



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HIDRÓLISE DE ÓLEO DE CANOLA CATALISADA POR MISTURA
DE LIPASES IMOBILIZADAS

Jhonnattas Coelho Cavalheiro

Porto Alegre
2013/2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

HIDRÓLISE DE ÓLEO DE CANOLA CATALISADA POR MISTURA DE LIPASES IMOBILISADAS

Jhonnattas Coelho Cavalheiro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como requisito parcial para a
obtenção do título de

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues.

Porto Alegre
2013/2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**HIDRÓLISE DE ÓLEO DE CANOLA CATALISADA POR MISTURA DE
LIPASES IMOBILISADAS**

Jhonnattas Coelho Cavalheiro

Aprovada em: __/__/__/

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues
Departamento de Tecnologia de Alimentos
UFRGS

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz
Departamento de Ciência de Alimentos
UFRGS

Eng. André Soibelman Glock
Lorenzoni
Engenheiro de Alimentos
UFRGS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela autoria da vida e pelo meu sustento diário.

Agradeço ao Professor Dr. Rafael Costa Rodrigues, pela confiança em mim depositada ao emprestar a chaves do laboratório possibilitando horários de trabalhos alternativos; por toda a troca de idéias que tivemos, conhecimentos transmitidos, paciência e flexibilidade nas correções.

A minha co-orientadora Jaqueline Kathiele Popp pelo apoio na tentativa das análises cromatográficas e revisão bibliográfica.

Agradeço ao Professor Dr. Plinho F. Hertz e ao Eng. André Glock por aceitarem prontamente o convite para avaliação deste trabalho.

Agradeço às colegas de trabalho no laboratório: Joana Silva Alves, Natália Paludo e Cíntia Altmann pelo grande esforço e dedicação envolvendo várias repetições de experimentos; mesmo com a pouca convivência que tivemos.

Agradeço enormemente a minha família, em especial a minha mãe, Ana Filomena Coelho, que acreditou em mim mesmo quando eu não acreditava, e aos meus avós, João Domingos Coelho e Maria do Carmo Coelho, por jamais medirem esforços para que eu pudesse estudar amparando-me em sua casa no momento que precisei. Agradeço também a querida Zilda de Paula, por ter me incentivado desde criança a estudar e perseverar, motivando-me através de cartilhas e de seu exemplo de vida.

A IPI de Porto Alegre por ter me acolhido com muito carinho e paciência e por todos os ensinamentos, experiências e momentos de convivências possibilitados.

Ao Alfa & ÔMEGA, em especial aos amigos Marcus Fraga, Jean Rodrigo Teixeira, Douglas Coletto e Stephan de Oliveira, pelo enorme companheirismo, identificação de opiniões e lutas e momentos de convivência dentro e fora da universidade que oportunizaram o meu amadurecimento como pessoa.

Aos demais amigos que de alguma forma, passaram em minha vida neste período e por grandes ideias ou simplesmente momentos de descontração, contribuíram para mais esta conquista.

EPÍGRAFE

“...E conhecereis a verdade, e a verdade vos libertará”.
(João 8.32)

RESUMO

A hidrólise de óleos é um processo pelo qual se pode obter vários compostos de interesse industrial e nutricional, claramente constituindo uma forma de agregar valor a cadeia produtiva bem como aos produtos finais. No intuito de usar condições mais amenas de operação e obter produtos com maior grau de pureza, a hidrólise enzimática vem se consolidando como uma alternativa atraente para a produção de compostos como ômega – 3, ômega – 6 e ácido oleico. Este estudo consistiu na escolha de uma melhor combinação enzimática entre as lipases microbianas RML, TLL e CALB para a hidrólise de óleo de canola em presença de água e posteriormente foram otimizados parâmetros de temperatura, pH, concentração de enzima e razão molar de substrato para as duas melhores combinações através de planejamento experimental proposto determinado por um delineamento de composto central (DCC) em busca das melhores condições para a reação sendo que a atividade hidrolítica foi avaliada após 3 horas de reação. Dentre os resultados destacam-se que em 5 horas a comb.2 (RML+CALB) foi mais rápida chegando a aproximadamente 58% de conversão, porém a comb.1 (RML + TLL) obteve o maior rendimento em 24 horas (75,14%), fatores que indicam uma necessidade de maiores estudos para melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos e alcance de maiores rendimentos de reação a fim de substituir os processos químicos empregados de hidrólise, com rendimento maior que 97%.

Palavras-chave: Hidrólise. Lipases. Óleo de canola. Parâmetros.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CANOLA	3
2.2 COMPOSTOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE CANOLA	4
2.2.1 Ácido linolênico	5
2.2.2 Ácido linoleico	5
2.2.3 Ácido oleico	7
2.3 LIPASES	8
2.4 FATORES ENVOLVIDOS NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA ..	9
2.4.1 Temperatura	9
2.4.2 pH	10
2.4.3 Concentração de enzima	11
2.4.4 Razão molar de substrato	11
2.5 ESPECIFICIDADE	12
2.6 LIPASES MICROBIANAS	13
2.6.1 Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB - (Novozym 435)	13
2.6.2 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL - Lipozyme TL-IM) .	16
2.6.3 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (RML LIPOZYME RM-IM)	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ENZIMAS E OUTROS MATERIAIS	20
3.2 HIDRÓLISE DE ÓLEO DE CANOLA	20
3.3. DETERMINAÇÃO DA MELHOR COMBINAÇÃO ENZIMÁTICA	21
3.4 DELINEAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL – DCC.....	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3.6 REUSO DA ENZIMA	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 SELEÇÃO DA MELHOR COMBINAÇÃO DE LIPASES COMO BIOCATALISADOR.....	24
4.3 EFEITO DOS PARÂMETROS LINEARES NA REAÇÃO.	29
4.4 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE HIDRÓLISE E VALIDAÇÃO DO MODELO PROPOSTO.....	32
4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE HIDRÓLISE	32

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE ENZIMAS INDIVIDUAIS E COMBINAÇÕES ENZIMÁTICAS.....	34
4.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL.....	35
5 CONCLUSÕES	38
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção de óleos e gorduras tem apresentado um notável crescimento. Números envolvendo somente a produção das principais gorduras e óleos vegetais como soja, girassol, milho, colza, gergelim, oliva, palma, coco, linhaça e mamona além das gorduras animais como manteiga, peixe e sebo somaram cerca de 162,7 milhões de toneladas nos anos de 2008 – 2009 sustentando um aumento de aproximadamente 8,5 milhões em relação aos anos de 2006 – 2007 (COELHO *et al.*, 2013). Por serem matérias-primas de origem natural, as indústrias alimentícias as empregam em larga escala sendo o seu maior consumidor, porém, devido ao crescente interesse em se obter produtos com maior valor agregado, estas matérias-primas vêm sendo utilizadas por indústrias farmacêuticas e oleoquímicas onde podemos citar a produção de biodiesel como um grande ícone desta vertente de processos industriais (FARIA, 2010). Uma das primeiras etapas para a obtenção de compostos químicos oriundos de óleos vegetais é a hidrólise, uma reação que leva à formação de uma mistura de ácidos graxos livres, monoglicerídeos, diglicerídeos e glicerol. Convencionalmente, as transformações de óleos e gorduras são baseadas em processos químicos envolvendo o uso de catalisadores a altas pressões e temperaturas o que por sua vez pode ocasionar uma série de reações indesejáveis como oxidação além de formação de subprodutos, exigindo etapas de separação e purificação (BUENO, 2013).

Isto posto, a hidrólise enzimática de óleos vegetais torna-se uma alternativa ao processo químico buscando superar os inconvenientes deste, obtendo produtos com baixo custo energético através da condução da reação em condições mais amenas de temperatura e pressão através do emprego de lipases (BUENO, 2013). Importante ressaltar que o emprego de lipases vai além da hidrólise, podendo catalisar uma ampla gama de reações em meio orgânico como interesterificação, esterificação, transesterificação e ainda aminólise sendo empregadas na produção de fármacos, alimentos emulsificantes, perfumaria, entre outros. (COELHO *et al.*, 2013).

Lipases são enzimas de interface, que pela sua grande versatilidade ocupam uma posição de destaque devido ao seu potencial biotecnológico. O seu bom desempenho em reações tanto de hidrólise quanto de síntese está

relacionado i) a alta seletividade pelo substrato e conseqüentemente uma alta enantiosseletividade; ii) a não requerer presença de co-fatores; iii) a catalisarem reações em baixa temperatura e pressão (BALBICZ, I., 2009; COELHO, A.D. *et.al*, 2013).

Triacilglicerol hidrolases (E.C 3.1.1.3) são tidas como lipases verdadeiras uma vez que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerídeo (TAG) resultando no surgimento de diacilglicerídeos (DAG) e monoacilglicerídeos (MAG), além de ácidos graxos livres e glicerol. Encontram-se largamente distribuídas na natureza em microrganismos, vegetais e animais, sendo os primeiros a principal fonte de fornecimento industrial destas, uma vez que apresentam maior estabilidade e propriedades mais diversificadas que lipases de outras fontes, aliado ao fato de que são em sua maioria extracelulares tendo o processo de isolamento do caldo fermentativo mais simples (BALBICZ, I., 2009).

A canola é uma semente oleaginosa. Possui em sua composição cerca de 38% de óleo, sendo que este óleo apresenta um baixo percentual de gordura saturada (aproximadamente 6,9%) e alto percentual de gorduras insaturadas (93%) onde o ácido oleico é o principal ácido graxo encontrado sendo o seu valor em torno de 70% (PEDERSSETTI, M.M., 2008).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo geral estudar a hidrólise enzimática do óleo de canola catalisada por mistura de lipases microbianas imobilizadas; tendo os seguintes objetivos específicos:

- Testar misturas de lipases que permitam um maior rendimento e produtividade na reação de hidrólise.
- Otimizar a hidrólise do óleo de canola catalisada pela melhor mistura determinada por meio da adequação de parâmetros como pH, temperatura, quantidade de enzima e razão molar de substrato.
- Avaliar a estabilidade operacional da enzima ou da combinação enzimática em reusos múltiplos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANOLA

Ao contrário do que pode ser pensado em um primeiro momento, canola não é um nome original de uma planta e sim um termo genérico internacional com a seguinte definição Canadian Oil Low Acid que significa óleo canadense com baixo teor de ácido (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2011).

De acordo com o Conselho de Canola do Canadá, para um óleo vegetal poder ser rotulado com o termo canola, tem que atender o seguinte padrão internacionalmente estabelecido: “Sementes do gênero *Brassica* (*Brassica napus*, *Brassica rapa* or *Brassica juncea*) cujo óleo deve conter menos que 2 % de ácido erúico no perfil de ácidos graxos livres e os componentes sólidos devem conter menos que 30 micromoles de qualquer dos seguintes compostos, individuais ou misturados: 3-butenil glicosinolato, 4-pentenil glicosinolato, 2-hidroxi-3 butenil glicosinolato, e 2-hidroxi- 4-pentenil glicosinolato por grama de sólido de óleo seco com ar” (CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2011).

Originalmente produzido em maior escala no Canadá, o aproveitamento deste óleo para a alimentação humana só foi possível a partir de meados de 1970, quando pesquisadores conseguiram por melhoramentos genéticos da colza desenvolver uma variedade com teores de glicosilatos e ácido erúico em níveis suficientemente baixos para a ingestão (esta é a origem do nome), sendo que este último composto é responsável por causar lesões no coração além de um acúmulo de gordura na região do mesmo (EMBRAPA, 2013).

As propriedades benéficas deste óleo devem-se basicamente a alta quantidade de ômega-3, um ácido graxo que atua reduzindo o nível de triglicérideo e, por conseguinte, controlando a aterosclerose além de ser o óleo vegetal com menor teor de gorduras saturadas. Destaca-se ainda o teor de gorduras monoinsaturadas, (responsáveis por reduzirem o teor do LDL no organismo, popularmente conhecido como “mau colesterol”), bem como o de vitamina E (antioxidante que reduz radicais livres), como propriedades de aspecto relevante a saúde (EMBRAPA, 2013).

No Brasil, cultiva-se unicamente a espécie *Brassica napus* L. var *oleifera*, sendo canola de primavera, desenvolvida a partir de melhoramento genético convencional da colza; representando uma ótima forma de diversificação de culturas de inverno e geração de renda no sul do Brasil (EMBRAPA, 2013).

A quantidade de proteína existente no farelo da canola representa de 30 a 34% de sua composição, sendo um suplemento interessante para aplicação e rações animais; ao passo que 34 a 40% da variedade do grão produzida no Brasil é constituída de óleo, praticamente o dobro da quantidade percentual de óleo encontrada em grãos de soja, fatores que indicam um grande aproveitamento da cultura (EMBRAPA, 2013).

Através do emprego da extração com solventes ou de prensagem, o óleo bruto tem cerca de 95 a 98% de triglicerídeos, sendo que constituintes como hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, esteróis, tocoferóis, pigmentos, fosfatídeos estão presentes em menor quantidade. É importante ressaltar que a total eliminação do ácido erúcido do óleo de canola não é desejada uma vez que este composto, quando presente em pequenas quantidades, inibe a atividade da lipoxigenase, uma enzima responsável pela oxidação de ácidos graxos insaturados que leva ao escurecimento do óleo e o desprendimento de odores indesejáveis (GRIMALDI, R. 1994).

2.2 COMPOSTOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE CANOLA

Óleos vegetais, de maneira geral, têm sido alvo de constantes pesquisas e melhoramentos a fim de se obter uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados devido principalmente ao efeito que possuem sobre a saúde humana. Especificamente, o óleo de canola tem sido considerado neste campo devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados em relação ao teor de ácidos graxos saturados. Destacam-se entre os compostos obtidos a partir da reação de hidrólise deste óleo o ácido oleico, o ácido linoleico e o ácido linolênico. Ainda ocorre o aparecimento de diacilgliceróis e monoacilgliceróis como o resultado da hidrólise incompleta dos triglicerídeos presentes.

2.2.1 Ácido linolênico

O ácido linolênico ou ainda ômega – 3 como é mais popularmente conhecido consiste em um ácido orgânico com uma cadeia de 18 carbonos apresentando três insaturações sendo que a primeira instauração está entre o terceiro e o quarto carbono da cadeia tomando o lado oposto do grupo carboxílico como ponto de partida (por isso o nome ômega 3).

Sua grande importância em alimentos está no fato de ser considerado um ácido graxo essencial, ou seja, que não pode ser sintetizado pelo organismo o que faz necessária a sua ingestão. Atua como precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) pela ocorrência do aumento da instauração de sua cadeia e aumento desta. Estes últimos compostos estão presentes em peixes de águas frias como salmão, arenque enquanto peixe magros como o bacalhau e o linguado possuem pequenas quantidades destes compostos. É importante considerar que apesar de ser presente em grandes quantidades em peixes, o ácido linolênico se faz presente em óleos vegetais com concentrações acima de 5% somente no óleo de soja (7,15%) e óleo de canola (8,37%), o que justifica o óleo de canola como fonte deste composto (ZAMBIAZI, *et. al.*, 2007).

O consumo de ômega – 3 começou a ser noticiado a partir dos anos 80 com estudos relacionando-o com a prevenção de algumas doenças como infarto do miocárdio e asma brônquica. A influência deste composto sobre o sistema cardíaco através da diminuição do teor de LDL hoje está consolidada, enquanto outro benefícios têm sido recentemente relatados como prevenção em vários tipos de câncer (MACLEAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007), tratamento e prevenção de doenças mentais (HORROBIN *et. al.*, 1991; STILLWELL e WASSALL, 2003; MACNAMARA, 2006) e ainda de doenças intestinais (RAZACK; SEIDNER, 2007; DIAMOND *et al.*, 2008).

2.2.2 Ácido linoleico

O ácido linoleico, também denominado ômega-6, apresenta 2 insaturações numa mesma cadeia de 18 carbonos, sendo considerado do mesmo modo que o ômega 3, um ácido graxo essencial. Está presente de

maneira abundante em óleos vegetais, com destaque para óleo de soja, milho girassol e canola, tendo este último vegetal o menor teor dentre os citados (ZAMBIAZI *et. al.*, 2007).

O ácido linoleico é o principal precursor do ácido araquidônico encontrado também em gema de ovo, carne e vísceras de animais terrestres e carne de peixes tropicais. Destaca-se ainda o ácido γ -linolênico como um metabólito por atuar auxiliando no combate de doenças autoimunes e inflamações (Carvalho *et al.*, 2003).

O metabolismo destes ácidos pode ser resumidamente mostrado de acordo com o esquema abaixo:

Figura 1 - Metabolismo de ácidos graxos essenciais pertencentes a família $\omega 6$ (ômega – 6) e $\omega 3$ (ômega – 3)

Família $\omega 6$		Família $\omega 3$	
Linoléico (18:2)		α -Linolênico (18:3)	
↓	$\Delta 6$ - dessaturase	↓	
γ -Linolênico (18:3)		Octadecatetraenóico (18:4)	
↓	alongase	↓	
Dihomo- γ -linolênico(20:3)		Eicosatetraenóico (20:4)	
↓	$\Delta 5$ - dessaturase	↓	
Araquidônico (20:4)		Eicosapentaenóico (20:5)	
↓	alongase	↓	
Adrenico (22:4)		Docosapentaenóico (22:5)	
↓	$\Delta 4$ - dessaturase	↓	
Docosapentaenóico (22:5)		Docosahexaenóico (22:6)	

Fonte: CARVALHO et al., (2003)

Observa-se com a mudança dos hábitos alimentares nas últimas décadas, que consiste principalmente num maior consumo de alimentos industrializados e prontos para o consumo, uma alta ingestão de gordura através de alimentos como biscoitos recheados e frituras. Ao realizar-se o processo de fritura empregam-se óleos vegetais, sendo estes também consumidos crus como tempero em saladas o que acarreta em uma grande elevação no consumo de ômega - 6 (na população ocidental, principalmente) o que por sua vez, gera um desbalanceamento da relação ômega 6/ômega 3 que também é desfavorável a saúde (SIMOPOULOS, 2008).

Importante ressaltar que estes ácidos graxos não podem ser interconversíveis, competindo pela enzima 6-dessaturase na síntese de ácidos graxos poli-insaturados levando a um acúmulo maior de precursores (eicosanóides) oriundos de ácido linolênico ou ácido linoleico, de acordo com a quantidade ingerida; que por possuírem características diferentes levam a um estado fisiológico mais favorável a ocorrência de problemas como trombose, constrictões vasculares e inflamações (SIMOPOULOS, 2004).

Evidente que de acordo com o sintoma e a sua gravidade a razão entre estes ácidos tende a ser mais baixa (próxima a 1) mas de acordo com a FAO (1994) a proporção de ácido linoleico para ácido α -linolênico deve variar entre 5:1 até 10:1 sendo que indivíduos com uma razão maior que esta devem comer uma maior quantidade de ômega 3 em alimentos como peixes brancos e frutos do mar, vegetais de folhas verdes e legumes.

Importante aqui não esquecer que apesar de ser necessário manter a proporção entre os ácidos graxos polinsaturados, o ômega-6 possui o efeito de reduzir o LDL (lipoproteínas de baixa de densidade) assim como o ômega 3, o que auxilia no controle da aterosclerose e impacta em outros distúrbios do miocárdio.

2.2.3 Ácido oleico

O ácido oleico, também conhecido como Ômega 9, não é considerado um ácido graxo essencial pois pode ser sintetizado pelo nosso organismo, porém faz-se necessária a ingestão de Ômega 3 e Ômega 6 pois estes compostos atuam como precursores em sua síntese pelo nosso metabolismo. Este ácido graxo desempenha um papel importante na síntese de hormônios, sendo associado também a retardamento de doenças cardíacas e melhoria de funções imunológicas. Trata-se de um ácido carboxílico com 18 átomos de carbono em sua cadeia, apresentando uma dupla instauração no nono carbono da extremidade oposta a carboxila, o que lhe confere o nome de ômega – 9 (MENDES *et al.*, 2006).

O ácido oleico pode ser aplicado na fabricação de lipídeos estruturados ou ainda para a síntese de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação

envolvendo estes compostos e moléculas de álcool denominada esterificação sendo utilizado na indústria de cosméticos, lubrificante e farmacêutica, sendo uma reação utilizada também na fabricação da matéria-prima para o biodiesel.

2.3 LIPASES

Enzimas são proteínas com atividade catalítica constituídas por cadeias longas de aminoácidos. Por apresentarem propriedades que as tornam versáteis como: atuação em faixas de temperatura razoavelmente baixas (30 – 70 °C) em pressão atmosférica, alta eficiência catalítica e seletividade pelo substrato – sendo este último aspecto responsável pela minimização ou até mesmo ocorrência de reações paralelas que resultariam em produtos indesejáveis - são altamente visadas como catalisadores, diferenciando-se de catalisadores químicos. Pode-se ainda citar a relativamente fácil regulação da atividade enzimática como uma vantagem através, por exemplo, da mudança do meio de reação como no caso da alteração do pH ou ainda adição de alguma substância (FARIA, 2010).

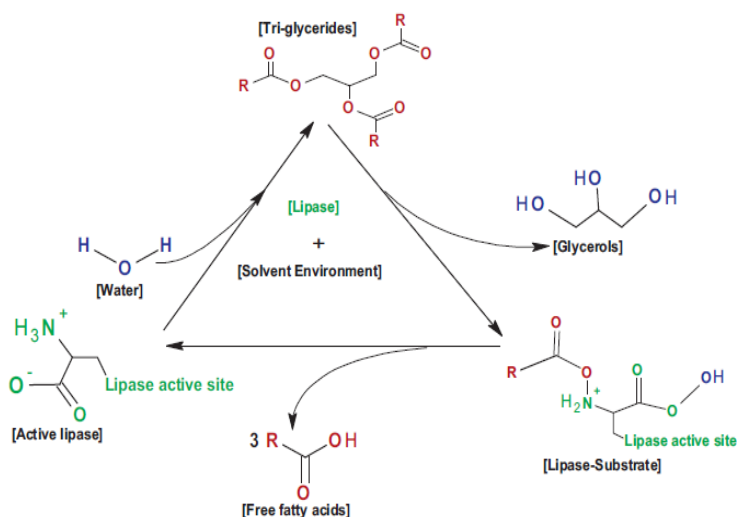
Lipases, (triacilglicerol hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são carboxilesterases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em um meio com uma quantidade de água adequada, resultando em ácidos graxos livres e glicerol, além de monoglicerídeos e diglicerídeos (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2012; BUENO, 2005). Estas enzimas foram dimensionadas para operar na interface de um sistema bifásico onde o substrato característico pode ser uma película monomolecular, micelas ou ainda um aglomerado de moléculas de éster com uma interface no meio aquoso. (AVELAR *et al.*, 2013).

As lipases apresentam alguns elementos de estruturas secundárias (conhecidos por *lid*) que na ausência de interfaces tornam o seu sítio ativo inacessível através do recobrimento deste (conformação fechada). No entanto quando ocorrem interfaces hidrofóbicas como bolhas de gás ou gotas de óleo, fenômeno conhecido pelo nome de ativação interfacial, alterações importantes na conformação da molécula acontecem que permitem a “abertura da estrutura” das lipases. (AVELAR *et al.*, 2013). É importante ressaltar também que estas enzimas possuem a capacidade de catalisar vários outros tipos de

biotransformações como reações inversas de interesterificação e transesterificação em condições com baixo teor de água (SALIHU *et al.*, 2011).

O mecanismo atual da ação da lipase em triglicerídeos do óleo está mostrado na figura 2. Representa a ligação do grupo acila (RCOO^-) no lado positivo da cadeia (NH_3^+) e o íon hidrogênio (H^+) no lado negativo da cadeia (COO^-) do sítio ativo da enzima. Isto, por sua vez, acarreta a liberação de ácidos graxos livres (RCOOH) no sistema de solvente bifásico e a lipase também pode ser recuperada após a extração da fase do solvente (SHARMA,A.;CHAURASIA, P.S.; DALAI, A.K.; 2012).

Figura 2 - Mecanismo de hidrólise de triglicerídeos por lipases



Fonte: SHARMA; CHAURASIA; DALAI, (2013)

2.4 FATORES ENVOLVIDOS NA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

2.4.1 Temperatura

Têm sido extensamente reportado um aumento da taxa de reação com um aumento, até certo ponto, da temperatura, sendo este fato relacionado com a ativação das moléculas de substrato. As moléculas de substrato numa maior temperatura adquirem uma energia de ativação mais rápida para superar o estado transiente da reação de hidrólise parcial. Importante lembrar que a velocidade de uma reação química está relacionada com a sua energia de ativação sendo inversamente proporcional ao valor desta.

Outro aspecto influenciado pela variação da temperatura é no número de colisões entre as moléculas de substrato que aumenta de acordo com o aumento da temperatura, possibilitando um maior número de choques bem sucedidos entre as moléculas de enzima e óleo que por sua vez aumentaria a taxa de hidrólise. Porém este efeito tem um valor limitado de temperatura, no qual o número de colisões entre as moléculas causam alterações na estrutura enzimática. Neste ponto, as alterações estruturais na molécula enzimática superam o efeito do aumento de choques entre enzima e substratos este desbalanceamento ocasiona uma perda de atividade catalítica, denominada desnaturação (FERNANDES, 2002).

Adicionalmente um efeito na redução da viscosidade tanto do óleo de canola quanto da água em altas temperaturas pode reduzir a resistência externa ao processo de transferência de massa melhorando a difusão de moléculas de substrato para o interior das partículas de enzima que, por consequente, aumenta a taxa de reação (WANG et al., 2010).

2.4.2 pH

Na maioria dos casos, enzimas são biocatalisadores que apresentam um ponto ótimo de pH para a sua atuação, tendo sua atividade catalítica fortemente correlacionada com este fator. Valores maiores ou menores podem causar uma espécie de desnaturação parcial da enzima (o que causa uma diminuição da atividade enzimática) sendo que valores extremos podem ocasionar na ruptura da estrutura terciária e consequentemente perda de atividade (DONG; WANG; ZHENG, 2010).

Além de influenciar a estrutura enzimática, sabe-se que a o pH também impacta na atividade enzimática por sua influência sobre o sítio ativo da enzima podendo mudar sua conformação e favorecer uma maior interação entre a enzima e o substrato. Para enzimas do gênero *Candida* em um trabalho de hidrólise com óleo de bacalhau como substrato observou-se que a reação poderia ser conduzida próxima a faixa da neutralidade pelo fato das lípases conterem aminoácidos localizados no sítio ativo com uma máxima interação com o substrato entre pH 6,5 e 8,0 (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2012). O pH por envolver a medida das cargas elétricas do sistema, também afeta a

estabilidade das micelas e da interface óleo/água onde a enzima se adere durante a reação, podendo ocasionar uma maior exposição do substrato e favorecendo sua adesão ao sítio ativo da enzima.

2.4.3 Concentração de enzima

Em um primeiro momento de uma reação enzimática, a taxa inicial desta aumenta proporcionalmente com a adição de enzima, o que indica que o substrato não é o fator limitante; porém isto ocorre até um determinado ponto onde ocorre a saturação do substrato, ou seja, é como se para cada molécula de substrato já houvesse uma molécula de enzima, sendo que neste estágio qualquer acréscimo de enzima seria inócuo em relação ao aumento da taxa de conversão; fato que justifica a sua medida a fim de evitar quantidades adicionadas de enzima desnecessárias (RATHUD; PANDIT, 2009).

2.4.4 Razão molar de substrato

A razão molar de substratos para uma reação de hidrólise se dá pelas quantidades de água e óleo. Uma ativação interfacial é requerida pelas lipases para a sua total atividade catalítica. Interessante notar que a existência desta interface é crítica, pois mesmo em solventes hidrofóbicos há uma pequena quantidade de água nas circunvizinhanças da enzima responsável por fornecer água para a hidratação do sítio ativo, formando a interface essencial para ativação da lipase (FARIA, 2010; BUENO, 2005).

A água, através de várias ligações não - covalentes do tipo hidrogênio-hidrogênio, desempenha uma importante função na enzima ao manter a sua conformação nativa. Assim sendo, uma reação de hidrólise enzimática necessita de dois grandes aspectos: a existência de uma interface lipídeo/água e a adsorção de enzima nesta interface. Quanto maior a interface e maior a quantidade de enzima adsorvida, maior será a velocidade da reação de hidrólise (ROONEY; WHEATEHRLEY, 2001).

De maneira geral, há vários registros na literatura indicando que com um leve aumento na quantidade de água da reação, ocorre um aumento de atividade devido à melhor conformação enzimática e a maior área de interface, porém a partir de uma quantidade máxima, pode ocorrer a inibição da atividade

enzimática pelo alto teor de água (CHU; QUEK; BAHARIN, 2002; YOU; BAHARIN, 2006).

Em altas concentrações de óleo a reação de hidrólise também é desfavorecida uma vez que ocorre o fenômeno de coalescência, agrupamento de várias partículas de óleo a fim de formar grandes gotas de óleo, o que reduz drasticamente a área de interface e, por conseguinte, a taxa de reação. Várias estratégias têm sido empregadas para evitar este fenômeno como agitação, energia ultrassônica, emulsificantes e alguns sais (ROONEY; WHEATEHRLEY, 2001).

2.5 ESPECIFICIDADE

Conforme já anteriormente dito, a alta especificidade da enzima pelo substrato é um dos atrativos para o seu emprego como catalisador em reações químicas. A seletividade atribuída a várias lipases em relação à hidrólise de diferentes ácidos graxos é fortemente devida ao tipo de aminoácido presente na estrutura do sítio ativo da enzima, responsável por formar um complexo com o ácido graxo (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2012).

As lipases têm a sua especificidade basicamente controlada por três aspectos: fatores que afetam a ligação substrato-enzima, estrutura do substrato e propriedades moleculares da enzima. Podem-se destacar várias categorias de especificidade, conforme a seguir:

- 1) Classe de lipídeo (substrato)
- 2) posicional (regiosseletividade)
- 3) ácido graxo
- 4) estereosseletividade

A especificidade para classe de lipídeo ou ainda denominada de especificidade em relação ao substrato abrange o fato da enzima possuir diferentes taxas de hidrólise entre triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis possuindo ácidos graxos de cadeia curta ou longa.

Ao fato da enzima hidrolisar preferencialmente ácidos graxos em posições específicas da cadeia de triglicerídeo, como por exemplo, a seletividade do tipo sn – 1,3 que ocasiona a liberação preferencial de moléculas de ácido graxo nas extremidades do triacilglicerol, denomina-se

especificidade posicional (regiosseletividade) enquanto a especificidade pelo ácido graxo refere-se à propriedade peculiar que as enzimas apresentam de promover a hidrólise de ácidos graxos com graus de insaturação e/ou comprimento da cadeia bem definidos, sendo ambos os aspectos encontrados em reações de hidrólise e esterificação (FERNANDES, 2002).

Por último, a estereosseletividade por parte de várias enzimas envolve o comportamento predominante de hidrólise em uma das ligações éster das posições primárias (sn-1 versus sn-3), sendo explorada em síntese orgânica a preparação de ésteres e alcoóis opticamente ativos (AKESSON *et al.*, 1983).

É importante salientar que uma enzima ou ainda uma combinação de enzimas pode apresentar um conjunto de especificidades envolvendo dois ou mais aspectos dentre os aspectos citados, bem como estas seletividades podem apresentar significativas variações de acordo com a origem; sendo também relacionadas com as condições do ensaio como temperatura, pH e substrato.

2.6 LIPASES MICROBIANAS

As lipases microbianas são as enzimas mais utilizadas em biocatálise. Neste trabalho serão utilizadas as três principais lipases microbianas, que estão descritas a seguir.

2.6.1 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB - (Novozym 435))

A enzima Novozym 435 é uma lipase extracelular produzida pela levedura *Candida antarctica* através de cultivos submersos, sendo utilizadas vários microrganismos mutantes desta espécie a fim de se obter preparados comerciais. O potencial desta enzima como biocatalisador já está extensamente documentado, tanto em hidrólise em meio aquoso como em reações de síntese em meio orgânico (MARÍA *et al.*, 2006).

Na busca constante de um melhor entendimento da síntese e secreção desta substância procurou-se estabelecer através da produção, purificação e caracterização genética como funcionava o maquinário da célula destinado a produzir esta enzima sendo que atualmente está bem estabelecido que no mínimo sete genes estão envolvidos nisto, sendo as respectivas enzimas

produzidas denominadas Lip1, Lip2, Lip3, Lip4, Lip5, Lip6 e Lip7 (MARÍA *et al.*, 2006).

Faz-se relevante conhecer este fato pois as amostras comerciais disponíveis desta enzima estão longe da homogeneidade, sendo um composto de diferentes isoenzimas onde a Lip1 tem sido predominante, seguida pela Lip2 e Lip3. Além de uma diferença nos perfil de isoenzima que compõem a mistura enzimática, esta também apresenta uma variação na quantidade de proteínas, lactose e na concentração de lipase, mesmo para amostras de lotes diferentes de um mesmo fabricante, fatores que contribui imensamente para a dificuldade em se reproduzir os resultados (MARÍA *et al.*, 2006).

Uma série de fatores desempenham um importante papel em termos de quantidade e qualidade do extrato bruto da lipase como tipo de fermentação (batelada/batelada alimentada), taxa de alimentação, tamanho das partículas do substrato e aeração, mas a influência da fonte de carbono parece ser predominante neste contexto de determinação do perfil isoenzimático da mistura (MARÍA *et al.*, 2006).

De maneira geral, uma inibição na produção de lipase quando glicerol, glicose ou até mesmo óleos vegetais foram testados, atribuindo-se este fato a inibição do glicerol que seria utilizado pela levedura apenas num primeiro passo para a síntese de biomassa (LAKIMESHI *et al.*, 1999; DALMAU *et al.*, 2000).

Dentre outros compostos, a importância do ácido oleico como indutor em relação ao perfil enzimático deve ser destacada. Em baixas concentrações de ácido oleico apenas Lip2 e Lip3 foram encontradas no meio extracelular. Quando se aumenta a concentração de ácido oleico, então a Lip1 é secretada. Devido ao fato desta enzima ter sido encontrada em meios quando 1-dodecanol foi testado como fonte de carbono resultando em uma produção de lípases e de biomassa escassa, conclui-se que a Lip1 é produzida quando uma espécie de fermentação em condições extremas é conduzida seja por excesso de substrato ou ainda por adição de algum composto que dificulte o metabolismo (DALMAU *et al.*, 2000; RÍO *et al.*, 1990).

Um dos aspectos que tem se provado ser muito variável entre as isoenzimas Lip1, Lip2 e Lip3 são os aminoácidos presentes na composição do *lid* do sítio ativo das enzimas, o que é vital para a atividade catalítica e

enantiosseletividade ambas sendo afetadas como consequência do fenômeno da ativação interfacial (MARÍA *et al.*, 2006).

Apesar de não se terem bem claras os motivos mais relevantes para a abertura da tampa assim como o seu real impacto no comportamento catalítico, é sabido que a forma com a tampa aberta é mais favorável à estabilidade termodinâmica do que a forma com a tampa fechada, isto porque permite a interação mais eficaz do meio lipofílico com os aminoácidos mais hidrofóbicos (MARÍA *et al.*, 2006).

Tendo em vista o que foi colocado acima, diferentes ligações e interação entre os aminoácidos propiciam diferentes estabilidades para isoenzimas, o que foi verificado pelo número maior de interações existentes na Lip1 em relação a Lip3 o que implicou que quando a estrutura está aberta, a Lip1 se torna mais estável, fixa, enquanto a Lip3 apresenta maior flexibilidade, sendo este fato facilmente correlacionado com a atividade da Lip3 sobre o colesterol. Variações na composição em algumas posições próximo a região da abertura (posições 68–76 e 86–87 para a isoenzima Lip2 por exemplo, tornando a sua tampa mais hidrofóbica que a Lip1 e Lip3), são cruciais para a identificação do substrato e interação durante a performance enzimática (MARÍA *et al.*, 2006).

Além da composição e do arranjo da tampa do sítio ativo da enzima, há um outro aspecto, uma espécie de “túnel” para a acomodação de ácidos graxos no sítio ativo. Este túnel, observado apenas em enzimas oriundas do gênero *Candida* e *Geotrichum candidum* tem um tamanho total de 25 Å demonstrando um formato em “L” muito favorável aos requisitos estéricos do ácido oleico. Este elemento explica a característica da lipase de CRL ser não específica atuando em uma faixa ampla de ácidos graxos com comprimentos de cadeia diferentes, apresentando uma baixa atividade quando ácidos graxos poli-insaturados com uma cadeia longa são convertidos. Diferentes isoenzimas apresentam número diferentes de fenilalanina ao longo deste túnel (Lip1, Lip2, Lip3 – 5,3 e 4, respectivamente) o que acarreta uma variação significativa na área de superfície exposta ao túnel (sendo esta maior para a Lip1) interferindo delicadamente no comprimento da cadeia que sofrerá hidrólise (comportamento de esterase versus comportamento de lipase) (MANCHEÑO *et al.*, 2003).

Por último, outro fator que afeta a especificidade bem como a estabilidade da lipase são as posições com aminoácidos glicosilados, variando em diferentes graus entre as isoenzimas de *C. antarctica* porém sempre mantendo a posição Ans – 351. Devido a sua interação direta com o movimento da tampa, variações neste aminoácido causam uma redução direta na atividade catalítica, comportamento observado majoritariamente na Lip1. (RÚA *et al.*, 1993; BROCCA *et al.*, 2000). Em se tratando da Lip4; mantendo a posição Ans-351 intacta e comprando a molécula com mais ou menos pontos glicosilados observou-se uma maior estabilidade térmica além de algumas mudanças nos aspectos biocatalíticos como a especificidade relacionada a ácidos graxos de cadeia longa (TANG *et al* 2001).

2.6.2 Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL - Lipozyme TL-IM)

Thermomyces lanuginosus ou ainda *Humicola lanuginosa* originaram a lipase TLL, sintetizada por cepas geneticamente modificadas de *Aspergillus oryzae*, enzima encarregada da atividade bioacatlítica existente na mistura comercial fornecida pela Novozymes, podendo ser encontrada na forma solúvel (Lipolase 100 L) ou ainda imobilizada (Lipozyme TL-IM).

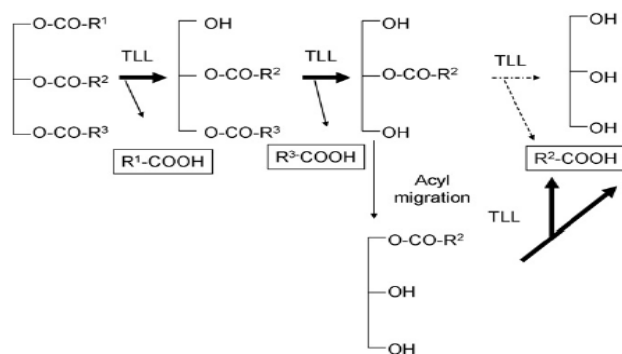
Trata-se de uma enzima com uma conformação ligeiramente redonda, apresentando um sítio ativo recoberto com um *lid* com a tríade de aminoácidos Ser-His-Asp comum nos sítios ativos das lípases. Um dos resíduos de Trp, Trp89 que está localizado nesta tampa possui uma alta relevância na eficiência da reação de hidrólise sendo que uma mutagênese específica deste aminoácido gera um decréscimo da atividade de TLL. Sugere-se que a presença de resíduos catiônicos próximos a “tampa” possam controlar a ativação interfacial (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Alguns outros fatores apresentam influência sobre a atividade catalítica desta enzima como a betaína que por causar um aumento da tensão superficial entre a água e o sítio ativo da enzima tornando-o mais hidrofóbico devido a movimentação induzida de aminoácidos, propicia um aumento da ativação interfacial e conseqüentemente aumentando a atividade enzimática e também gera um aumento na estabilidade térmica da enzima (SODERLUND *et al.*

2002); além de detergentes que por produzirem formas monoméricas da enzima (mais ativa, porém menos estável) e estabilizarem a sua forma aberta acarretariam um aumento da atividade porém em concentrações elevadas poderiam inibi-la chegando até mesmo a inativar a enzima. (JUTILA *et al.*, 2000) (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2006).

A enzima TLL tem sido aplicada na hidrólise de vários óleos e gorduras a fim de se obter ácidos graxos livres. Um de seus atrativos é a ampla faixa de operação na qual ela mantém sua atividade sendo consideravelmente estável em 55 – 60 °C com um máximo de atividade a pH 9 (RODRIGUES *et al.*, 2009). Esta enzima apresenta uma especificidade pelas posições 1 e 3 apesar de que as ligações ésteres podem ser hidrolisadas após a migração para a posição 1 conforme a figura abaixo:

Figura 3 – Mecanismo de hidrólise preferencial de triglicerídeos por lipase



Fonte: FERNANDEZ-LAFUENTE (2010).

Em um estudo envolvendo a hidrólise de uma emulsão de tributirina sugeriu-se que a hidrólise deste substrato ocorre em duas etapas com uma certa sobreposição entre si, onde ocorre primeiro a hidrólise de uma das posições mais externas da cadeia do triglicerídeo (sn 1 ou 3) levando a um aumento da concentração de diglicerídeos, quando então ocorreria a hidrólise do ácido graxo restante da posição externa (JURADO *et al.*, 2008). Foi observada também para a hidrólise de óleo de palma com o emprego desta enzima uma inibição de sua atividade a partir de 3,6% de água, sendo também inibida pela formação de glicerol (CHEW *et al.*, 2008).

2.6.3 Lipase de *Rhizomucor miehei* (RML LIPOZYME RM-IM)

A lipase produzida por *Rhizomucor miehei* (ou ainda *Mucor miehei*) é uma enzima extracelular que possui uma ampla atuação sobre uma variedade de substratos como óleos vegetais, banha de porco e bovina e ainda sobre vários compostos sintéticos como ésteres de sorbitol de ácido graxo. É válido dizer que nas primeiras pesquisas com esta enzima reportou-se uma forte correlação entre a especificidade pelo substrato e o pH observando-se que ácidos graxos de cadeia curta eram melhor hidrolisados em baixos do que em altos valores de pH. (HUGE-JENSEN *et al.*,1987 apud RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010, p.2)

Atualmente, esta enzima está comercialmente disponível em sua forma solúvel (Palatase 20000 L) e também imobilizada (Lipozyme RM-IM) sendo expressas em *Aspergillus oryzae*. A enzima nativa pode apresentar duas formas que diferem entre si somente pela retirada parcial de glicose (deglicolização) da lipase A em relação a lipase (B. HUGE-JENSEN *et al.*,1989 apud RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010, p.2).

Sabe-se que a estabilidade da abertura do *lid* que recobre o sítio ativo das enzimas é um requisito comum entre as lípases para uma alta atividade catalítica. No caso da RML, a influência de Arg neste aspecto a fim de manter a conformação aberta pode ser comprovada pela presença de análogos de cadeia lateral de Arg ou ainda pela modificação química de Arg residuais. O Arg86 assim como o Asp91 estabilizam a conformação aberta da enzima através de múltiplas ligações de hidrogênio com a superfície da proteína seguido do Asp91. Ainda pode-se afirmar que alterações nos resíduos com carga na região da tampa e da articulação permitem uma alteração na tolerância de baixos teores de água desta enzima (DELLAMORA-ORTIZ *et al.*, 1997).

Dentre outros aspectos que afetam a estabilidade desta enzima pode-se citar a pressão que, sobre condições que não chegam a desnaturar a enzima ocorre uma certa proteção da enzima pela pressão elevada, ao passo que em pressões de desnaturação esta estabilidade pode ser prolongada pelo uso de polióis o que pode ser útil em aplicação de enzimas em fluídos supercríticos (NOEL e COMBES, 2003).

Resta ainda abordar o efeito dos detergentes sobre a atividade desta enzima. De maneira geral, para diferentes substratos a enzima teve sua atividade hidrolítica elevada com o uso de detergentes aniônicos e redução da atividade com detergentes catiônicos, sendo observado este comportamento em hidrólise de óleo de palma (SKAGERLIND *et al.*, 1995).

No que abrange a hidrólise de óleos, esta enzima apresenta uma especificidade pelas posições sn 1-3, tendo como um primeiro produto da reação um diglicerídeo. Foi possível observar que dentre estas duas posições esta lipase possui preferência em hidrolisar a ligação éster da posição 1 e após a ligação éster na posição 3. Importante ressaltar que na posição 2 do triglicerídeo a enzima não reconhece a ligação éster, sendo necessária a migração do grupo acila para as posições 1 ou 3 para ocorrer a hidrólise total do triglicerídeo (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Este fato torna-se importante porque a composição de uma mistura de ácidos graxos livres em um hidrolisado depende da localização deles na molécula de triglicerídeo. Em estudo conduzido com óleo de groselha, por exemplo, rico em ácido linolênico, a quantidade de α – linolênico assim como a de ácido palmítico e de ácido esteárico na composição dos ácidos graxos livres é muito maior que a quantidade de γ -linolênico, sendo este último mais encontrado na forma de diglicerídeos e triglicerídeos, o que pode ser resultado da predominância deste último composto na posição 2 do triglicerídeo (SOVOVÁ *et al.*, 2008).

Devido a sua afinidade pelo substrato esta lipase também pode ser utilizada para formar glicerídeos com composição diferenciada. Por liberar ácido graxo poliinsaturado vagarosamente, resulta no acúmulo deste composto na fase do glicerídeo; hidrolisando altos níveis de ácido erúico e outros ácidos monoinsaturados de cadeia longa. A hidrólise parcial provocada pela RM-IM sem solvente foi empregada para a obtenção de óleo de palma enriquecido em diacilglicerol (AWADALLAK *et al.*, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ENZIMAS E OUTROS MATERIAIS

Lipases de *T. lanuginosas* (TLL, Lipozyme TL-IM), *R. miehei* (RML, Lipozyme RM-IM) e *C. antarctica* (CALB, Novozym 435) foram gentilmente cedidas pela Novozyme (Novozyme, Espanha). As enzimas se encontravam na sua forma imobilizada: TLL estava imobilizada em um suporte de silicato, RML imobilizada em uma resina de carga aniônica e a CALB em uma resina com macroporos. O óleo de canola foi adquirido no mercado local, da marca Lilás (Celena alimentos S/A) com o seguinte perfil lipídico (em % de massa): 7% de gorduras saturadas, 11% de ácido linolênico, 21% de ácido linoleico e 61% de gorduras monoinsaturadas (CELENA, 2002). Todos os demais reagentes possuem grau analítico.

3.2 HIDRÓLISE DE ÓLEO DE CANOLA

As diferentes quantidades de água destilada foram adicionadas juntamente com 5 mmol de óleo de canola em frascos de 50 ml de acordo com a variação da razão molar óleo/água, variando a concentração de enzima (e posteriormente das melhores combinações enzimáticas) conforme estabelecido no planejamento experimental, sendo agitados em banho-maria a uma velocidade constante.

O avanço da reação foi monitorado através da coleta de 0,3 g de amostra, diluindo-a em 20 mL de etanol e titulando-a posteriormente com NaOH 0,01 M o que fornece o valor de ácidos graxos livres resultantes da reação. O valor da conversão é calculado a partir da seguinte equação (1): (ROONEY; WHEATERLEY, 2001; AVERLAR *et al.*, 2013)

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot 10^{-3} \cdot [\text{NaOH}] \cdot \text{MM}}{\text{Wt.f}} \quad (1)$$

Onde V_{NaOH} é o volume de hidróxido de sódio consumido na titulação, $[\text{NaOH}]$ é a concentração da solução de hidróxido de sódio empregada na

titulação ($0,04 \text{ g.L}^{-1}$), MM é massa molar média dos ácidos graxos livres presente em óleo de canola ($0,282 \text{ g.mol}^{-1}$), Wt é o peso da amostra (0,3 g) e f é o fator de correção da solução de NaOH.

Para o acompanhamento das cinéticas individuais bem como o levantamento da melhor combinação de lipases empregou-se fenolftaleína como indicador de pH, ao passo que para a determinação da melhor condição para a “comb1” e “comb2”, bem como para as suas respectivas reações cinéticas individuais; empregou-se o medidor de pH a fim de se obter maior acuracidade nos resultados.

Durante o DCC e as cinéticas individuais para as melhores combinações enzimáticas, variou-se o pH utilizando para este fim diferentes soluções tampões. Para o experimento em pH 5 utilizou-se uma solução citrato de sódio e para o pH 9 empregou-se uma solução de carbonato de sódio. Para pH 6, pH 7 e pH 8 utilizaram-se soluções de fosfato de sódio. Todas as soluções tampões citadas estava na concentração 5 mmol.L^{-1} sendo que para corrigir o seu pH para o valor desejado utilizou-se soluções de hidróxido de sódio $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ e ácido sulfúrico 4 mmol.L^{-1} .

3.3. DETERMINAÇÃO DA MELHOR COMBINAÇÃO ENZIMÁTICA

Na busca de se encontrar uma melhor combinação entre lipases para a reação de hidrólise, propôs-se um planejamento triangular para três fatores de mistura de igual peso para as variáveis com pontos interiores que resultou em 10 experimentos para cada temperatura realizada. Os resultados estão exibidos na tabela 1. Nestes experimentos, as condições utilizadas em um tempo de reação de 3 horas foram: razão molar água:óleo 3:1; temperatura 30°C , 40°C e 50°C , 10% quantidade de enzima (em relação a massa de óleo) sendo que esta quantidade pode corresponder a massa de cada enzima especificamente ou ainda a massa final da mistura de enzima adicionada, de acordo com especificado na tabela.

3.4 DELINEAMENTO DE COMPOSTO CENTRAL – DCC.

Na sequência da determinação das melhores misturas, foi conduzido um delineamento de composto central para 4 variáveis para cada combinação

enzimática a fim de se visualizar condições ótimas da reação de hidrólise. A tabela 2 mostra as variáveis e seus valores codificados bem como seus valores reais. O DCC foi composto de 16 pontos fatoriais, oito pontos axiais e três replicas no ponto central. Os valores para cálculo do percentual de reação foram aferidos em todos os experimentos depois de 3 horas de reação. O polinômio abaixo foi proposto para avaliar o impacto das variáveis na reação:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_{i2} \quad (2)$$

Onde Y é variável de resposta (no caso % de conversão de hidrólise), β_0 é a constante β_i é o coeficiente linear, β_{ii} é o coeficiente para o coeficiente quadrático e β_{ij} o coeficiente para a interação entre as variáveis, sendo X_i X_j os valores codificados para as variáveis x_i e x_j .

Tabela 2 – Níveis das variáveis do processo empregados no DCC

Variáveis	Nome	Níveis codificados				
		-2	-1	0	1	2
X1	Temperatura (°C)	40	47,5	55	62,5	70
X2	pH	5	6	7	8	9
X3	Enzima (%em massa)	0,25	0,5	0,75	1,00	1,25
X4	Razão molar substrato (água:óleo)	3:1	7,5:1	12:1	16,5:1	21:1

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados e a elaboração dos planejamentos experimentais foram conduzidas através da utilização do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). A significância dos coeficientes de regressão e as probabilidades associadas foram determinadas através do Teste – T de Student, a significância da equação proposta foi obtida através do Teste de Fischer e a variância fornecida pelo modelo foi apurada pelos coeficientes de regressão múltipla, R^2 .

3.6 REUSO DA ENZIMA

Ao final de cada reação de hidrólise para as duas melhores combinações, procedeu-se a separação da enzima do meio reacional através de filtração a vácuo com funil de vidro sinterizado. A enzima foi lavada com n-hexano e o solvente foi eliminado pela incubação durante 24 horas a 25 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DA MELHOR COMBINAÇÃO DE LIPASES COMO BIOCATALISADOR

No intuito de se avaliar previamente o desempenho de cada enzima a fim de se visualizar um possível melhor biocatalisador, conduziu-se a realização da hidrólise de óleo de canola com as três enzimas individuais a 30 °C, 40 °C e 50 °C, por se considerar previamente este fator como o mais impactante para a conversão enzimática de óleo, empregando-se esta faixa de temperatura por considerar o emprego de temperaturas moderadas em processos biotecnológicos. Os resultados da hidrólise do óleo de canola pelas 3 enzimas nas 3 temperaturas estão apresentados nas figuras 4, 5 e 6.

Figura 4 – Hidrólise de óleo catalisada pelas enzimas individualmente, RML (■), TLL (◆) e CALB (▲) a 30° C.

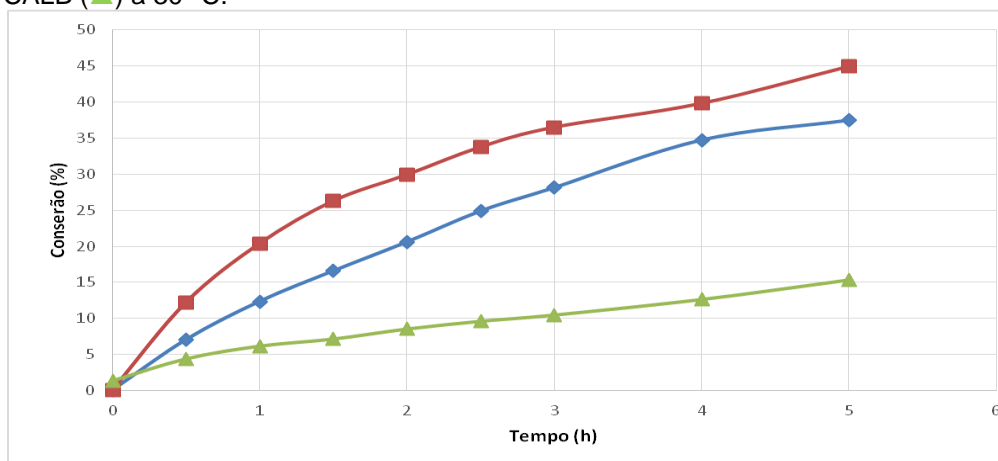


Figura 5 – Hidrólise de óleo catalisada pelas enzimas individualmente RML (■), TLL (◆) e CALB (▲) a 40° C

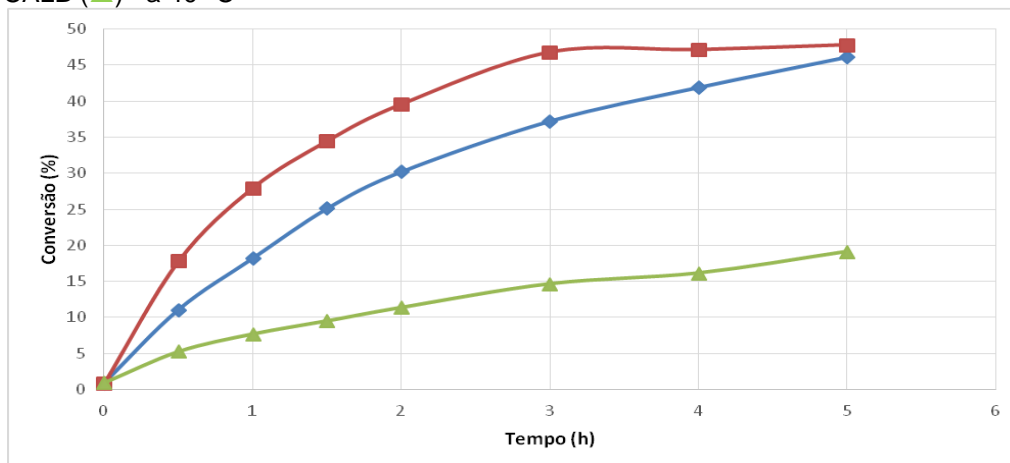
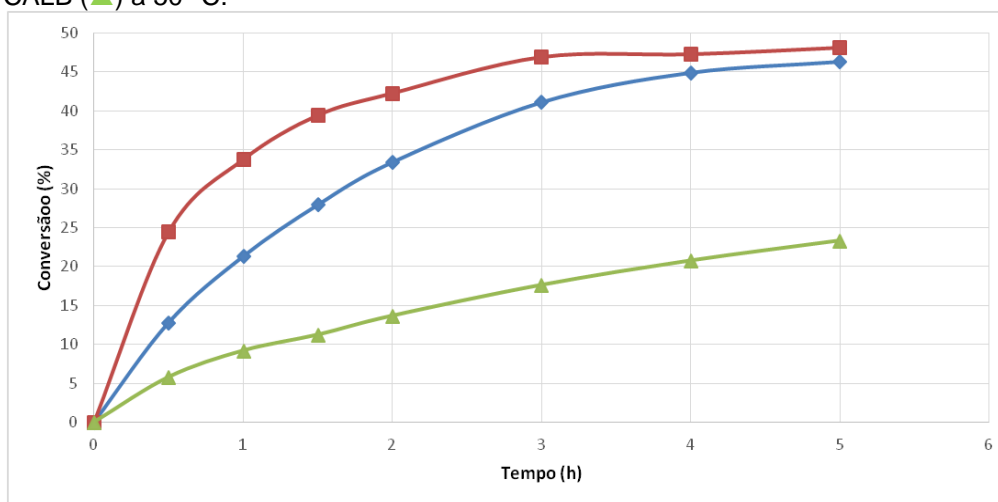


Figura 6 – Hidrólise de óleo catalisada pelas enzimas individualmente, RML (■), TLL (◆) e CALB (▲) a 50° C.



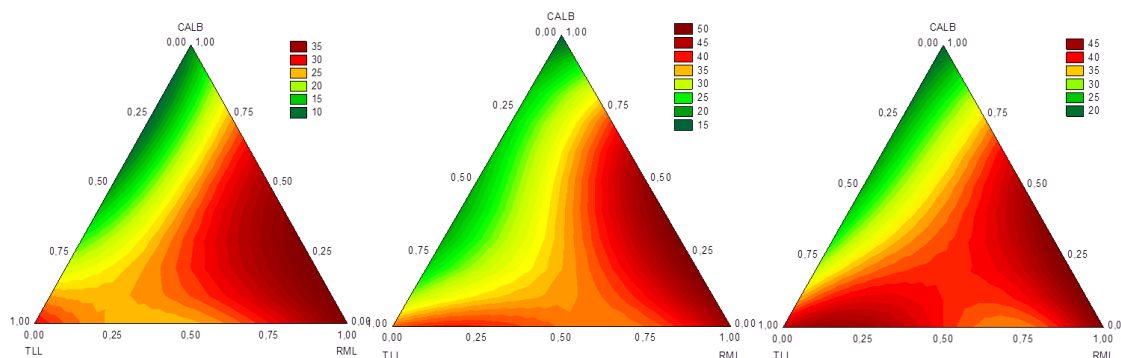
Observou-se a partir dos gráficos que a enzima RML obteve sempre um melhor rendimento do que as demais sendo que a TLL obteve valores similares aos alcançados por esta enzima somente em cinco horas de reação, o que pode ser resultado de maior afinidade entre esta enzima e o substrato ou ainda ao fato das temperaturas empregadas serem mais favoráveis a ação desta enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Faz-se relevante notar que a enzima CALB, apesar de apresentar uma baixa atividade demonstrada nestes experimentos, teve sua taxa de conversão aumentada ao longo da variação de temperatura de 30 – 50 °C, o que de certa forma está de acordo com a literatura que indica reações de hidrólise empregando esta enzima até 60 °C (HAIGH *et al*, 2013). O fato de que a CALB é a única enzima que apresenta uma tendência de aumento da atividade com o tempo de reação para as três temperaturas citadas motivou o seu emprego na busca de uma melhor combinação enzimática para a hidrólise.

Para esta finalidade empregou-se um planejamento triangular com as três enzimas testadas na mesma faixa de temperatura durante 3 horas de reação, comparando um possível efeito de se empregar uma combinação enzimática ao invés da enzima individual. Os resultados de conversão obtidos bem como as diferentes combinações utilizadas nas três temperaturas estão na tabela 1. Na figura 7 estão as superfícies triangulares para as 3 temperaturas estudadas.

Tabela 1 – Planejamento triangular de misturas.

Experimento	TL-IM	RM-IM	CALB	Conversão (%)	Conversão (%)	Conversão (%)
				30°C	40°C	50° C
1	1,000	0,000	0,000	29,27	37,26	41,90
2	0,000	1,000	0,000	37,56	46,77	47,66
3	0,000	0,000	1,000	10,45	14,67	18,32
4	0,500	0,500	0,000	24,55	36,87	38,54
5	0,500	0,000	0,500	11,70	20,90	22,95
6	0,000	0,500	0,500	33,54	47,78	43,57
7	0,333	0,333	0,333	27,13	34,92	35,27
8	0,667	0,167	0,167	24,11	30,02	39,07
9	0,167	0,667	0,167	33,84	41,75	42,52
10	0,167	0,167	0,667	20,12	31,46	32,32

Figura 7 – Superfícies triangulares para melhor combinação enzimática. Tempo de reação: 3 horas. Temperaturas 30 °C, 40 °C e 50 °C, respectivamente.



A partir dos resultados observados na temperatura de 40 °C (figura 7) notou-se que uma combinação envolvendo 15 % de CALB e 85 % de RML (comb.2) em relação à composição da mistura enzimática era ideal, pois apresentou uma taxa de conversão superior a 50 % sendo que este resultado não foi atingido por nenhuma enzima individualmente. Este resultado relaciona-se sobre tudo ao fato da CALB ser uma enzima que não apresenta especificidade pela posição do ácido graxo no triglicerídeo o que faz com que enquanto a RML hidrolise preferencialmente as posições 1,3 a CALB hidrolise também a posição 2, o que permite um melhor aproveitamento do substrato para hidrólise, indicando ser potencialmente a melhor mistura.

Analisando o planejamento realizado a 50 °C, além da combinação de 15% CALB e 85% de RML ter ainda demonstrado um bom resultado sendo este superior a 45%; foi possível visualizar também a combinação entre 20% de TLL e 80% de RML com igual potencial num primeiro momento, por ter alcançado o mesmo patamar de superior a 45% de conversão em três horas.

Sua principal justificativa para emprego na reação seria minimizar o custo resultante da aquisição destes reagentes uma vez que se a TLL pudesse substituir a CALB o processo seria consideravelmente menos dispendioso.

Tendo em vista o acima exposto, para a continuidade do presente estudo envolvendo a otimização da hidrólise de óleo de canola para uma determinada combinação enzimática; foram eleitas duas misturas como sendo de interesse, a saber: 80% de RML e 20% de TLL como sendo a primeira mistura; 85% de RML e 15% de CALB como sendo a segunda mistura, doravante denominadas “comb1” e “comb2”, respectivamente.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE.

Um Delineamento de Composto Central (DCC) foi empregado a fim de se obter uma avaliação das variáveis independentes: temperatura, pH, quantidade de enzima (para as duas melhores combinações: comb1 e comb2) e razão molar água/óleo conforme a Tabela 3. As variáveis codificadas bem como o seu significado estão contidos na Tabela 2.

Tabela 3 – Planejamento experimental e resultados do DCC

Experimento	X1	X2	X3	X4	Conversão (%) Comb.1	Conversão (%) Comb.2
1	-1	-1	-1	-1	10,904	24,966
2	-1	-1	-1	1	18,029	21,705
3	-1	-1	1	-1	19,242	28,209
4	-1	-1	1	1	20,069	22,062
5	-1	1	-1	-1	22,231	24,835
6	-1	1	-1	1	20,379	27,927
7	-1	1	1	-1	18,762	29,695
8	-1	1	1	1	15,256	30,832
9	1	-1	-1	-1	15,247	29,911
10	1	-1	-1	1	14,871	25,305
11	1	-1	1	-1	18,715	28,576
12	1	-1	1	1	17,757	31,490
13	1	1	-1	-1	16,929	32,449
14	1	1	-1	1	16,882	34,047
15	1	1	1	-1	18,302	32,543
16	1	1	1	1	12,399	34,084
17	-2	0	0	0	27,589	28,933
18	2	0	0	0	19,674	30,193
19	0	-2	0	0	15,811	21,423
20	0	2	0	0	19,308	28,454
21	0	0	-2	0	16,328	22,043
22	0	0	2	0	17,202	34,714
23	0	0	0	-2	19,148	27,495
24	0	0	0	2	19,383	31,415
25	0	0	0	0	16,807	29,507
26	0	0	0	0	16,864	31,123
27	0	0	0	0	17,005	32,985

Para a comb.1 (RML+TLL) o máximo valor obtido foi de 27,59 % no experimento 17 (40 °C, pH 7, 15 % de enzima, 12:1 água:óleo) enquanto para a comb. 2 (RML+CALB) o valor máximo de hidrólise foi de 34,71 % no experimento 22 (55 °C, pH 7, 25 % de enzima, 12:1 água:óleo). Os dados experimentais foram ajustados ao modelo proposto na equação (2) e os modelos polinomiais de segunda ordem resultantes são exibidos nas equações (3) e (4) para as respectivas comb.1 e comb.2.

$$Y = 17,97 - 1,83X_1 + 1,40X_1^2 + 1,11X_2 - 0,21X_2^2 + 1,46X_3 + 0,53X_3^2 + 0,34X_4 + 0,24X_4^2 - 1,48X_1X_2 - 0,69X_1X_3 - 1,44X_1X_4 - 1,10X_2X_3 - 0,41X_2X_4 - 0,17X_3X_4 \quad (3)$$

$$Y = 33,20 + 1,80X_1 + 2,14X_2 + 1,85X_3 \quad (4)$$

Nas equações (3) e (4) Y é o percentual de conversão da reação de hidrólise e X₁, X₂, X₃ e X₄ representam as seguintes variáveis: temperatura, pH, quantidade de enzima e razão molar água: óleo.

4.3 EFEITO DOS PARÂMETROS LINEARES NA REAÇÃO.

Abordando primeiramente a comb.1 (RML+TLL) o efeito da temperatura da reação foi de -3,67; o efeito do pH, 2,22; efeito da quantidade de enzima, 2,92; enquanto o efeito razão molar água: óleo foi de 0,67. Apesar de serem todos significativos, é interessante notar que a magnitude do impacto exercido pela variável temperatura é razoavelmente maior do que as demais variáveis. Ao fato de se ter chegado a um resultado negativo, o que significa dizer que com o aumento da temperatura na faixa entre 40 – 70 °C houve uma perda na atividade da enzima, fato que pode estar associado ao emprego de temperaturas excessivas ocasionando uma mudança na estrutura da enzima e/ou ainda no sítio ativo, o que se traduz em uma desnaturação da enzima e por consequência da diminuição da taxa de reação (CHULALAKSANANUKUL; CONDORET; COMBES, 1993). Para se obter um melhor resultado com o aumento desta variável, ou seja um aumento do percentual de hidrólise com um aumento de temperatura na tentativa de se aproximar do ponto ótimo desta variável, sugere-se utilizar uma temperatura de até 55 °C ou 60 °C no máximo, por serem temperaturas mais próximas dos resultados de melhor atividade para RML e TLL, sendo que para a TLL há indicativos de atividade máxima em torno de 40°C (FERNANDES *et al.*, 2004), enquanto para a RML foram observadas atividades consideráveis entre 40°C e 50°C (COSSIGNANI *et al.*, 2004).

No que se refere à quantidade de enzima e pH, observam-se que estas duas variáveis tem um impacto com uma grandeza similar na reação (2,92 e 2,23); respectivamente. O efeito da quantidade de enzima adicionada gera um

aumento na taxa de reação. Isto se deve ao fato do experimento ter sido conduzido em 3 horas. Este tempo é insuficiente para que uma baixa concentração de enzima (5% e 10% de massa de enzima em relação a massa de óleo) consiga interagir com todo o substrato presente. Assim é necessário aumentar a quantidade de enzima adicionada, para se ter uma hidrólise eficiente neste tempo. Paralelo a isto, há o fato de que a tanto a enzima RML quanto a enzima TLL são sn-1,3 específica, ou seja, possuem preferência pelas posições 1 e 3 do triglicerídeo o que sugere a possibilidade de que se não houvesse essa seletividade posicional, poderia se ter atingido valores maiores de hidrólise pelo fato de a reação também ter ocorrido na posição 2 do triglicerídeo o que significaria um melhor aproveitamento do substrato pela hidrólise ocorrer nas três posições onde estão localizadas os ácidos graxos. Por um outro ponto de vista, significaria dizer que 3 horas é um tempo insuficiente para que os ácidos graxos livres presentes na posição dois migrassem espontaneamente para a posição 1 ou 3 após a formação de diglicerídeos, o que permitiria uma hidrólise mais rápida por parte destas enzimas.

Quanto ao efeito do pH, acredita-se que um aumento em seu valor ocasione um interação entre os aminoácidos presentes no *lid* e próximos ao sítio ativo com as cargas existentes de tal forma que haja uma mudança na posição dos aminoácidos que recobrem o sítio ativo tornando-o mais exposto ao substrato, o que causaria uma elevação da taxa de hidrólise. Há ainda registros que a especificidade da enzima RML está fortemente relacionada com o pH sendo que ácidos graxos de cadeia curta são hidrolisados mais facilmente em pH baixos do que em pH altos (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Já se tratando da hidrólise da comb. 2 (RML+CALB) observou-se que somente os efeitos lineares apresentaram efeito significativo sobre a reação de hidrólise. O pH teve um impacto de 4,28, seguido da quantidade de enzima com um impacto de 3,69 e da temperatura com um impacto de 3,61. O impacto da temperatura e do pH neste caso também se explicam pelos fatores acima citados, porém é interessante notar que o impacto exercido pelo pH na comb. 2 é consideravelmente maior do que na comb.1 (4,28 versus 2,23; respectivamente) enquanto o impacto de temperatura foi de 3,61, o que indica

um aumento da atividade para um aumento de temperatura na comb.2. A influência do pH pode estar relacionada com o fato de que o tamanho do *lid* que recobre o sítio ativo da enzima CALB ser menor do que o *lid* que recobre os sítios da TLL e da RML e sendo assim, uma variação na carga do meio reacional modificaria mais intensamente a exposição do sítio ativo dessa enzima em relação às demais (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE,2010) e, por conseguinte, aumentaria de maneira mais drástica a taxa de hidrólise da comb.2 em relação à comb.1. Quanto ao efeito da temperatura ter sido positivo neste caso, significando que com um aumento na temperatura entre 40 e 70 °C houve uma melhor taxa de conversão, atribui-se ao fato da enzima CALB apresentar uma melhor capacidade de suportar temperaturas mais altas sendo que o ponto ideal de temperatura indicando pelo planejamento foi de 65.8 °C, coerente com a literatura que aponta o uso desta enzima com valores entre 50 e 60 °C (HAIGH *et al.*, 2013) para a síntese de biodiesel.

O fato do percentual de conversão da hidrólise aumentar significativamente com o acréscimo de quantidade de enzima também se explica pelo mesmo aspecto citado no caso da comb.1. De certa forma, o fato de este aspecto ter sido mais significativo na comb.2 em relação a comb.1 (3,69 versus 2,92) pode vir a confirmar o efeito da especificidade das enzimas. Uma vez que a enzima CALB não apresenta especificidade pela posição do ácido graxo na cadeia do triglicerídeo, ela apresenta a possibilidade de hidrolisar os ácidos graxos em qualquer posição da cadeia o que num primeiro instante pode oferecer uma “vantagem competitiva” a fim de se hidrolisar mais rapidamente o substrato. Assim, qualquer quantidade a mais de enzima sem especificidade provoca um aumento maior na velocidade de reação do que um aumento da quantidade de enzima sn - 1,3 específica. Importante se dizer que a seletividade enzimática não pode ser levada em conta de maneira isolada. A composição do triglicerídeo dentro de um mesmo óleo pode variar, o que se traduz em diferentes ácidos graxos (oleico, linoleico, linolênico, palmítico, esteárico) com diferentes graus de insaturação, comprimento de cadeia e conformação espacial ligados na molécula de glicerol; fatores estes que tem impacto considerável no acesso da enzima ao substrato que por sua vez se traduz numa variação da atividade biocatalítica.

Quanto a razão molar água:óleo, observou-se que esta possui uma baixa influência sobre a atividade da comb.1 (0,67) e que seu impacto não foi significativo para a comb.2 (0,36; *p-value* 0,677). Por serem positivos, estes valores sugerem um aumento da atividade catalítica dessas combinações com o aumento desta relação, possivelmente devido ao aumento da tensão superficial entre a fase aquosa e a fase orgânica, o que intensificaria o fenômeno da “ativação interfacial” por melhorar a formação de micelas; e este aspecto por sua vez propiciaria uma maior adesão entre a o sítio ativo da enzima e o substrato, o que aumentaria a taxa de conversão da reação de hidrólise. O fato deste aspecto ter pouca influência sobre a reação pode ser devido a melhoria na interação enzima-substrato causada pelo aumento do pH bem como pela quantidade de enzima adicionada suplantando em muito o efeito benéfico que este traga a reação (ROONEY; WHEATERLEY, 2010).

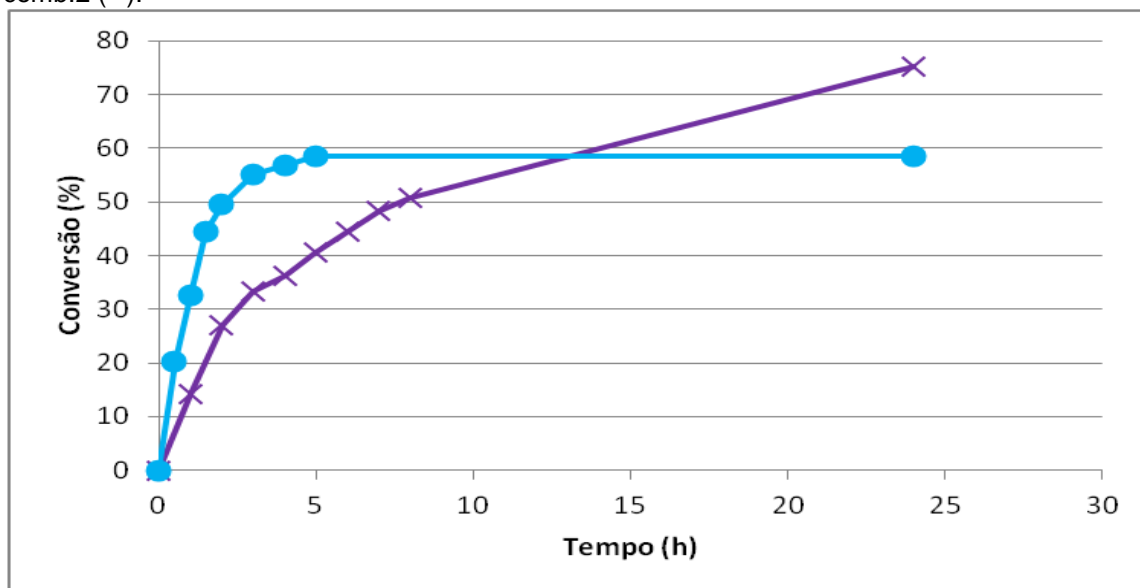
4.4 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE HIDRÓLISE E VALIDAÇÃO DO MODELO PROPOSTO.

As condições ótimas para a reação da hidrólise de óleo de canola obtidas a partir do planejamento experimental foram: 40 °C; pH 5,78; 12,5 % de enzima e razão molar (água:óleo) 21:1 para a comb. 1. Para a comb.2, os valores ótimos foram os seguintes: 65,8 °C; pH 8,2; 18,75 % de enzima e razão molar (água:óleo) 18,75:1. Nessas condições, o valor predito pelo planejamento experimental é de 29,43% de hidrólise para a comb.1 e 38,93% de hidrólise para a comb.2, ambas em três horas de reação. Ao se realizar os experimentos nestas condições ótimas em triplicata, verificou-se um valor de 35,56 % ± 3,5 para comb.1 e 58,66 % ± 4 para a comb.2, o que indica uma falta de correlação entre o modelo proposto e os dados experimentais, descartando o seu uso para prever o valor da reação de hidrólise em um tempo de três horas.

4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE HIDRÓLISE

A figura seguinte mostra o gráfico da atividade catalítica das duas melhores combinações nas suas respectivas condições ideais.

Figura 8 – Comparação da atividade catalítica entre as melhores combinações.comb1(×) e comb.2 (●).



Observa-se que para a comb.1 (RML+TLL) a reação de hidrólise é bem mais lenta num primeiro momento, sendo que nas primeiras 5 h atingiu-se um valor de 40,61 % ao passo que para a comb.2 neste mesmo período já se tinha um valor de 58,61 % de conversão, o que pode ser fruto tanto da temperatura mais alta empregada por ser o ponto ótimo obtido pelo planejamento experimental da reação, (65,8 °C) quanto pelo efeito da enzima CALB não apresentar especificidade de reação para as posições na cadeia do triglicerídeo, o que permite um maior aproveitamento do substrato num primeiro momento.

Porém, o resultado em 24 horas é interessante pois a comb. 1 atingiu 75,14 % de conversão. Este resultado pode estar relacionado com o fato de que em um tempo maior, é possível uma migração mais efetiva dos ácidos graxos da posição 2 para a posição 1 ou 3 do triglicerol o que favorece a hidrólise destas enzimas pois ambas apresentam uma especificidade *sn*-1,3, sendo interessante ressaltar que a RML no caso da hidrólise dos diacilgliceróis, (ou seja, quando neste caso já houver ocorrido uma hidrólise considerável de triglicerídeos, saturando o meio reacional com aquele composto) pode apresentar uma moderada preferência na posição 1 em relação a posição 3, o que pode impactar na velocidade da reação (RODRIGUEZ *et al.*, 2008).

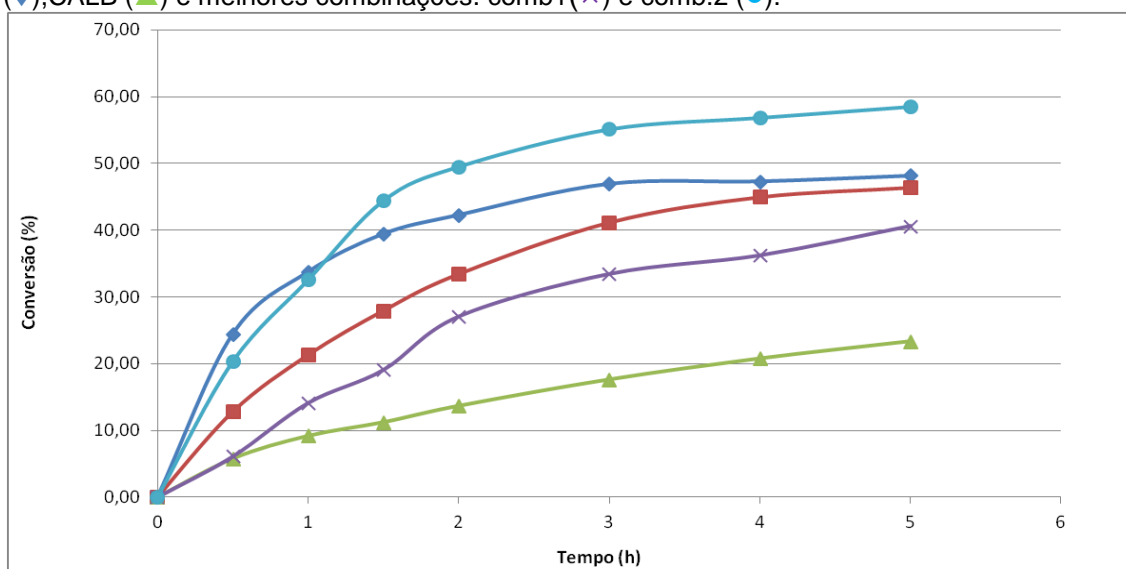
Ainda vale ser comentado o possível efeito da temperatura, pois na comb.1 por se ter empregado uma temperatura mais baixa (40 °C) propiciou-se

(a despeito de uma velocidade de reação inicial mais baixa) que a atividade enzimática da mistura perdurasse por mais tempo chegando a 75,14 % de conversão, diferentemente da comb. 2 que ao ser empregada em uma temperatura de 65,8 °C (o que significa 25,8 °C de variação de temperatura) apesar da alta velocidade inicial de reação atingiu em 24 horas 58,58 % de conversão, sendo que em 5 horas já tinha atingido 58,51 % de hidrólise, o que pode ser um indicativo de desnaturação da enzima e perda da atividade catalítica por se tratar de uma temperatura elevada de operação considerando períodos de reação maiores.

4.6 COMPARAÇÃO ENTRE ENZIMAS INDIVIDUAIS E COMBINAÇÕES ENZIMÁTICAS

Os resultados obtidos com o emprego das enzimas individuais a 50 °C foram comparados com os resultados obtidos através das combinações enzimáticas nas melhores temperaturas (40 °C comb.1 e 65,8 °C comb.2) em um intervalo de 5 horas. Os resultados são exibidos na figura 9.

Figura 9 - Comparação da atividade catalítica das enzimas individuais: RML (■), TLL (◆), CALB (▲) e melhores combinações. comb1(×) e comb.2 (●).



Ao se comparar os resultados da comb.1 com as enzimas RML e TLL empregadas individualmente verifica-se que ao longo de 5 horas o valor obtido para a mistura foi sempre menor do que para as enzimas individuais o que pode ser um indicador de que o efeito da temperatura prevalece em relação ao

ganho obtido pela combinação enzimática, lembrando que o fato de ambas enzimas terem a mesma especificidade (sn-1,3) fazem com que elas compitam pelo substrato, o que explicaria a ausência de aumento na taxa de reação com a união de ambas.

Notou-se que a comb. 2 apresentou o maior valor dentre os experimentos conduzidos (58,52 % de conversão) o que representa aproximadamente 10 % a mais do que os melhores resultados subsequentes (48,16 % para a RML individual e 46,38 % para a TLL individual). Isto indicaria que a combinação enzimática é uma alternativa melhor do que as enzimas individuais para a otimização da reação de hidrólise, porém, devido ao fato destes experimentos terem sido realizados em condições diferentes entre as quais se destaca a diferença de temperatura de 15,8 °C entre as combinações enzimáticas e as enzimas individuais, não se pode atribuir o efeito do aumento da taxa de reação resultante do planejamento exclusivamente a diferença de especificidades, pois o aumento de temperatura pode ter contribuído significativamente para este resultado. Um experimento com as enzimas individuais nas mesmas condições que as combinações enzimáticas ou ao menos na mesma temperatura destas poderia fornecer maiores esclarecimentos neste aspecto.

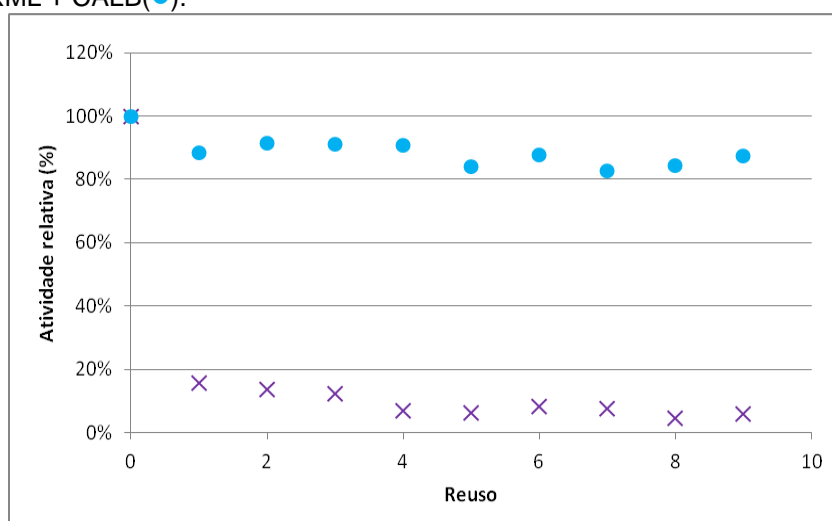
Também é interessante lembrar que como as enzimas individuais foram avaliadas por titulação com fenolftaleína o ponto de viragem desta bem como a relativa dificuldade em se observar quando ele ocorre pode ter acarretado uma superestimação dos valores de hidrólise com enzimas individuais em relação as combinações, cujas cinéticas foram avaliadas utilizando o medidor de pH.

4.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL

Tendo em mente a aplicação industrial da enzima, este biocatalisador tem que ser capaz de manter sua atividade através de várias bateladas. Por isto, as combinações enzimáticas foram submetidas a várias reações de hidrólise nas condições ótimas de quantidade de enzima (% da massa de enzima em relação a quantidade de óleo) e quantidade de água (razão molar

água:óleo) em um período de 2 horas em uma mesma temperatura, 40 °C. Após cada reação, elas foram lavadas com n-hexano a fim de remover qualquer resíduo da enzima após sua retirada do meio reacional, seja ele substrato ou produto. A eficiência a cada reutilização da enzima foi mensurada em relação a atividade inicial e o resultado expresso em atividade relativa (%) (atividade em 2h/atividade inicial). Na figura 10 são exibidos os resultados.

Figura 10 - Estabilidade das combinações ao longo dos reusos. Comb1 – RML+ TLL(×) e Comb.2 - RML + CALB(●).



O gráfico indica claramente que para a comb. 1 a partir do primeiro reuso já se tem uma redução drástica na atividade enzimática preservando apenas 15,83% da atividade inicial, chegando a atingir valores de 4 a 6% de atividade relativa nos últimos reusos, ao passo que a comb. 2 apresentou 88,53% de atividade em relação a atividade inicial no primeiro reuso apresentando valores próximos a 85% de atividade relativa após o sétimo reuso, o que indica uma maior estabilidade operacional sendo mais aplicável por várias bateladas.

Posto que as duas combinações foram testadas na mesma temperatura (40 °C), e com a mesma quantidade de enzima, a maior estabilidade da comb. 2 está possivelmente relacionada com a enzima CALB suportar temperaturas mais altas (importante lembrar que o ótimo para a sua aplicação indicado pelo planejamento foi em 65,8 °C) estando mais apta a manter a sua atividade a temperaturas de 40 °C do que a TLL. Além disto, é importante lembrar que a quantidade de enzima existente na comb. 2 é maior

do que na comb.1 (18,75% e 12,50%, respectivamente) e este aspecto pode ter também contribuído para uma maior resistência desta combinação uma vez que, para uma dada temperatura, pode-se cogitar que seria necessário um tempo maior para desnaturar uma maior quantidade enzimática.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise enzimática do óleo da canola. Acreditou-se ser a combinação enzimática entre a CALB, RML e TLL vantajosa uma vez que por envolver diferentes especificidades enzimáticas aumentaria a eficiência da reação. Um planejamento triangular a 50 °C apontou duas combinações com atividades catalíticas promissoras, com mais de 45% de conversão (80% RML + 20% TLL e 85% de RML + 15% de CALB; comb.1 e comb.2, respectivamente).

A fim de obter as melhores condições para cada combinação realizou-se um DCC envolvendo 4 variáveis (temperatura, pH, quantidade de enzima e razão água:óleo) em 3 horas de reação, obtendo-se os seguintes valores para comb.1: 40 °C, pH 5,78; quantidade de enzima 12,5 % (em relação a massa de óleo) e razão molar (água:óleo) 21:1. Já para a comb.2, os valores obtidos foram de: 65,8 °C; pH 8,2; 18,75% de enzima e razão molar água óleo 18,75:1.

Observou-se que nas condições ótimas a comb.2 apresentou uma velocidade de conversão consideravelmente maior que a comb.1, sendo que ao final de 5 horas de reação sua conversão chegou a ser 17,9% maior que a comb.1 (58,51% em relação a 40,61%) porém, acredita-se que a exposição a uma alta temperatura (65,8 °C) por longo tempo (24h) tenha causado sua desnaturação pois ao final deste período a sua conversão permaneceu basicamente a mesma que em 5h (58,51%) enquanto a comb.1 chegou a 75,14% de conversão, sendo que esta foi empregada a 40 °C.

Em um tempo de 5 horas, o melhor resultado obtido foi de 58,5% a 65,8 °C para a comb.2, não diferindo muito do resultado para a RML individualmente (48,16%) e mesmo da TLL individualmente (46,38%). O melhor resultado obtido foi de 75,14% de conversão para a comb.1 em 24 horas sendo que as enzimas individuais não foram avaliadas em 24 horas. Estes fatores mostram a necessidade de um novo estudo a fim de se verificar novas combinações enzimáticas bem como novos parâmetros para a reação a fim de se obter um rendimento similar à hidrólise química, que normalmente apresenta um rendimento superior a 97%.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Na tentativa de se obter um maior rendimento de reação de hidrólises enzimática, encontram-se na literatura vários trabalhos abordando diferentes variáveis do processo ou ainda diferentes recursos que podem ser empregados e não foram abordados neste trabalho. Destaca-se o uso da energia ultrassônica como forma aumentar a hidrólise uma vez que o seu emprego acarreta um aumento da solubilidade entre óleo e água, o que geraria uma maior formação de micelas e conseqüentemente intensificaria o efeito da ativação interfacial necessário as lipases. O ultrassom ainda pode ocasionar alterações na conformação de cadeia enzimática, podendo estas serem favoráveis a reação de hidrólise ou ainda desfavoráveis por se traduzirem em uma desnaturação da enzima, dependendo da intensidade da radiação e do tempo de exposição empregados.

Ainda há a possibilidade de se aumentar a taxa de conversão a partir de um aumento da velocidade de agitação o que possibilitaria uma maior interação entre a enzima e o substrato, sendo interessante analisar este efeito a partir de uma condição já considerada previamente como ótima, ou seja, a parte de um planejamento envolvendo outras variáveis.

Outra característica das lipases documentada pela literatura é a inibição da sua atividade pela formação de produtos, dentre os quais se destaca o glicerol resultante da hidrólise completa do triglicerídeo, podendo propor-se que a sua remoção implicaria em um aumento da atividade ou ao menos uma queda menos acentuada na conversão de hidrólise. Alguns aditivos como surfactantes não iônicos por exemplo, em pequenas quantidades chegam a aumentar o percentual de conversão de hidrólise mesmo em meios orgânicos, sendo que este aspecto parece sugerir que mesmo em meios aquosos o emprego destas substâncias em determinadas concentrações possa melhorar a interação entre enzima-substrato.

Por fim, no intuito de melhor elucidar os mecanismos envolvidos na reação de hidrólise bem como os impactos das variáveis para se alcançar um rendimento maior, propõe-se que os impactos exercidos pela temperatura e pH sejam avaliadas em conjunto porém sem se considerar a influencia exercida por outras variáveis no mesmo planejamento, isto por serem as duas variáveis

que mais exerceram influência em ambas combinações; e a partir dos resultados obtidos se estude a influencia da concentração de enzima e da relação entre água e substrato na reação de hidrólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKESSON, B. et al. Stereospecificity of different lipases. **Lipids**, v.8, p.313-318, 1983.

AVELAR, M.M.H et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v 44, p 452– 458, 2013.

AWADALLAK et al, Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.1002–1007, 2013.

BALBICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**, 2009, 74f, Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2009.

BROCCA et. al. 2000 Mutants provide evidence of the importance of glycosydic chains in the activation of lipase 1 from Candida rugosa. **Protein Science** 2000, v.9, p.985 – 990.

BUENO, T. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**, 2005, 102f, Dissertação (mestrado), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Lorena, 2005.

CANOLA COUNCIL OF CANADA, 2011. **What is canola?** Disponível em: <<http://www.canolacouncil.org/oil-and-meal/what-is-canola/>>. Acesso em 03 dez 2013.

CARVALHO, P. O. et. al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 1, 75-80, 2003

CELENNALIMENTOS S/A. **Óleo de canola Lilás**. Disponível em: <<http://celena.com.br/oleoDeCanolaLilas.php>>. Acesso em: 03 dez 2013

CHEN, Y.Q. et al. Dietary fat: Gene interaction in cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v 26, p 535 – 551. 2007.

CHEW et al, Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p.516–520, 2008.

COELHO, A.D. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal, **Revista Química Nova**, v.20, n.138, p.1164-1169. 2013.

CHU, B.S., QUEK, S.Y.,BAHARIN, B.S. Optimisation of enzymatic hydrolysis for concentration of vitamin E in palm fatty acid distillate. **Food Chemistry**, v.80 p.295–302, 2003.

CHULALAKSANANUKUL,W.; CONDORET, J.B.; COMBES,D. Geranyl acetate synthesis by lipase- catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 15, p 691-698, 1993.

COSSIGNANI, et al., Biocatalyzed acidolysis of soybean oil triacylglycerols to increase oleic acid content. **Journal of Chromatography A**, v.1052, p. 167-170, 2004.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme Microbiological Technology**, v.26, p.657– 663.

DELLAMORA-ORTIZ et al. Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 26, p.31-37, 1997.

DIAMOND, I.R. et al. The rationale for the use of parenteral omega-3 lipids in children with short bowel syndrome and liver disease. **Pediatric Surgery International**, 24, 773–778. 2008.

DONG, H.P, WANG, Y.J., ZHENG, Y.G. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3- hydroxyglutarate to ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p 90-94, 2010.

EMBRAPA, 2013; **Definição e histórico de Canola**. Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/definicao.htm>>. Acesso em 03 dez 2013.

FAO/WHO 1994; **Experts' recommendations on fats and oils in human nutrition**. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/t4660t/t4660t02.htm#TopOfPage>> Acesso em 03 dez 2013

FARIA, L.A. de **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**, 2010,146f, Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Belo Horizonte, 2010.

FERNANDES, Maria L. M. **Hidrólise de triglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas**. 2002, 110 f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós – Graduação em Química, Curitiba, 2002

FERNANDES, M.L.M, et al., Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginose* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.30, p.43-39, 2004.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.62, p.197–212, 2010.

FERNANDEZ-LORENTE et al., Improved Catalytic Properties of Immobilized Lipases by the Presence of Very Low Concentrations of Detergents in the Reaction Medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27,n.2, pg 242-250, 2008.

GRIMALDI, R. **Adequação tecnológica para extração e refino de óleo de canola/colza**, 1994, 94f, Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas. Programa de Pós – Graduação em Engenharia de Alimentos, Campinas, 1994.

HAIGH et al., 2013. Comparison of Novozyme 435 and Purolite D5081 as heterogeneous catalysts for the pretreatment of used cooking oil for biodiesel production. **Fuel**, v. 111, p.186–193, 2013.

HALIN, S.F.A.; KAMARUDDIN, H.A. Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a tert-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 43, p.1436–1439, 2008.

HORROBIN, D.F. et al Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. **Biological Psychiatry**, v.30, p.795–805. 1991.

JURADO et al, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of triglycerides in o/w emulsions: Study of the initial rates and the reaction time course. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p.473–484, 2008.

JUTILA et al, Detergent-Induced Conformational Changes of Humicola lanuginosa Lipase Studied by Fluorescence Spectroscopy. **Biophysical Journal**, v.78, p.1634–1642, 2000.

LAKIMESHI, B.S et al. Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p. 66 – 70, 1999.

MACLEAN, et. al: Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review: **Journal of the American Medical Association**, v.295, p. 403 – 416. 2006.

MANCHEÑO, et al. Structural insights into the lipase/esterase behaviour in the *Candida rugosa* Lipases family: crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 197 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.332, p.1059–1069, 2003.

MARÍA, P. D. et al. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v.24, p.180– 196, 2006.

MCNAMARA, R. K. The emerging role of omega-3 fatty acids in psychiatry. **Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids**, v 75, p 223–225. 2006.

NOEL, M. e COMBES, D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability. **Journal of Biotechnology**, v.102, p 23-32, 2002.

PEDERSSETTI, M.M; **Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de canola com dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado**. 2008.74f; Dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Toledo, 2008.

RATHUD e PANDIT, Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. **Biochemical Engineering Journal**, v.47, p.93–99, 2009.

- RAZACK, R., e SEIDNER, D. L. Nutrition in inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v 23, p 400–405. 2007.
- RÍO, J. L. del. et. al Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. **Biotechnology Letters**. v.12, n.11:835– 838,1990.
- RODRIGUES,R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, p15–32, 2010.
- RODRIGUES, R.C. et al., Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* Critical role of chemical amination. **Process biochemistry**, v.44, p.963 – 966, 2009.
- RODRIGUEZ, J.A. et al., Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases. **Analytical Biochemistry**, v. 375, p.196–208, 2008.
- ROONEY, D. e WHEATERLEY,L.R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid–liquid reactor **Process Biochemistry**, v.36 947–953, 2001.
- RÚA, M.L. et al. Purification and characterizations of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1078: p. 181–189. 1993.
- SAILHU, A. et al., Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.69, p.66–73, 2011.
- SHARMA, A.; CHAURASIA, P.S.; DALAI, A.K.; Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v 207, p 93– 100, 2012.
- SIMOPOULOS, P.A. Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. **Food reviews international**. v. 20, n. 1, p. 77–90, 2004.
- SIMOPOULOS, P.A. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. **Experimental Biology and Medicine**. v 233; p674-688, 2008
- SKAGERLIND et al Binding of *Rhizomucor miehei* lipase to emulsion interfaces and its interference with surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.4, p.129-135, 1995.
- SODERLUND et al. Effects of betaine on the structural dynamics of *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.26, p.75–83, 2002.
- STILWELL, W., e WASALL, S. R. Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v 126, p 1–27, 2003.
- TANG, S.J et al. Recombinant expression of the *Candida rugosa* Lip4 lipase in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purification**.v.20: p.308– 313, 2000.

WANG, Y. et al, Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra). **Food chemistry**, v.121, p. 1066 – 1072, 2010.
YOU, L.L e BAHARIN, B.S. Effects if enzymatic hydrolysis on crude palm olein by lipase from candida rugosa. **Journal of Food Lipids** v.13, p.73–87, 2006.

MENDES et al Teor de ácido oleico nos óleos de girassol, milho e soja, **Universo**. v.3, p.19-25, 2012.

ZAMBIAZI, R.C. et al. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007.