETTI, K. G.; CENI, G.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Lipase-catalyzed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 1, p. 64-69, 2008.

ETHIER, S.; WOISARD, K.; VAUGHAN, D.; WEN, Z. Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 88-93, 2011.

FAO. **Fishery and aquaculture statistics 2007**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009a.

\_\_\_\_\_. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009b.

\_\_\_\_\_. **Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service**: U.S. Food and Drug Administration 2010.

FAO-WHO, C. A. Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards, CODEX-STAN 19. 1981, revisão 1999.

Disponível em: <

[http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp) >. Acesso em:

11 de dezembro de 2005.

FDA. Code of Federal Regulations: 21 CFR 184 - Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. 1995, revision 2003. Disponível em: < <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF184.html> >. Acesso em: 11 de dezembro de 2005.

\_\_\_\_\_. **21 CFR 184.1505 - Mono- and diglycerides**: U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, Chapter I, Subchapter B, Part 184, subpart b, section 184.1505. 2008a.



\_\_\_\_\_. **Part 172 - Food additives permitted for direct addition to food for human consumption:** U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, Chapter I, Subchapter B, Part 172 2008b.

\_\_\_\_\_. **21 CFR 172.838 - Polysorbate 65:** U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, Chapter I, Subchapter B, Part 172, subpart I, section 172.838 2010a.

\_\_\_\_\_. **21 CFR 184.1472 - Menhaden oil:** U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, Chapter I, Subchapter B, Part 184, subpart b, section 184.1472. 2010b.

\_\_\_\_\_. **21CFR182.1320 - Glycerin:** U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 3, Chapter I, Subchapter B, Part 182, subpart b, section 182.1320. 2010c.

FELTES, M. M. C. **Síntese química e enzimática de triglicerídios estruturados a partir de óleo de peixe.** 2006. 120 Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J.L.; SPILLER, V.R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 682-690, 2010.

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

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry.** 3. New York: Marcel Dekker, 1996.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; KOTA, K.; BANDI, R. Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. **Fuel**, v. 86, n. 17-18, p. 2806-2809, 2007.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; FONSECA, M. M. R. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial

immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 699-711, 2001.

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

FOGLIA, T. A.; VILLENEUVE, P. *Carica papaya* latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 11, p. 1447-1450, 1997.

FOMUSO, L. B.; CORREDIG, M.; AKOH, C. C. Effect of emulsifier on oxidation properties of fish-oil base structured lipid emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2957-2961, 2002.

FORDE, J.; Ó FÁGÁIN, C. Immobilized enzymes as industrial biocatalysts. In: FLYNNE, W. G. (Ed.). **Biotechnology and Bioengineering**. New York: Nova Science Publishers, 2008. cap. 1, p.9-36.

FREGOLENTE, P.; PINTO, G.; WOLF-MACIEL, M.; FILHO, R. Monoglyceride and Diglyceride Production Through Lipase-Catalyzed Glycerolysis and Molecular Distillation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 1879-1887, 2010.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; PINTO, G. M. F.; BATISTELLA, B. C.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 165-172, 2008.

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

FREITAS, L.; CASTRO, M. B. A.; BRUNO, L. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Utilização do glicerol residual obtido na produção de

biodiesel para a síntese de monoglicerídios via glicerólise enzimática. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008. Recife.

FREITAS, L.; CASTRO, M. B. A.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Estratégias para inibir a oxidação lipídica na síntese enzimática de monoglicerídios via glicerólise. In: SINAFERM, Simpósio Nacional de Fermentações, 2009. Natal. SINAFERM. p.1-6.

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

FREITAS, L.; PAULA, A. V.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. Z.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO<sub>2</sub>-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 87-90, 2010. ISSN 1381-1177.

GAIS, H. J.; THEIL, F. Hydrolysis and formation of carboxylic acid esters. In: DRAUZ, K. e WALDMANN, H. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. Weinheim: Wiley-VCH, v.2, 2002. p.335-578.

GAO, X.-G.; CAO, S.-G.; ZHANG, K.-C. Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 74-82, 2000.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.

GERVAJIO, G. C. Fatty acids and derivatives from coconut oil. In: F., S. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6: John Wiley & Sons, Inc., 2005. cap. 1,

GOLDBERG, I., Ed. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Chapman & Hall, p.571ed. 1994.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production

of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, v. 7, n. 5-6, p. 329-336, 2005.

GORDON, D. T.; RATLIFF, V. The implications of omega 3 fatty acids in human health. In: FLICK, J., G.J. e MARTIN, R. E. (Ed.). **Advances in seafoods biochemistry: composition and quality**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1992. p.69-91.

GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO, E.; NINOW, J. L. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, 2009.

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

GULATI, R.; ARYA, P.; MALHOTRA, B.; PRASAD, A. K.; SAXENA, R. K.; KUMAR, J.; WATTERSON, A. C.; PARMAR, V. S. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6) - monostearate. **Arkivoc**, v. iii, p. 159-170, 2003.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1535-1549, 1999.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. Marine oils: fish and whale oils. In: GUNSTONE, F. D. (Ed.). **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994. cap. 3, p.167-171.

GUO, Z.; SUN, Y. Solvent-free enzymatic synthesis of 1,3-diconjugated linoleoyl glycerol optimized by response surface methodology. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 619-622, 2004.

\_\_\_\_\_. Solvent-free production of 1,3-diglyceride of CLA: strategy consideration and protocol design. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1076-1084, 2007.

GUTIÉRREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A.; FERREIRA, M. L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse

triglycerides and phospholipids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 35-43, 2007.

HALLING, P. Enzymic conversions in organic and other low-water media. In: DRAUZ, K. e WALDMANN, H. (Ed.). **Enzyme catalysis in organic synthesis**. Weinheim: Wiley-VCH, v.1, 2002. cap. 8, p.259-285.

HANH, H. D.; DONG, N. T.; OKITSU, K.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition. **Renewable Energy**, v. 34, n. 780, p. 780-783, 2009.

HARALDSSON, G. G.; THORARENSEN, A. The Generation of Glyceryl Ether Lipids Highly Enriched with Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 41, p. 7681-7684, 1994.

HARRIS, W. S.; MOZAFFARIAN, D.; LEFEVRE, M.; TONER, C. D.; COLOMBO, J.; CUNNANE, S. C.; HOLDEN, J. M.; KLURFELD, D. M.; MORRIS, M. C.; WHELAN, J. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 804S-819S, 2009.

HARTVIGSEN, M. S.; MU, H.; HOY, C.-E. Influence of Maternal Dietary n-3 Fatty Acids on Breast Milk and Liver Lipids of Rat Dams and Offspring - A Preliminary Study. **Nutrition Research**, v. 23, p. 747-760, 2003.

HASENHUETTL, G. L. Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. In: HASENHUETTL, G. L. e HARTEL, R. W. (Ed.). **Food emulsifiers and their applications**: Springer Science + Business Media, 2008. cap. 2,

HASSELMANN, M.; KUMMERLEN, C. Les lipides intraveineux: aspects qualitatifs. **Nutrition Clinical Métabolisme**, v. 12, n. 1, p. 117-126, 1998.

HHS; USDA. **Dietary Guidelines for Americans 2005**: U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture 2005.

- HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMANN, B. Emulsions and emulsifiers. In: HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B., *et al* (Ed.). **Surfactants and polymers in aqueous solution**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002. cap. 21, p.451-471.
- HOSSAIN, M. J.; TAKEYAMA, T.; HAYASHI, Y.; KAWANISHI, T.; SHIMIZU, N.; NAKAMURA, R. Enzymatic activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in an AOT/Tween 85 mixed reverse micellar system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 423-428, 1999.
- HUSSON, E.; HUMEAU, C.; BLANCHARD, F.; FRAMBOISIER, X.; MARC, I.; CHEVALOT, I. Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 55, p. 110-117, 2008.
- HÁJEK, M.; SKOPAL, F. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3242-3245, 2010.
- IBGE. **Tabelas de composição de alimentos**. 5. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. 137
- IRIMESCU, R.; IWASAKI, Y.; HOU, C. T. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 9, p. 879-883, 2002.
- ISEO. **Food fats and oils**. Nova York: Institute of Shortening and Edible Oils 2006.
- ISO. **Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination de la composition des acides gras en position 2 dans les triglycérides**. ISO 6800:1997. ORGANIZATION, I. S. F. 1997.
- ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, 2005.

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

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JECFA. Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate. 2009. Disponível em: <  
<http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/chemical.aspx?chemID=3586>>. Acesso em: 06 novembro 2010.

JEROMIN, L.; WOZNY, G.; LI, P. **Process for the productin of monoglyceride based on the glycerolysis of methyl ester.** PATENT, U. S. US 6127561 2000.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, p. 338-347, 2007.

JUDDE, A.; VILLENEUVE, P.; ROSSIGNON-CASTERA, A.; LE GUILLOU, A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oils stability and their synergism with tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 1209-1215, 2003.

KANDASAMY, R.; JOHN KENNEDY, L.; VIDYA, C.; BOOPATHY, R.; SEKARAN, G. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 58-65, 2010.

KAO. Diacylglycerol Application Technology Based on Long-established Fat and Oil Research. 2010. Disponível em: <  
[http://www.kao.com/jp/en/corp\\_rd/development\\_01\\_00.html](http://www.kao.com/jp/en/corp_rd/development_01_00.html)>. Acesso em: 30 outubro 2010.

KENNEDY, J. F. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. (Ed.). **Handbook of enzyme biotechnology**. 3. London: Ellis Horwood, 1995. p.235-310.

KHARE, S. K.; NAKAJIMA, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* Lipase on Celite and its Application for Enrichment of Docosaheptaenoic Acid in Soybean Oil. **Food Chemistry**, v. 68, p. 153-157, 2000.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446-451, 2002.

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

KODALI, D. R.; LIST, G. R., Eds. **Trans fats alternatives**. Champaign: AOCS Press, p.133ed. 2005.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 561-565, 2005.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 2747-2757, 2002.

KROG, N. Food Emulsifiers. In: GUNSTONE, F. D. e PADLEY, F. B. (Ed.). **Lipid technologies and applications**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.521-534.

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

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



KULAS, E.; OLSEN, E.; ACKMAN, R. G. Oxidation of fish lipids and its inhibition with tocopherols. In: KAMAL-ELDIN, A. (Ed.). **Lipid Oxidation Pathways**. Champaign: AOCS Press, 2003. p.37-69.

LANDS, W. E. M. **Fish, omega-3 and human health**. 2. Champaign: AOCS Press, 2005. 220

LANGONE, M.; SANT'ANNA, G. L. Enzymatic synthesis of medium chain triglycerides. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n. 79, p. 759-770, 2002.

LEE, C. F. Processing fish meal and oil. In: STANSBY, E. M. (Ed.). **Industrial fishery technology**. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1963. p.219-235.

LEON-CALDERON, F.; SCHMITT, V.; BIBETTE, J. **Emulsion science: basic principles**. 2. New York: Springer, 2007. 227

LI, Z.-Y.; WARD, O. P. Lipase-catalyzed 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.

LINDER, M.; KOCHANOWSKI, N.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Response surface optimisation of lipase-catalysed esterification of glycerol and *n*-3 polyunsaturated fatty acids from salmon oil. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 273-279, 2005.

LIU, Y.; LIN, Q.; SHAN, L.; LIN, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 15, p. 402-407, 2008.

LO, S.-K.; TAN, C.-P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A; LAI, O.-M. Diacylglycerol Oil—Properties, Processes and Products: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, p. 223-233, 2008.

MACRAE, A. R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 60, n. 2, p. 243-246, 1983.

MAJER, S.; MUELLER-LANGER, F.; ZELLER, V.; KALTSCHMITT, M. Implications of biodiesel production and utilisation on global climate

- A literature review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 747-762, 2009.
- MAKI, K.; DAVIDSON, M.; TSUSHIMA, R.; MATSUO, M.; TOKIMITSU, I.; UMPOROWICZ, D.; DICKLIN, M.; FOSTER, G.; INGRAM, K.; ANDERSON, B.; FROST, S.; BELL, M. Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1230-1236, 2002.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- MATSUO, N. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods. **Food Science and Technology Research**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2004.
- MATSUO, N.; TOKIMITSU, I. Metabolic characteristics of diacylglycerol. **Inform**, v. 12, p. 1098-1102, 2001.
- MAZUR, A. W.; HILER, G. D.; EL-NOKALY, M. **Process for preparing 2-acylglycerols or 1,2-diacyl diglycerides or 2,3- diacyl diglycerides**. PATENT, U. S. USA: The Procter & Gamble Company. US 5116745 1992.
- MCCLEMENTS, D. J. Lipid-based emulsions and emulsifiers. In: AKOH, C. C. e MIN, D. B. (Ed.). **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3ed. Boca Ratón: CRC Press, 2008. cap. 3, p.63-98.
- MCNEILL, G. P.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. **A method of producing monoglyceride**. APPLICATION, E. P. EP 0445692 A3 1991.
- MENG, X.; ZOU, D.; SHI, Z.; DUAN, Z.; MAO, Z. Dietary Diacylglycerol Prevents High-Fat Diet-Induced Lipid Accumulation in Rat Liver and Abdominal Adipose Tissue. **Lipids**, v. 39, n. 1, p. 37-41, 2004.

- MICOV, M.; LUTIŠAN, J.; CVENGROŠ, J. Balance equations for molecular distillation. **Separation Science and Technology**, v. 32, n. 18, p. 3051 – 3066, 1997.
- MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 641-644, 2003.
- MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F. Production of monoolein from oleic acid and glycerol in supercritical carbon dioxide media: a kinetic approach. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 40-47, 2008.
- MORITA, O.; KNAPP, J. F.; TAMAKI, Y.; VARSHO, B. J.; STUMP, D. G.; NEMEC, M. D. Effects of dietary diacylglycerol oil on embryo/fetal development in rats. **Food and Chemical Technology**, v. 46, p. 2510-2516, 2008.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Glicerocquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- MU, H.; HOY, C.-E. Effects of different medium-chain fatty acids on intestinal absorption of structured triacylglycerols. **Lipids**, v. 35, n. 1, p. 83-89, 2000.
- MYRNES, B.; BARSTAD, H.; OLSEN, R. L.; ELVEVOLL, E. O. Solvent-free enzymatic glycerolysis of marine oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p. 1339-1344, 1995.
- NIELSEN, N. S.; GÖTTSCHE, J. R.; HOLM, J.; XU, X.; MU, H.; JACOBSEN, C. Effect of structured lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 250, n. 1-2, p. 411-423, 2005.
- NOUREDINI, H.; MEDIKONDURU, V. Glycerolysis of fats and methyl esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 419-425, 1997.
- NOVOZYMES. **Novozymes Standard Method: Immobilised lipase activity based on ester synthesis (Propyl laurate units; PLU)**. Novozymes, p.6p. 2004

\_\_\_\_\_. **Ficha de informação de produto: Novozym 435**. Novozymes, p.2p. 2010a

\_\_\_\_\_. **Novozym 435, carrier and enzyme leakage studies**. Novozymes, p.3p. 2010b

OLEOLINE. **Glycerine market report**. Montmorency. 2005

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

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z. Glycerol residue - a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oil Science**, v. 53, p. 29-33, 2004.

OPPE, E. E. G.; SALVAGNINI, W. M.; TAQUEDA, M. E. S. Redução da demanda energética na desidratação da glicerina obtida a partir de biodiesel. 8º CONGRESSO IBEROAMERICANO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 2007. Cuzco.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 1, p. 93-103, 2002.

\_\_\_\_\_. Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-base oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 451-456, 2004.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 542-547, 2003.

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.

\_\_\_\_\_. Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 256-262, 2008.

PELLA, D.; DUBNOV, G.; SINGH, R.B.; SHARMA, R.; BERRY, E.M.; MANOR, O. Effects of an Indo-Mediterranean diet on the omega-6/omega-3 ratio in patients at high risk of coronary artery disease. The Indian Paradox. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 92, p. 74-80, 2003.

PESSATTI, M. L. C. **Aproveitamento dos sub-produtos do pescado**. MAPA/UNIVALI. Itajaí, p.130. 2001

PFEFFER, J.; FREUND, A.; BEL-RHLID, R.; HANSEN, C.-E.; REUSS, M.; SCHMID, R. D.; MAURER, S. C. Highly efficient enzymatic synthesis of 2-monoacylglycerides and structured lipids and their production on a technical scale. **Lipids**, v. 42, p. 947-953, 2007.

PIETZSCH, M.; HOPF, H. The synthesis of optically active [2,2] paracyclophanes by biotransformations. In: DIEDERICHSEN, U.; LINDHORST, T. K., *et al* (Ed.). **Bioorganic chemistry: highlights and new aspects**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. cap. 2.5, p.111-120.

PIGOTT, G. M.; TUCKER, B. W. **Seafood: effects of technology on nutrition**. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 1990.

PILISSÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoíla mediada por lipase**. 2006. 88 Dissertação Mestrado em Química, UFSC, Florianópolis.

PLATT, D.; PELLED, D.; SHULMAN, A. **Oils enriched with diacylglycerols and phytosterol esters and unit dosage forms thereof for use in therapy**. PUBLICATION, U. S. P. A. EUA. US 2006/0052351 A1 2006.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 67-80, 1998.

RAMANI, K.; JOHN KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic

lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1683-1691, 2010.

REDDY, J. R. C.; VIJEETA, T.; KARUNA, M. S. L.; RAO, B. V. S. K.; PRASAD, R. B. N. Lipase-catalyzed preparation of palmitic and stearic acid-rich phosphatidylcholine. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 10, p. 727-730, 2005.

ROBLES MEDINA, A.; ESTEBAN CERDÁN, L.; GIMÉNEZ GIMÉNEZ, A.; CAMACHO PÁEZ, B.; IBÁÑEZ GONZÁLEZ, M. J.; MOLINA GRIMA, E. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 379-391, 1999.

RODRIGUES, R. C.; MACHADO, D. B.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 925-930, 2008.

ROUSSEAU, D.; MARANGONI, A. G. The effects of interesterification on the physical properties of fats. In: MARANGONI, A. G. e NARINE, S. S. (Ed.). **Physical properties of lipids**. New York: Marcel Dekker, 2002. p.479-527.

RUDEK, W. Esterase activity in *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 756-759, 1978.

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

SARTORELLI, D. S.; DAMIÃO, R.; CHAIM, R.; HIRAI, A.; GIMENO, S. G.; FERREIRA, S. R. Dietary [omega]-3 fatty acid and [omega]-3: [omega]-6 fatty acid ratio predict improvement in glucose disturbances in Japanese Brazilians. **Nutrition**, v. 26, n. 2, p. 184-191, 2010.

SCHICK, M. J. HLB of nonionic surfactants: PIT and EIP Methods. In: (Ed.). **Nonionic surfactants. Physical Chemistry**. New York: M. Dekker. 1987. p.493.

SCHMID, U.; BORNSCHEUER, U. T.; SOUMANOU, M. M.; MCNEILL, G. P.; SCHMID, R. D. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 75, n. 11, p. 1527-1531, 1998.

SCHRODER, R.; OBA, K. **Method for continuous preparation of highly pure monoglyceride**. PATENT, U. S. USA: Lion Corporation. US 5153126 1992.

SHAHIDI, F.; SHUKLA, V. K. S. Nontriacylglycerol constituents of fats, oils. **INFORM**, v. 7, n. 11, p. 1227-1232, 1996.

SHIMADA, Y. Enzymatic modification of lipids for functional foods and nutraceuticals. In: AKOH, C. C. (Ed.). **Handbook of Functional Lipids - Functional Foods and Nutraceuticals**. Boca Ratón: CRC Press, 2006. p.437-456.

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

SIQUEIRA, F. M.; OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Nutrientes antioxidantes. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 192-199, 1997.

SLINN, M.; KENDALL, K.; MALLON, C.; ANDREWS, J. Steam reforming of biodiesel by-product to make renewable hydrogen. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5851-5858, 2008.

SOCCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Seafood as functional food. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 443-454, 2003.

SOE, J. B. **Solid phase glycerolysis**. PATENT, U. S. USA: Danisco A/S. US 2008/0233235 A1 2008.

- STANSBY, E. M. **Fish Oils in Nutrition**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990.
- SUGIURA, M.; YAMAGUCHI, H.; YAMADA, N. **Process for producing partial glyceride**. APPLICATION, E. P.: Kao Corporation. EP 1094116 A1 2001.
- SUGIURA, M.; YAMAGUCHI, H.; YAMADA, N. **Preparation process of diglycerides**. PATENT, U. S. USA: Kao Corporation. US 6361980 2002.
- TAGUCHI, H.; NAGAO, T.; WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; MATSUO, N; TOKIMITSU, I.; ITAKURA, H. Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3-diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol. **Lipids**, v. 36, p. 379-382, 2001.
- TAKASE, H. Metabolism of diacylglycerol in humans. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 398-403, 2007.
- TAKENO, N.; SHIMOTOYODOME, A.; MEGURO, S. **Inhibitor of increase in postprandial blood insulin**. PATENT, U. S. USA: Kao Corporation. US 2009/0124691 A1 2009.
- TANAKA, T.; OMAE, K.; MASUI, K. **Manufacture of polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters with improved taste**. Japão: Kao Corporation. JP 20050232227: 9 p. 2005.
- TANGKAM, K.; WEBER, N.; WIEGE, B. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diglycerides from co-products of vegetable oil refining. **Grasas y Aceites**, v. 59, n. 3, p. 245-253, 2008.
- THENGUMPILLIL, N. B. K.; PENUMARTHY, V.; AYYAGARI, A. L. **Process for the preparation of a monoglyceride**. PATENT, U. S. USA. US 6500974 B2 2002.
- TIMM-HEINRICH, M.; NIELSEN, N. S.; XU, X.; JACOBSEN, C. Oxidative stability of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in *sn2*-position – as bulk lipids and in milk drinks. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, p. 249-261, 2004.



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

TURATTI, J. M. Os lipídios na alimentação humana. **Engenharia de Alimentos**, n. 33, p. 23-26, 2000.

TURON, F.; BACHAIN, P.; CARO, Y.; PINA, M.; GRAILLE, J. A direct method for regiospecific analysis of TAG using  $\alpha$ -MAG. **Lipids**, v. 37, n. 8, p. 817-821, 2002.

TURON, F.; RWABWOGO, B.; BARÉA, B.; PINA, M.; GRAILLE, J. Fatty acid composition of oil extracted from Nile perch (*Lates niloticus*) head. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 717-722, 2005.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

USDA. Fatty Acids and Cholesterol. In: (Ed.). **Report of the Dietary Guidelines Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans, 2010**: U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture, 2010. cap. Part D. Section 3.

USP. **Glycerin**. Revision Bulletin. USA: The United States Pharmacopoeial Convention 2009.

VALÉRIO, A. **Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes food grade em sistema livre de solvente**. 2009. 132 Dissertação Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI, Erechim.

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

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; VLADIMIR, J. V. Optimization of mono and diacylglycerols production

- from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 33, n. 7, p. 805-812, 2010.
- VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel production technology**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2004. 110
- VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.
- VESSBY, B. Implications of Long-Chain Fatty Acid Studies. **Inform**, v. 5, n. 2, p. 182-185, 1994.
- VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HOSS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.
- VISENTAINER, J. V.; CARVALHO, P. O.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.
- WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Biotechnological methods for concentrating omega-3 fatty acids from marine oils. In: SHAHIDI, F.; JONES, Y., *et al* (Ed.). **Seafood safety, processing, and biotechnology**. Lancaster: Technomic, 1997a. p.225-233.
- \_\_\_\_\_. Biotechnological methods for concentrating omega-3 fatty acids from marine oils. In: SHAHIDI, F.; JONES, Y., *et al* (Ed.). **Seafood safety, processing, and biotechnology**. Lancaster: Technomic, 1997b. p.225-233.
- \_\_\_\_\_. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 335-342, 1998.
- WANG, Y.; ZHAO, M.; SONG, K.; WANG, L.; HAN, X.; TANG, S.; WANG, Y. Separation of diacylglycerols from enzymatically

hydrolyzed soybean oil by molecular distillation. **Separation and Purification Technology**, v. 75, n. 2, p. 114-120, 2010a.

WANG, Y.; ZHAO, M.; SONG, K.; WANG, L.; TANG, S.; RILEY, W. W. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). **Food Chemistry**, v. 121, p. 1066-1072, 2010b.

WATANABE, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; OGITA, K.; SHIMADA, Y. Production of monoacylglycerol of conjugated linoleic acid by esterification followed by dehydration at low temperature using *Penicillium camembertii* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 249-254, 2004.

WHITEHEAD, P. J. P. FAO species catalogue. In: FISCHER, W. (Ed.). **FAO species catalogue - An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings Part 1 - Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae: FAO Fish. Synop., v.7 - Clupeoid fishes of the world (suborder *Clupeoidei*)**, 1985. cap. 2, p.303.

WILLIS, W.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 639-674, 1998.

WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J. L.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 9, p. 1557-1560, 2009.

WONGSAKUL, S.; H-KITTIKUN, A.; BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerides from 1,3-diacylglycerides. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 81, n. 2, p. 151-155, 2004.

WORM, B.; BARBIER, E. B.; BEAUMONT, N.; DUFFY, J. M.; FOLKE, C.; HALPERN, B. S.; JACKSON, J. B. C.; LOTZE, H. K.; MICHELI, F.; PALUMBI, S. R.; SALA, E.; SELKOE, K. A.;

- STACHOWICZ, J. J.; WATSON, R. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. **Science**, v. 314, n. 3, p. 787-790, 2006.
- XU, X. Biocatalysis for lipid modifications. In: DUNFORD, N. T. e DUNFORD, H. B. (Ed.). **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**. Champaign: AOCS Press, 2004. p.239-263.
- YAMADA, Y.; SHIMIZU, M.; SUGIURA, M.; YAMADA, N. **Process for producing diglycerides**. ORGANIZATION, W. I. P.: Kao Corporation. WO 99/09119 1999.
- YANG, T.; FRUEKILDE, M.-B.; XU, X. Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 9, p. 881-887, 2003.
- 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, 2005a.
- YANG, Y.-C.; 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, 2005b.
- YANG, Y.-C.; VALI, S. R.; JU, Y.-H. A Process for Synthesizing High Purity Monoglyceride. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 34, n. 6, p. 617-623, 2003a.
- YANG, Y.-C.; VALIE, S. R.; JU, Y.-H. A process for synthesizing high purity monoglyceride. **Journal of Chinese Institute of Chemical Engineerings**, v. 34, n. 6, p. 617-623, 2003b.
- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 213-219, 2007.
- YESILOGLU, Y.; KILIC, I. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and oleic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 3, p. 281-284, 2004.

ZAKS, A.; GROSS, A. K. **Enzymatic production of monoglycerides containing omega-3 unsaturated fatty acids**. PATENT, U. S. USA. US 5935828 1999.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

ZHONG, N.; LI, L.; XU, X.; CHEONG, L.-Z.; ZHAO, X.; LI, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 228-232, 2010.



## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### Artigos em periódicos:

Feltes, M.M.C., J.V. Oliveira, H. Treichel, J.M. Block, D. Oliveira, J.L. Ninow (2010). Assessment of process parameters on the production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through the enzymatic glycerolysis of fish oil. *European Food Research and Technology*, v. 231, p. 701-710. Disponível no Apêndice D.

Feltes, M.M.C., P. Villeneuve, B. Baréa, N. Barouh, D. Oliveira, J.V. Oliveira, J.L. Ninow. Enzymatic production of monoacylglycerols and diacylglycerols from fish oil in a solvent-free system. *Submetido*.

Feltes, M.M.C, P. Villeneuve, B. Baréa, D. Oliveira, J.L. Ninow. Evaluation of the modification of food grade surfactants by the lipase Novozym<sup>®</sup> 435 in glycerolysis systems. *A ser submetido*.

Feltes, M.M.C, D. Oliveira, J.M. Block, J.L. Ninow. Enzymatic production, benefits and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols rich in omega-3 fatty acids – Review. *A ser submetido*.

### Publicações em congressos técnico-científicos:

Feltes, M.M.C., D. Oliveira, H. Treichel, J.V. Oliveira, J.M. Block, J.L. Ninow. (2010). Production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through the enzymatic glycerolysis of fish oil in Tween 65 system. 8th Euro Fed Lipid Congress, Munique.

Feltes, M.M.C., D. Oliveira, P. Villeneuve, B. Baréa, J.L. Ninow. (2010). Influence of the thermal activation of Novozym 435 on the production of monoglycerides and diglycerides from fish oil. 8th Euro Fed Lipid Congress, Munique.

Feltes, M.M.C., D. Oliveira, P. Villeneuve, B. Baréa, J.L. Ninow. (2010). Evaluation of the modification of food grade surfactants by the lipase Novozym 435 in glycerolysis systems. V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras, Campinas.

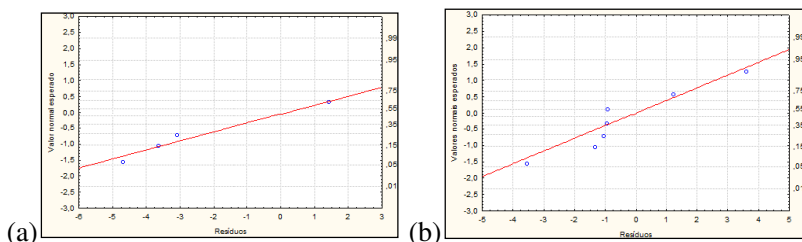
Feltes, M.M.C., D. Oliveira, H. Treichel, J.V. Oliveira, J.M. Block, J.L. Ninow (2010). Production of diglycerides through the enzymatic glycerolysis of fish oil in *tert*-butanol. 4th International Congress on Bioprocess in Food Industries, Curitiba.



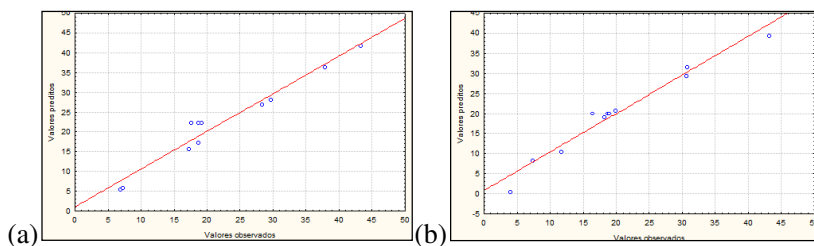


## APÊNDICE A - GRÁFICOS DE PROBABILIDADE NORMAL E DE VALORES PREDITOS E OBSERVADOS

Os gráficos de probabilidade normal (Figura A1) e de valores preditos e observados (Figura A2) para a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe, em meio contendo *tert*-butanol e em meio contendo Tween 65, são apresentados a seguir. Pela análise dos gráficos, verifica-se que os erros de ajuste estão normalmente distribuídos em torno da reta e que as observações são independentes.



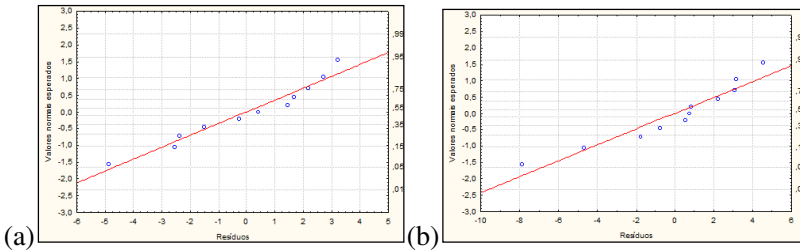
**Figura A1** – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe na presença de (a) *tert*-butanol e (b) Tween 65.



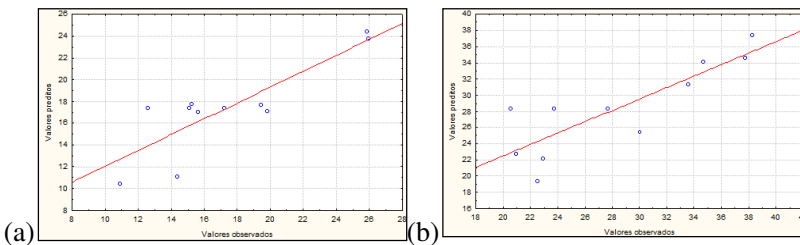
**Figura A2** – Valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo para a produção de diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe na presença de (a) *tert*-butanol e (b) Tween 65.

A seguir são apresentados os gráficos de probabilidade normal (Figura A3) e dos valores preditos e observados (Figura A4) para a produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis em reação de glicerólise enzimática de óleo de peixe, em meio livre de solvente e de surfactante.

Pela análise dos gráficos, verifica-se que os erros de ajuste estão normalmente distribuídos em torno da reta e que as observações, em sua maioria, são independentes.



**Figura A3** – Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis na glicerólise enzimática de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante.



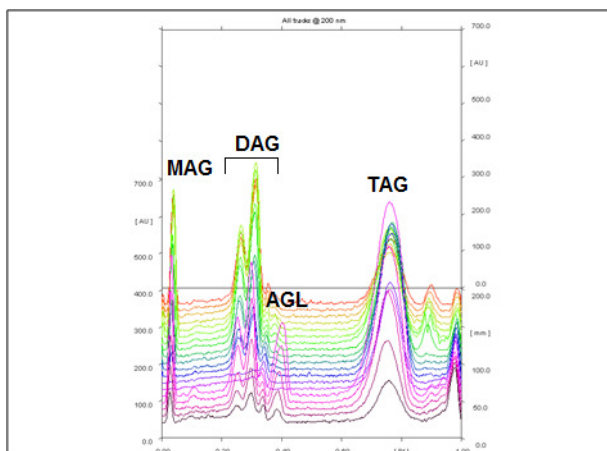
**Figura A4** – Valores experimentais *versus* valores preditos pelo modelo para a produção de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis na glicerólise enzimática de óleo de peixe em meio livre de solvente e de surfactante.

## APÊNDICE B – QUANTIDADES DE PADRÕES APLICADAS NAS PLACAS DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A seguir são apresentadas as quantidades de padrões aplicadas nas placas de cromatografia em camada delgada, com eluição utilizando-se o sistema de solventes hexano/éter etílico/ácido acético (65:35:1, v/v/v) e posterior quantificação dos mono- e diacilgliceróis por densitometria tanto a 200nm quanto a 510nm.

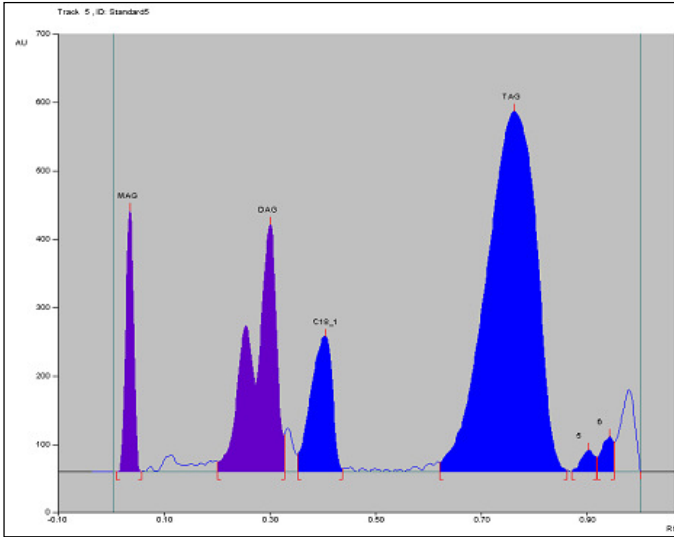
**Tabela B1.** Volume e massa das soluções padrão utilizadas para a construção das curvas de calibração.

Volume aplicado (µL)	Massa aplicada de monoacilgliceróis (solução 0,50475mg/ml)	Massa aplicada de diacilgliceróis (solução 0,5mg/ml)
2,0	1,0095µg	1,00µg
3,5	1,766625µg	1,75µg
6,0	3,0285µg	3,00µg
10,0	5,0475µg	5,00µg
15,0	7,57125µg	7,50µg



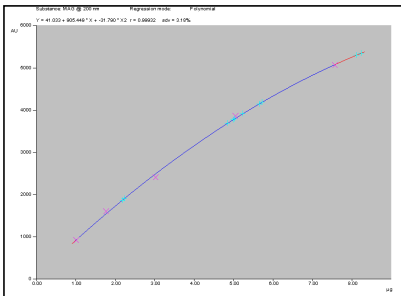
**Figura B1** - Picos referentes às soluções padrão e às amostras do meio reacional, visualizadas a 200nm utilizando-se o TLC Scanner 3.

No gráfico, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorvância.

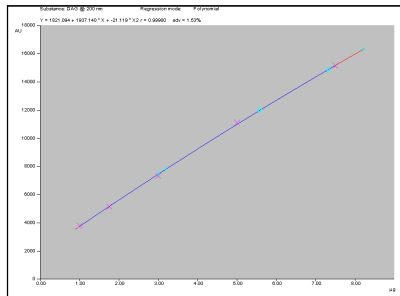


**Figura B2** - Picos referentes às soluções padrão de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácido oléico e triacilgliceróis, visualizados a 200nm utilizando-se o TLC Scanner 3.

No gráfico, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorbância.



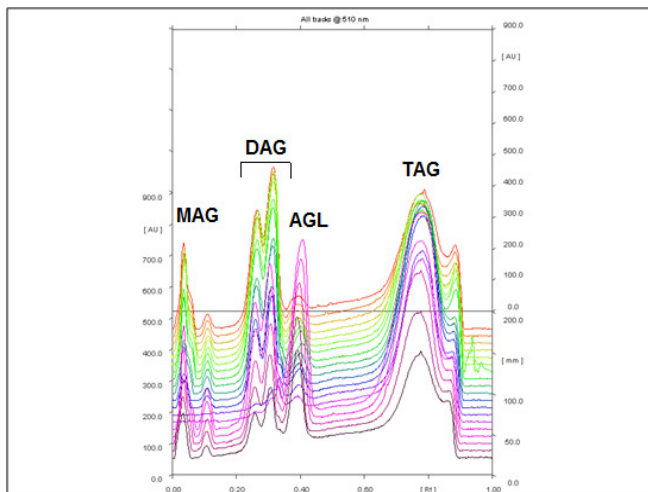
(a)



(b)

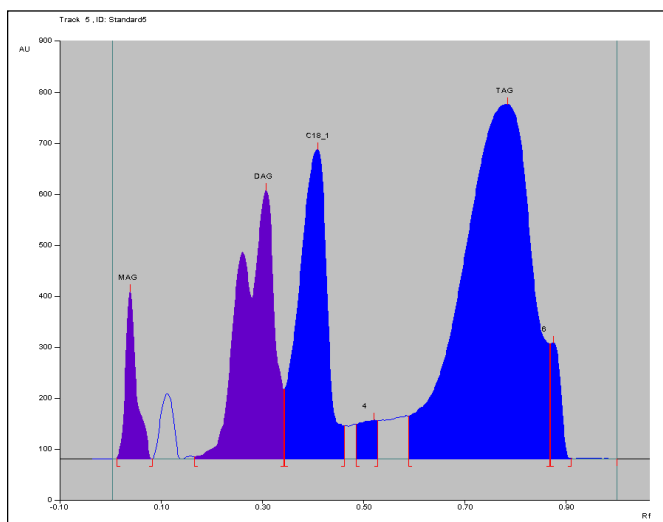
**Figura B3** – Curvas de calibração de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis visualizados a 200nm utilizando-se o TLC Scanner 3, com tratamento dos dados utilizando-se o Software Wincats.

No gráfico, as abscissas correspondem à concentração da solução de padrão e as ordenadas, à unidade de absorbância.



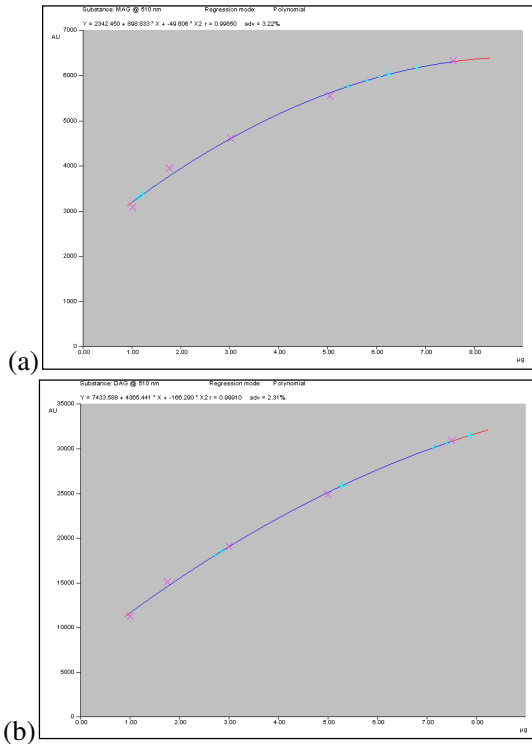
**Figura B4** - Picos referentes às soluções padrão e às amostras do meio reacional, visualizadas a 510nm utilizando-se o TLC Scanner 3.

No gráfico, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorvância.



**Figura B5** - Picos referentes às soluções padrão de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e triacilgliceróis visualizados a 510nm utilizando-se o TLC Scanner 3.

No gráfico, as abscissas correspondem ao fator de retenção ( $R_f$ ) e as ordenadas, à unidade de absorvância.



**Figura B6** - Curvas de calibração de (a) monoacilgliceróis e (b) diacilgliceróis visualizados a 510nm utilizando-se o TLC Scanner 3, com tratamento dos dados utilizando-se o Software Wincats.

No gráfico, as abscissas correspondem à concentração da solução de padrão e as ordenadas, à unidade de absorbância.

### APÊNDICE C - RESULTADOS DA ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA NOVOZYM<sup>®</sup> 435

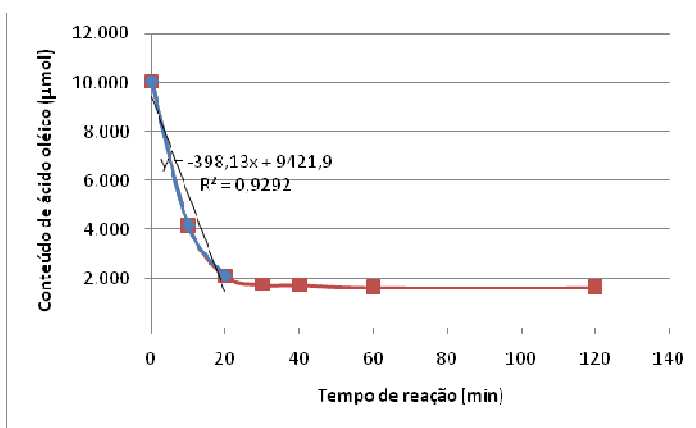
A seguir são apresentados os resultados da análise para a determinação da atividade de esterificação da Novozym<sup>®</sup> 435 utilizando-se ácido oléico como agente acilante.

**Tabela C1.** Quantidade de ácido oléico, determinada ao longo da reação de esterificação do *n*-propanol. Resultados da análise das amostras por CCD-AD/Densitometria com visualização a 200nm.

Tempo (min)	Teor de ácido oléico (g) <sup>1</sup>	Teor de ácido oléico (μmol)
0	2,8406	10.056,24
10	1,1784	4.171,78
20	0,5914	2.093,56
30	0,4966	1.758,11
40	0,4923	1.742,77
60	0,4623	1.636,60
120	0,4605	1.630,09

<sup>1</sup> Média de duas determinações.

Condições da reação: Proporção molar 1:1 (ácido/álcool), 60°C, 5% de lipase imobilizada (m/m, em relação ao total de substratos), agitação magnética.



**Figura C1** – Consumo de ácido oléico ao longo da reação de esterificação do *n*-propanol catalisada pela Novozym<sup>®</sup> 435.

**APÊNDICE D – ARTIGO: ASSESSMENT OF PROCESS PARAMETERS ON THE PRODUCTION OF DIGLYCERIDES RICH IN OMEGA-3 FATTY ACIDS THROUGH THE ENZYMATIC GLYCEROLYSIS OF FISH OIL**

A seguir, é apresentado o artigo publicado no ano de 2010, referente aos resultados dos experimentos discutidos nas seções 4.1, 4.3.1 e 4.3.2.

**Assessment of process parameters on the production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through the enzymatic glycerolysis of fish oil**

Maria Manuela Camino Feltes<sup>1</sup>, J. Vladimir Oliveira<sup>2</sup>, Helen Treichel<sup>2</sup>, Jane Mara Block<sup>3</sup>, Débora de Oliveira<sup>2\*</sup>, Jorge Luiz Ninow<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, SC, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621, 99700-000, Erechim, RS, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, SC, Brasil

\* Corresponding author. Tel: +55 54 35209000 Fax: +55 54 35209090 - e-mail: [odebora@uricer.edu.br](mailto:odebora@uricer.edu.br)



## Abstract

The main objective of this work is to present new experimental information concerning the effect of relevant process parameters related to the production of diglycerides by enzymatic glycerolysis of fish oil. Reaction products can be applied as ingredients in food industry, joining the emulsifying properties of partial glycerides along with the nutritional benefits attributed to the omega-3 fatty acids. From preliminary reactions, conversion was higher for a solvent- and surfactant-free system but the long time to reach appreciable amounts of diglycerides may be a drawback for practical purposes. To overcome this problem, the addition of *tert*-butanol revealed to be relevant, leading to high diglycerides contents in short times. The system containing Tween 65 led to the highest amount of diglycerides. This study described the feasibility of enzymatic synthesis of diglycerides rich in EPA and DHA in short reaction times as well by using a more environmental friendly process.

**Keywords:** glycerolysis, fish oil, lipases, diglycerides

## Introduction

Chemical catalysis has been extensively applied to the large-scale synthesis of mono- and diglycerides, especially due to the low cost of catalysts and its efficiency even at low concentrations. The chemical reaction, however, has some disadvantages as it accelerates unwanted acyl migrations and because of high temperatures usually applied in this process [1]. Besides, it leads to the oil oxidation, which is critical when using fish oil as substrate [2,3].

A good alternative for overcoming these problems is the enzymatic glycerolysis as this process can occur at mild reaction conditions, generally requires less energy and can be conducted in equipment of lower capital cost than many other chemical processes. Also, under these milder conditions, the products are purer and less degraded compared to alternative high-temperature reactions, so they are more easily purified and waste disposal is less of a problem [4,5].

Enzymatic glycerolysis has already been studied in a solvent-free system [6]. However, due to the mild temperatures generally used in biocatalysis, mixing of the water soluble glycerol with triglycerides can be very difficult. Therefore, one of the challenges is to improve the

contact between the reactants. Adding solvents to the glycerolysis reaction has proven very promising for an efficient glycerides production system from unsaturated oils. Furthermore, the solvent helps form more homogenous and less viscous reactant mixtures and generally avoids acyl migration [3,7].

On the other hand, the use of organic solvents may produce various undesirable physicochemical effects on enzyme molecules, with effects differing depending upon the kind of organic solvent [8]. Unwanted side reactions with substrates or products, as well as the cost, energy required for removal from the product mixture and toxicity, are other important aspects to be considered when dealing with solvent systems [1].

Biocatalytic process in the presence of surfactants has also received attention in order to increase the solubility of organic substrates. Surfactants are molecules with amphipatic characteristics, and they are able to form micellar systems [4]. In addition, lipases demonstrate high interfacial activity in micellar system, because the formation of the active site during the reaction occurs at the interface between the substrate and the enzyme [8]. In spite of synthetic surfactants are widely applied in the reaction media [9], the use of a food grade surfactant is of primary importance for the use of mono- and diglycerides in the food industry [10].

Based on these considerations, the main goal of this work is to report new experimental information concerning some relevant process parameters on the production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through the enzymatic glycerolysis of fish oil. Diglycerides are important ingredients in the food industry. Additionally, besides the emulsifying properties of these glycerides one can cite the nutritional benefits attributed to the omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA).

## **Material and Methods**

### **Material**

For the glycerolysis reactions, glycerol (99.5%, molar mass 92.09g/gmol) was obtained from Nuclear. The commercial ultra-refined menhaden fish oil OmegaPure (molar mass 877.65g/gmol) was supplied by OmegaProtein, USA. This fish oil is rich in EPA and DHA, and it

was stabilized with 500ppm mixed tocopherols and 200ppm of tert-butylhydroquinone (TBHQ).

For the solvent system, *tert*-butanol was obtained from Vetec. The food grade surfactants polyoxyethylene sorbitan tristearate (Tween 65, Fluka), polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween 80, Synth), polyoxyethylene sorbitol trioleate (Tween 85, Fluka) and soybean lecithin (Inlab) were tested in the reaction system. These additives are permitted for direct addition to food for human consumption [11].

Lipase Novozym 435 from *Candida antarctica* B, immobilized in a macroporous acrylic resin, with no positional specificity, was supplied by Novozymes (Brazil).

The organic solvent *n*-heptane and the derivatizing reagent MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide) were used for the determination of the di- and triglycerides by gas chromatography (GC). External standards (glycerol, free fatty acids, mono-, di- and triglycerides from palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid), all of chromatographic grade, were purchased from Sigma-Aldrich. All solvents were of analytical grade.

### **Physicochemical characterization of the substrates**

The acid (Official Method Ca 5a-40), saponification (Official Method Cd 3-25) and peroxide values (Official Method Cd 8-53) and the specific gravity (Official Method Cc 10c-95) of the fish oil were determined according to the Official Methodology of the American Oil Chemists' Society [12]. The fatty acid composition of the fish oil was determined by GC according to the AOCS Official Method Ce 1b-89, after the conversion of fatty acids into their fatty acid methyl esters. The average molar mass of the fish oil was calculated from its fatty acid profile. The viscosity of the oil and the glycerol was determined at 25, 40 and 55°C by using a Brookfield viscosimeter (model LVDV III+ connected to a TC-502P water bath). The water content of the fish oil, glycerol, *tert*-butanol and surfactants was determined by the Karl Fisher titration method (DL 50 Graphix, Mettler Toledo).

### **Apparatus**

The enzymatic glycerolysis reactions were carried out in a mechanically stirred (IKA-RW 20 digital stirrer) jacketed flask (40mL) covered with aluminum, connected to a thermostatic water bath.

### **Experimental procedure**

The enzyme was previously activated in an oven at 40°C for 1h before use. Pre-established amounts of the substrates (fish oil and glycerol), enzyme and surfactant or solvent, were weighed on a precision scale balance (Ohaus Analytical Standard with 0.0001g accuracy) and loaded into the reaction vessel. The stirring rate was kept constant for all experimental conditions at 600rpm. Experiments were performed at pre-established conditions. At the end of the reaction, the immobilized lipase was removed and recuperated for determination of its residual esterification activity. Three different systems were evaluated for the elimination of the solvents from the reaction media: a) vacuum oven (60°C; 0.5bar) until constant weight; b) vacuum oven (60°C; 0.5bar) for 1h followed by nitrogen flow until constant weight; and c) vacuum rotary evaporator (65°C; 60mmHg). The recovered products were stored at -20°C under nitrogen for further analysis.

### **Analytical procedure**

#### *Qualitative analysis*

After reactions, samples were applied on 20cm silica gel 60G plates containing a fluorescent reactant (Macherey-Nagel, Germany) for the thin-layer chromatography (TLC) analysis. The solvents hexane/ethyl ether/formic acid (80:20:2, v/v/v) were used as elution system. Bands were visualized under ultraviolet light (254nm) and with iodine vapor (13). For this analysis, oleic acid, monoolein, diolein and dipalmitin were applied as standards on the TLC plates. The OmegaPure fish oil was used as the triglyceride standard.

#### *Quantitative analysis*

##### Di- and triglycerides contents

Di- and triglycerides measurements of products were carried out by GC according to the European standard test method EN 14105, modified according to the literature [7]. All GC measurements were performed in duplicate. The content of reaction product and substrate are expressed here in terms of the whole amount of di- and triglycerides, as weight percent of the total sample.

The gas chromatograph was a Shimadzu 2010, equipped with an automatic injector and on-column, and with a flame-ionization detector (GC-FID). The following instrumentation and conditions were applied: capillary column DB-5 (30m x 0.25mm x 0.1µm, series number US7162944H, J&W Scientific); detector temperature 380°C. The

column temperature was held at 50°C for 1min, programmed to 180°C at 15°C/min, then programmed to 230°C at 7°C/min, 10°C/min until 380°C, and held at this temperature for 8min. The carrier gas was hydrogen (pressure of 80kPa). The injection volume was 1.0µL.

#### Enzymatic activity measurement

The esterification activity of the immobilized lipase before and after reactions was evaluated according to the literature [14]. The enzyme activity was determined in the esterification reaction between lauric acid and *n*-propanol at a molar ratio of 1:1, temperature of 60°C and enzyme concentration of 5% (by weight of reactants). One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme necessary to consume 1µmol of lauric acid per minute at these experimental conditions.

After each experimental run, the biocatalyst was separated from the reactional medium by filtration. Then, the catalyst was washed twice using 10mL of *n*-hexane (99%, Vetec) and the sample was vacuum filtered. Therefore the enzyme was dried in oven at 40°C for 1 hour. The recuperated enzyme from each experimental run was kept in desiccator for 24 hours and after this period of time the residual esterification activity, defined as the ratio of (Final activity/Initial activity) x 100, was determined.

#### **Preliminary assays**

Preliminary assays were performed for the screening of the reaction media for the enzymatic production of diglycerides. For this purpose, experimental conditions were kept fixed for all set of experiments, unless otherwise mentioned. The peroxide value of the media was determined after the reactions.

The choice of reaction conditions was based on previous studies concerning glycerolysis reactions catalyzed by the lipase Novozym 435, in different reaction systems [1,6,10,15,16]. The reaction temperature was chosen following the optimal range for this lipase (40-70°C), according to its supplier (Novozymes). The glycerol:fish oil ratio 2:1 was established based on the stoichiometric relation for diglycerides production, in the reaction of glycerolysis of triglycerides [4].

#### *Reaction system with a food grade surfactant*

Substrates (15g) were added at a molar ratio of 2:1 (glycerol/fish oil). Both surfactant and immobilized lipase were added at a mass ratio of 10wt% of substrates. All surfactants described previously were tested

in this step. Glycerolysis reactions were performed at 55°C for 2h with mechanical stirring (600rpm).

#### *Reaction system with organic solvent*

Substrates were added at a molar ratio of 2:1 (glycerol/fish oil). The *tert*-butanol was added at a ratio of 1:1 (v/v) of the total substrates (glycerol and oil), comprising 35mL of reaction media. The immobilized lipase was added at a mass ratio of 10wt% of substrates. Glycerolysis reactions were performed at 55°C for 2h with mechanical stirring (600rpm).

#### *Surfactant- and free-solvent system*

Substrates were added at a molar ratio of 2:1 (glycerol/fish oil), comprising 15g of oil and glycerol. The immobilized lipase was added at a mass ratio of 10wt% of substrates. Glycerolysis reactions were performed at 55°C for 24h with mechanical stirring (600rpm). This reaction time was established for this system based on previous studies concerning solvent-free glycerolysis reactions.

#### Effect of process variables on enzymatic glycerolysis of fish oil

After the screening of the reaction media, an experimental design was established to enable the evaluation of different parameters for the production of diglycerides. Results were expressed in terms of the mass percent of diglycerides.

For the reaction system with a food grade surfactant and for the reaction system with an organic solvent, a  $2^{4-1}$  fractional factorial design with a center point run in triplicate was carried out to study the effect of the molar ratio of substrates (glycerol and fish oil), enzyme loading, reaction temperature, and surfactant loading or solvent to substrates ratio on the production of diglycerides. In this set of experiments, reactions were performed for 2h with a constant mechanical stirring rate (600rpm). The levels for the investigated factors were chosen based on different publications concerning biocatalyzed glycerolysis reactions [1,6,15,16]. For the system with a food grade surfactant, only the surfactant chosen at the preliminary experiments was applied in the reaction media.

#### **Statistical analysis**

The statistical analysis related to the estimated effects of each variable was performed using the global error and the relative standard

deviation between the experimental and predicted data. All analysis was performed using the software Statistica version 6.0 (Statsoft Inc, USA) using a confidence level of 95%.

## Results and Discussion

### *Characterization of fish oil*

The results obtained for the physicochemical characterization of the OmegaPure fish oil were: acid value (% of oleic acid) 0.1368, acid value (%) 0.2722, peroxide value (meq O<sub>2</sub>/kg oil) 0.4490, saponification value (mg KOH/g oil) 202.37, molar mass (g/gmol) 877.65, specific gravity (g/mL) 0.9304, viscosity (cP) 40.03 at 25°C, 24.51 at 40°C and 15.96 at 55°C. The acid, peroxide and saponification values of the fish oil and also its specific gravity agree with supplier specifications and match international regulations for fish oils for human consumption [11].

The fatty acid composition (%) of OmegaPure fish oil was determined as: myristic 8.65, palmitic 18.48, palmitoleic 11.47, stearic 3.60, oleic 10.15, linoleic 2.10, linolenic 1.71, stearidonic 3.14, arachidonic 1.21, EPA 13.34, DPA 2.47 and DHA 13.34. This oil is rich in omega-3 fatty acids EPA and DHA, with a whole content of 26.68%. Such composition is a characteristic feature of oils from marine origin [17]. It is therefore a suitable substrate for the production of functional emulsifiers, rich in these omega-3 fatty acids.

The plot of the viscosity (data not shown) of glycerin and fish oil against temperature showed that the viscosity of the samples significantly decreases as temperature increases, which is important for their usage as reaction media. It is conceivable that the decrease of the viscosity of the fish oil and the glycerin could reduce mass transfer resistance during glycerolysis reactions, thus allowing a better interaction between both substrates.

The water content of substrates, as determined by Karl Fischer titration, showed as results (wt%): fish oil 0.5402, glycerin 0.5986, *tert*-butanol 0.7331, Tween 65 n.a., Tween 80 2.8821, Tween 85 5.4888, soybean lecithin n.a (not analyzed).

In the reaction media, water is partitioned between the enzyme, its support – when using immobilized enzymes – and substrates. It is well known that the water content of the enzyme has a great influence on its catalytic activity. This content may be changed by the solubility of

the water in the reaction media and also by the attraction of water by the support of the enzyme [18].

Optimal control of moisture content is a key element of lipase biocatalysis, because it affects reaction rate, product yield, product selectivity, and operational stability. A remaining water content usually lower than 1wt% is necessary to assure the catalytic activity of most lipases [19,20]. As presented before, the water content of substrates ensures the catalytic activity of Novozym 435.

### **Preliminary assays**

Results obtained in the preliminary enzymatic glycerolysis tests are presented in Table 1 in terms of di- and triglycerides contents. Results show that the solvent-free and surfactant-free system has led to the highest production of diglycerides (34.90%) in 24 hours of reaction among all investigated reaction systems. The reaction time applied for this system was higher than that for the other systems due to the lowest mass transfer usually verified in reaction systems with no solvents or surfactants.

In the glycerolysis of a fish oil catalyzed by a commercial lipase obtained from *Candida antarctica* fraction B, Torres et al. [6] have produced 20% of monoglycerides and 42% of diglycerides after 24 hours of reaction at 60°C with constant stirring rate (300rpm), in a solvent-free system. The enzyme load was 7% (by weight of reactants), and substrates were added at a molar ratio of 0.89 (triglyceride:glycerol). In the glycerolysis of a fish oil catalyzed by a commercial lipase from *Rhizomucor miehei* (8.5%, by weight of reactants), the same authors have obtained 40% of mono- and diglycerides after 24h incubation at 45°C, by using a molar ratio of 5.5 (triglycerides:glycerol) with constant stirring (300rpm).

Yang et al. [21] reported the contents of 5% of monoglycerides, 50% of diglycerides, 35% of triglycerides and 8% of free fatty acids, in the glycerolysis of sunflower oil. In a later study, the commercial enzyme Lipozyme TL IM, from *Thermomyces lanuginosus*, was added at a ratio of 20% (by weight of substrates). The reaction was performed in a solvent-free system, at 40°C and 300rpm during 17h, and the reaction temperature and the stirring rate have been reduced to 5°C and 200rpm, respectively, and then the reaction has been allowed to proceed for additional 7h. This strategy led to the fractionation of the mono- and diglycerides obtained during glycerolysis reaction, as an alternative to increase the reaction yield in a solvent-free system.



Results in Table 1 show that the reaction system with *tert*-butanol led to a content of 20.27wt% of diglycerides and 4.29% of triglycerides, after 2h of incubation. The highest conversion of triglycerides to diglycerides in a shorter reaction time, when compared to other reaction systems, can be attributed to the presence of the tertiary alcohol in the medium, as a solvent medium is actually an important solution for improving the homogeneity of the system.

*Tert*-butanol is a suitable solvent for glycerolysis reactions catalyzed by Novozym 435, as already observed by Yang et al. [22] for the glycerolysis of fish oil. The addition of *tert*-butanol may increase the miscibility of the substrates (glycerol and oil) with no loss of the esterification activity of Novozym 435. It is worth mentioning that this alcohol is solid at room temperature (melting point 25–26°C), making the process operation difficult. In practical uses, decisions can be dependent on the ease of carrying out the process and the cost of solvents, as well as other subjective considerations. A lot of information has been accumulated in large-scale operations concerning *tert*-butanol evaporation procedures and it is a solvent approved from the safety authorities, as already discussed by Pawongrat et al. [16]. For these reasons, this tertiary alcohol was selected for the present investigation.

Krüger et al. [7] reported that a high content of mono- and diglycerides (about 60wt%) could be achieved at mild temperatures, with relatively low enzyme concentrations (10% by weight of substrates) in short reaction times (240 minutes). These conditions have been applied in the glycerolysis of olive oil in the presence of *tert*-butanol. These authors also observed that the production of mono- and diglycerides could be maximized depending on the glycerol to oil molar ratio. In the glycerolysis of sunflower oil catalyzed by Novozym 435 (18% by weight of oil) with *tert*-pentanol (500%, v/w of oil), the higher monoglycerides content (76%) was achieved within 115min at 50°C, with the substrates at the molar ratio 7:1 (glycerol:oil) [2].

For the reaction system without solvent and containing a food grade surfactant, Tween 65 was the surfactant that afforded the higher diglycerides content (19.41wt%, by weight of substrates) after 2h of reaction. The type of surfactant affected the diglycerides content produced during glycerolysis reactions, which can be explained by the chemical characteristics and the molecular conformation of each studied surfactant [23].

Glycerolysis reaction in a solvent-free system with a food grade surfactant seems to be a promising route for the production of diglycerides. Enzymes (particularly lipases) can act in the micellar

interface, interacting with the hydrophilic and/or hydrophobic parts of the substrates, corroborating the importance of the surfactant presence in the reaction medium.

The effect of the surfactant on the production of mono- and diglycerides was previously verified for the glycerolysis of olive oil catalyzed by Novozym 435 [10]. In this study, the surfactant Tween 65 led to the higher mono- and diglycerides content (36.21%) after two hours of reaction, followed by the surfactant Tween 85 (31.09%). These conversions were obtained at 70°C, with mechanical stirring (600rpm), molar ratio glycerol to olive oil 2:1, 7.5% of immobilized enzyme (by weight of reactants) and 16% of surfactant (by weight of reactants).

For rapid analysis during the process, results were also analyzed by thin layer chromatography, as an alternative method to check the presence of free fatty acids, mono-, di- and triglycerides after glycerolysis reactions. Samples with higher content in diglycerides – as already verified by GC – were applied on TLC plates. Results are shown in Figure 1.

TLC analysis indicates that triglycerides (Retention factor,  $R_f = 0.67$ ) were partially converted to mono- ( $R_f = 0.03$ ) and diglycerides ( $R_f = 0.15$  and  $0.18$ ) after 2h of reaction with *tert*-butanol at the experimental conditions studied. For this system, bands of free fatty acids ( $R_f = 0.58$ ) were also visualized on TLC plates. If this result is further confirmed by GC, it is necessary to study an alternative to minimize the production of this lipid fraction during glycerolysis reactions. The presence of free fatty acids in the final product is associated to flavour problems in the food product where it is used as ingredient [24]. Besides this problem, the production of free fatty acids results in a low process yield with the need of further expensive purification steps [16].

Results obtained by TLC (Figure 1b) show that Novozym 435 was able to produce partial glycerides from triglycerides in all experiments, confirming the results obtained by GC. Bands of triglycerides were observed for all samples, thus indicating incomplete conversion for the reaction time evaluated.

#### *Enzyme activity monitoring*

The enzyme behavior in a reaction medium is of primary importance as the loss of enzyme activity may lead to low yields of the desired products. Enzyme stability and activity may depend on the enzyme species, characteristics of the reaction medium, water content of the enzyme/support/reaction media and process variables, as previously outlined in the literature [14]. Results of the residual esterification

activity of the immobilized lipase Novozym 435 are shown in Table 2. The original esterification activity of this enzyme was 53.5U/g of the immobilized lipase.

Results revealed average changes in the esterification activity of the enzyme Novozym 435 lower than 15% for all tested systems, at the experimental conditions herein investigated. Similar results have been verified for the glycerolysis of olive oil catalyzed by Novozym 435, when using the same food grade surfactants tested in the present study [10].

The effect of different surfactants on the hydrolytic activity of a lipase obtained from a newly *Pseudomonas* sp. strain isolated from soil was verified by Gaoa et al. [25]. In that work, results indicated that this enzyme was inactivated by all surfactants tested, and the effect was pronounced with prolonged incubation time. Incubation of the lipase with Tween and sulfonates completely inactivated the enzyme within 90min [25].

Results obtained here suggest the possibility of reuse of the enzyme Novozym 435 in subsequent batches without a significant loss of its esterification activity, thus lowering the operating costs of the enzymatic process.

#### *Peroxide value monitoring*

Measurement of the peroxide value of the samples before and after reactions is an important step to evaluate lipid oxidation during glycerolysis reactions. Lipid oxidation is a major cause of quality deterioration in many foods. It can alter the flavour and nutritional quality of foods and produce toxic compounds [26]. The peroxide value of the OmegaPure fish oil and of the reaction media were (meq O<sub>2</sub>/kg oil): fish oil OmegaPure 0.45, solvent-free, surfactant-free 7.80, *tert*-butanol 11.04, Tween 65 29.05, Tween 80 7.63, Tween 85 12.95 and soybean lecithin 2.28. It is worth mentioning that these results are related to samples whose solvent has been eliminated by using a vacuum oven.

The peroxide value of the samples was higher than that of the original fish oil (0.4490meq O<sub>2</sub>/kg oil), thus indicating that lipid oxidation took place during glycerolysis reactions or during the storage of the samples. Even though the values herein obtained may be considered high, the majority remained close to 10meq O<sub>2</sub>/kg of oil, as specified by Codex Alimentarius for the oil extracted from herring [11]. In present work, a great increase in the peroxide value of samples was observed for the reaction media containing Tween 65, Tween 85 and

*tert*-butanol. OmegaPure fish oil is rich in polyunsaturated fatty acids EPA and DHA, which are extremely sensitive to oxidation, leading to their destruction, as already verified in the literature for similar systems[27].

A study concerning the oxidative stability of structured lipids and of milk containing structured lipids rich in polyunsaturated fatty acids has indicated that the lipid oxidation process is strictly related to the fatty acid composition of the samples. Moreover, this research indicated that storage conditions are important for product quality [28].

An important study for minimizing lipid oxidation of fish oil during glycerolysis reactions was carried out by Borg et al. [27]. These authors verified that a constant stirred tank reactor with N<sub>2</sub> bubbling through is more efficient than a constant stirred tank reactor under vacuum for limiting oxidation problems.

Results herein obtained show that the type of surfactant also has a great influence on the oxidation of the substrate. It is already known that emulsifiers play a role in the oxidative stability of oil droplets. The effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation was determined for caprylic acid/canola oil structured lipid-based emulsions [20]. In the later study, whey protein isolate had a significant antioxidant effect on the oxidation rates compared to sucrose fatty acid esters. Authors reported that particles size had no effect on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions.

In the present study, the lower peroxide value (2.28meq O<sub>2</sub>/kg oil) was obtained for the reaction medium with soybean lecithin. This result can be explained by the antioxidant activity shown by this phospholipid along with a synergistic effect with tocopherols added to the fish oil, as already observed for vegetable oils [28].

Based on the results obtained, another set of experiments was carried out for the reaction media with Tween 65, Tween 85 and *tert*-butanol, in attempt to check the moment where lipid oxidation was more pronounced during the process. Samples were withdrawn at different steps of the glycerolysis reactions and their peroxide value was immediately determined. For the reaction medium containing Tween 85, different procedures for solvent elimination were performed. Results are shown in Table 3.

It can be observed that there was a little degree of oxidation of the fish oil during glycerolysis reactions. This oxidation can be explained by the temperatures applied during glycerolysis reactions and also by the presence of oxygen in the reactor. A higher degree of oxidation was observed when using the vacuum oven for solvent

elimination, even by short times (1h). For this reason, this procedure was not suitable for the treatment of the samples after reactions. Based on the peroxide value of the samples, the vacuum rotary evaporator was the best process for solvent elimination after glycerolysis reactions. Di- and triglycerides contents shown in Tables 1, 4 and 5 are referred to reactions where solvent was eliminated by using a vacuum rotary evaporator.

### **Effect of process variables on enzymatic glycerolysis of fish oil**

In order to maximize the production of diglycerides by the glycerolysis of fish oil, taking into account the preliminary results presented above, an experimental design for the system with the surfactant Tween 65 and for the system with *tert*-butanol was carried out. Results obtained here are shown in Tables 4 and 5 for each evaluated system. These tables also present the statistical analysis showing the effect of process variables on the diglycerides content.

The statistical analysis of the experimental data permits us to observe that for the system containing the organic solvent, temperature presented a positive significant effect on diglycerides production, while glycerol to oil molar ratio and solvent ratio had a negative effect on product content. For the system containing surfactant, temperature and enzyme load presented a significant positive effect on the reaction conversion, while surfactant load affected negatively the diglycerides content. These observations show that the reaction system may strongly influence the process performance.

Similar results to those obtained here were described for the glycerolysis reaction of olive oil with Novozym 435 (10%, by weight of substrates) as catalyst within 2h of incubation at 55°C, a volume ratio of *tert*-butanol to substrates 1:1, a molar ratio of glycerol to oil 0.5:1.5 and mechanical stirring of 600rpm [7]. In the glycerolysis of fish oil using a *Candida antarctica* fraction B lipase (Chirazyme L-2) as biocatalyst, diglycerides comprised about 45% in a solvent-free system after 10h at 60°C and a mole ratio of triglycerides (based on fatty acid equivalents) to glycerol of 1.5 to 1 [6]. In the present study, a similar content was reached within 2h of incubation.

Some authors outlined that it is possible to favor the production of diglycerides through restriction of glycerol amount in the reaction medium, as the stoichiometric mole ratio of glycerol to oil that favors the production of monoglycerides is 2:1. These researches also describe that an excess of glycerol could shift the reaction to the production of

monoglycerides [7,15]. A possible explanation for this fact can be related to the absence of an agent able to promote the efficient contact between the oil and glycerol, reproducing to a certain extent a situation of “glycerol restriction”, as suggested by Krüger et al. [7].

In the present investigation, similar diglycerides content (18wt% by weight of products) was achieved for both tested systems at the center point experimental condition, along with a higher triglycerides decrease for the system containing *tert*-butanol.

These results are in accordance of other studies that indicate *tert*-butanol is a useful solvent for glycerolysis reactions. In another study concerning the glycerolysis of sunflower oil catalyzed by Novozym 435, it has been described that more than 20-fold of the reaction efficiency from the system containing *tert*-butanol was obtained compared to the solvent-free system. In the batch reaction system with this alcohol, temperature higher than 40°C was favored. The glycerol/oil ratio was best in the study with 4.5 while the solvent weight ratio from 1 to 3 had little effect. In general, 60-70% yield of mono- and diglycerides could be obtained at 2h in the stirred tank reactor [15].

The biocatalyzed glycerolysis system consists of oil, glycerol and an enzyme. The glycerol often binds to the enzyme; hence, the access of oil molecules to the enzyme is difficult and thus the reaction efficiency is usually low in such systems. Obviously, the use of a suitable solvent, like *tert*-butanol, could produce the best practical solution for improving the homogeneity of the system. The organic medium can help improving the system homogeneity and stability as well as reduce the viscosity and mass transfer limitations [15].

In this study, the system containing Tween 65 as surfactant led to a great amount of diglycerides within 2h of incubation with Novozym 435. In general, the diglycerides content herein obtained was higher than that obtained in the glycerolysis of olive oil catalyzed by this lipase [10]. These authors reported the production of 41.4% and 37.4% of mono- and diglycerides for the system containing Tween 65 and Triton X-100 as surfactants, respectively, for the reaction performed at 70°C, 600rpm, molar ratio glycerol:oil 6:1, 16% of surfactant (by weight of reactants) and 9% of immobilized enzyme (by weight of reactants) within 2h of reaction. In the latter research, the mass diglycerides content was lower than 20 and 13% for the systems containing Tween 65 and Triton X-100, respectively.

The use of surfactants in the reaction system could be a simple and cheap solution to overcoming the problem of substrates

immiscibility in glycerolysis reactions, especially for products for use in the food industry [10].

## Conclusions

Although the conversion of triglycerides has been higher in the solvent-free and surfactant-free system, the long time (24h) necessary to achieve appreciable amounts of diglycerides may be a drawback for practical purposes. For overcoming this problem, the use of an organic solvent, as *tert*-butanol, may comprise a viable solution, thus leading to great amounts of diglycerides in short reaction times (2h). The system containing Tween 65 led to the highest amount of diglycerides among all tested surfactants, while the system with soybean lecithin led to the lowest content of diglycerides. Great amounts of diglycerides were achieved for the system with *tert*-butanol as well for the system with Tween 65 at the experimental design was carried out for both systems. This study described the feasibility of the enzymatic synthesis of diglycerides rich in EPA and DHA in very short reaction times, by using a system containing an organic solvent as well as a more environmentally friendly process, with a food grade surfactant. The diglycerides obtained have potential application in food products as a substrate rich in omega-3 essential fatty acids.

## Acknowledgments

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for providing a Doctorate's Fellowship, and OmegaProtein for fish oil donation.

## Literature cited

1. Damstrup ML, Jensen T, Sparsø FV, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X (2005) Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. *J Am Oil Chem Soc* 82 : 559-564
2. Damstrup ML, Jensen T, Sparsø FV, Kiil SZ, Jensen AD, Xu X (2006) Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in *tert*-pentanol: process optimization by response surface methodology. *J Am Oil Chem Soc* 83 : 27-33

3. Pawongrat R, Xu X (2007) Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem* 104 : 251-258
4. Bornscheuer UT (1995) Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol* 17 : 578-586
5. Gunstone FD (1999) Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Review J Sci Food Agric* 79 : 1535-1549
6. Torres C, Lin B, Hill CG (2002) Lipase-catalyzed glycerolysis of an oil rich in eicosapentaenoic acid residues. *Biotechnol Lett* 24 : 667-673
7. Krüger RL, Valério A, Balen M, Ninow JL, Oliveira JV, Oliveira D, Corazza ML (2010) Kinetics of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in organic solvent system. *Europ J Lipid Sci Technol*. DOI: 10.1002/ejlt.200900253
8. Fiametti KG, Rovani S, Oliveira D, Corazza ML, Treichel H, Oliveira JV (2009) Kinetics of solvent-free lipase catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in Aerosol-OT surfactant. *Ind Eng Chem Res* 48 : 708-712
9. Rousseau D, Marangoni AG (2002) The effects of interesterification on the physical properties of fats in: Marangoni AG, Narine SS (Eds.) *Physical properties of lipids*. Marcel Dekker New York pp 479-527
10. Valério A, Rovani S, Treichel H, Oliveira D, Oliveira JV (2010) Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. *Bioproc Biosys Eng* DOI: 10.1007/s00449-009-0402-1
11. FDA (1995 revision 2003). Code of Federal Regulations: 21 CFR 184 Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Retrieved 11 de dezembro de 2005 from <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF184.html>
12. AOCS (2003) *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. AOCS Press Champaign
13. Christie WW (1982) *Lipid analysis*. Pergamon Press Oxford
14. Oliveira D, Feihmann AC, Dariva C, Cunha AG, Bevilacqua JV, Destain J, Oliveira JV, Freire DMG (2006) Assessment of two



- immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *J Supercritic Fluid* 38 : 373-382
15. Yang T, Rebsdorf M, Engelrud U, Xu X (2005) Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. *J Food Lipid* 12 : 299-312
  16. Pawongrat R, Xu X (2008) Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Sci Food Agric* 88 : 256-262
  17. Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (1994) Marine oils: fish and whale oils. *The lipid handbook*. Chapman & Hall London pp. 167
  18. Adlercreutz P (1996) Modes of using enzymes in organic media. *Enzymatic reactions in organic media*. Chapman & Hall London pp. 9-42
  19. Osborn HT, Akoh CC (2002) Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehen Rev Food Sci Food Safe* 1 : 93-103
  20. Osborn HT, Akoh CC (2002) Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-base oil-in-water emulsions. *Food Chem* 84 : 451-456
  21. Yang T, Fruekilde MB, Xu X (2003) Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 80 : 881-887
  22. Yang T, Rebsdorf M, Engelrud U, Xu X (2005) Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system. *J Agric Food Chem* 53 : 1475-1481
  23. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61 : 47-64
  24. Grompone MA (2010) Mono- y di-glicéridos (In press) in: Block JM, Barrera-Arellano D, (Eds) *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. Editora Blücher São Paulo
  25. Gao XG, Cao SG, Zhang KC (2000) Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Enzyme Microb Technol* 27 : 74-82

26. Borg P, Girardin M, Rovel B, Barth D (2000) Comparison between two processes for the enzymatic synthesis of tri-docosahexaenoylglycerol in a solvent-free medium. *Biotechnol Lett* 22 : 777-781
27. Timm-Heinrich MH, Nielsen NS, Xu X, Jacobsen C (2004) Oxidative stability of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in sn2-position – as bulk lipids and in milk drinks. *Inn Food Sci Emerg Technol* 5 : 249-261
28. Judde A, Villeneuve P, Rossignon-Castera A, Le Guillou A (2003) Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oils stability and their synergism with tocopherols. *J Am Oil Chem Soc* 80 : 1209-1215

### Figure captions

Figure 1. Analysis of samples by thin layer chromatography. Samples: standards of oleic acid (a), monoolein (b), diolein (c), dipalmitin (d), media before (e) and after (f) the reaction with *tert*-butanol (A) and analysis of the reaction media before (a) and after the surfactant-free and solvent-free system (b), with *tert*-butanol (c) and with the surfactant Tween 65 (d) (B). Elution system: hexane/ethyl ether/formic acid (80:20:2, vol). Experimental conditions: see Table 1. MAG: monoglycerides. DAG: diglycerides. TAG: triglycerides. FFA: free fatty acids.

**Table 1.** Content of diglycerides and triglycerides (wt%) obtained in the enzymatic glycerolysis of OmegaPure fish oil by using different reaction systems.

Reaction system	DAG (wt%)	TAG (wt%)
Before reaction	2.90 ± 0.49	80.00 ± 2.05
Solvent-free, surfactant-free*	34.90 ± 3.33	15.19 ± 1.84
<i>Tert</i> -butanol**	20.27 ± 0.43	4.29 ± 0.45
Tween 65**	19.41 ± 0.68	43.47 ± 0.16
Tween 80**	15.51 ± 0.44	42.72 ± 0.88
Tween 85**	17.04 ± 0.07	46.31 ± 1.13
Soybean lecithin**	15.19 ± 0.19	37.95 ± 0.39

Mean of two determinations ± standard deviation.

Experimental condition: 600rpm, 55°C, molar ratio glycerol/fish oil 2:1, 10wt% of immobilized enzyme (by weight of substrates). Reaction system with surfactant: 10wt% of surfactant (by weight of substrates). Reaction system with *tert*-butanol: solvent:substrates ratio 1:1 (v/v).

\* 24h. \*\* 2h.

**Table 2.** Effect of reaction media on the residual esterification activity of the lipase Novozym 435.

Reaction system	Residual activity (%)*
Solvent-free, surfactant-free	95.81
<i>Tert</i> -butanol	99.35
Tween 65	91.25
Tween 80	106.77
Tween 85	92.70
Soybean lecithin	85.83

\*Residual activity, % = [final activity/initial activity]\*100. Initial activity: 53.5U/g of immobilized lipase.

Experimental condition: see Table 1.

**Table 3.** Peroxide value of the reaction media in different steps of the treatment of the samples.

Procedure for solvent elimination	Peroxide value* (meq O <sub>2</sub> /kg oil)		
	Tween 65	Tween 85	<i>Tert</i> -butanol
After reaction	2.88	2.40	1.99
After solvent evaporation in a vacuum oven until constant weight (60°C; 0.5bar)	n.a.	8.03	n.a.
After solvent evaporation in a vacuum rotary evaporator (65°C; 60mmHg)	3.62	3.77	1.99
Vacuum oven (60°C; 0.5bar) for 1h followed by nitrogen flow until constant weight	n.a.	6.42	n.a.

Experimental condition: see Table 1.

\* Mean of two determinations. n.a.: not analyzed.

**Table 4.** Content of diglycerides and triglycerides (wt%) obtained in the fractional experimental design (real and coded levels) carried out for the glycerolysis of fish oil with *tert*-butanol as solvent. Experimental condition: 600rpm and 2h of incubation (A) and effects of process variables on the diglycerides content (B).

Run	T (°C)	G:O molar ratio	Enzyme load (wt%)	Solvent ratio (v/v)	DAG (wt%)	TAG (wt%)
1	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	1:1 (-1)	28.40	14.61
2	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	5:1 (+1)	37.92	23.49
3	40 (-1)	3:1 (+1)	5 (-1)	5:1 (+1)	6.80	14.00
4	70 (+1)	3:1 (+1)	5 (-1)	1:1 (-1)	29.71	3.54
5	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	5:1 (+1)	18.65	7.42
6	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	1:1 (-1)	43.30	11.80
7	40 (-1)	3:1 (+1)	15 (+1)	1:1 (-1)	17.14	1.73
8	70 (+1)	3:1 (+1)	15 (+1)	5:1 (+1)	7.22	0.96
9	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	18.57	1.82
10	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	19.13	2.53
11	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	3:1 (0)	17.53	2.25

(A)

	<i>Effect</i>	<i>Standard error</i>	<i>t-value (6)</i>	<i>p-value</i>
Average	22.22	1.58	14.10	<0.001
T (°C)	11.79	3.70	3.19	0.02
G:O molar ratio	-16.85	3.70	-4.56	<0.001
Enzyme load (wt%)	-4.13	3.70	-1.12	0.31
Solvent ratio (v/v)	-11.99	3.70	-3.24	0.02

(B)

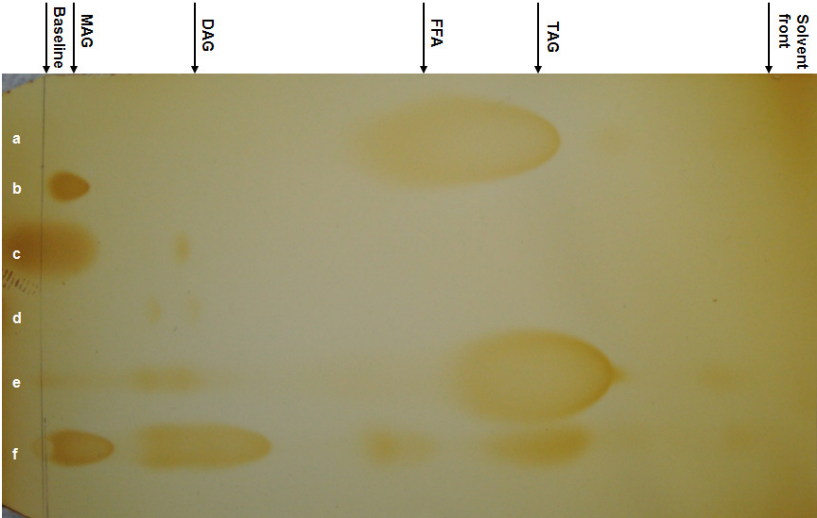
**Table 5.** Content of diglycerides and triglycerides (wt%) obtained in the fractional experimental design (real and coded levels) carried out for the glycerolysis of fish oil with Tween 65 as surfactant. Experimental condition: 600rpm and 2h of incubation (A) and effects of process variables on the diglycerides content (B).

Run	T (°C)	G:O molar ratio	Enzyme load (wt%)	Surfactant load (wt%)	DAG (wt%)	TAG (wt%)
1	40 (-1)	1:1 (-1)	5 (-1)	5 (-1)	7.30	66.88
2	70 (+1)	1:1 (-1)	5 (-1)	15 (+1)	19.88	35.70
3	40 (-1)	3:1 (+1)	5 (-1)	15 (+1)	3.98	54.52
4	70 (+1)	3:1 (+1)	5 (-1)	5 (-1)	30.69	35.17
5	40 (-1)	1:1 (-1)	15 (+1)	15 (+1)	11.69	52.14
6	70 (+1)	1:1 (-1)	15 (+1)	5 (-1)	43.10	27.36
7	40 (-1)	3:1 (+1)	15 (+1)	5 (-1)	18.12	53.81
8	70 (+1)	3:1 (+1)	15 (+1)	15 (+1)	30.73	19.56
9	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	16.39	46.30
10	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	18.60	35.32
11	55 (0)	2:1 (0)	10 (0)	10 (0)	18.90	40.44

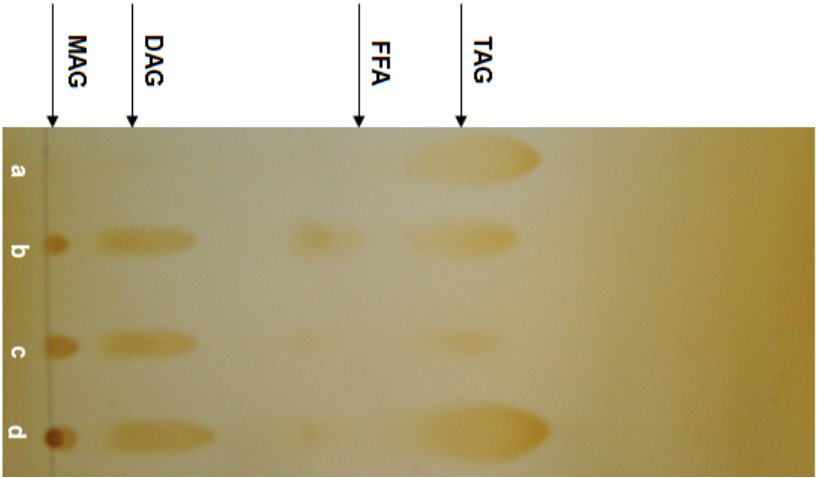
(A)

	<i>Effect</i>	<i>Standard error</i>	<i>t-value (6)</i>	<i>p-value</i>
Average	19.94	0.85	23.39	0.00
T (°C)	20.83	2.00	10.41	0.00
G:O molar ratio	0.39	2.00	0.19	0.85
Enzyme load (wt%)	10.45	2.00	5.22	0.00
Surfactant load (wt%)	-8.23	2.00	-4.12	0.01

(B)



(A)



(B)

Figure 1.