UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia das Fermentações

Esterificação do glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase em
regime descontínuo e descontínuo-alimentado

Gabriela Caldas Steinstraesser

Dissertação para obtenção do título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia das Fermentações

Esterificação do glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase em
regime descontínuo e descontínuo-alimentado

Gabriela Caldas Steinstraesser

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

SÃO PAULO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S819 Steinstraesser, Gabriela
Esterificação do glicerol e ácido caprílico
catalisada por lipase em regime descontínuo e
descontínuo-alimentado / Gabriela Steinstraesser. -
São Paulo, 2018.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vitolo, Michele
Coorientador: Gioielli, Luiz

1. Caprilinas. 2. Imobilização Enzimática. 3.
Lipases. 4. Esterificação. 5. Cromatografia em
Camada Delgada. I. T. II. Vitolo, Michele ,
orientador. III. Gioielli, Luiz, coorientador.

GABRIELA CALDAS STEINSTRAEISSER

**Esterificação do glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase em
regime descontínuo e descontínuo-alimentado**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli
coorientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Michele Vitolo pela incrível orientação e ensinamentos ao longo deste trabalho. Sua dedicação, generosidade e paciência incondicionais foram fundamentais e demonstram claramente sua vocação para o ensino e pesquisa.

Ao meu coorientador prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli, por todos os ensinamentos, apoio e conselhos que colaboraram para este trabalho e para a minha formação científica e pessoal.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu marido Victor, que esteve comigo em todos os momentos. Seu amor e apoio foram essenciais para eu prosseguir.

Ao meu pai Juan, sempre interessado em todos os meus projetos. Obrigada por sempre me incentivar.

Às minhas irmãs Janaína e Mariana e aos meus irmãos Daniel e Gui, pelo carinho e apoio de sempre. Ao Gui, especialmente, pelo talento e aptidão à ciência, que foram um exemplo para mim durante todo o mestrado.

Aos meus sogros Márcia e Laerte e à minha cunhada Marina, que se tornaram uma verdadeira família para mim.

Às minhas amigas da faculdade, pela longa jornada que passamos juntas, e por estarem sempre presentes, mesmo com essa vida tão corrida.

Aos meus colegas do departamento, pelos cafés e conversas. Obrigada por terem me recebido tão bem.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização da pós-graduação.

RESUMO

STEINSTRÆSSER, Gabriela Caldas. **Esterificação do glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase em regime descontínuo e descontínuo-alimentado**. 2018. 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

As caprilinas são acilgliceróis de cadeia média com diversas aplicações nos campos alimentício, farmacêutico e cosmético. A esterificação direta é um processo importante para a síntese de caprilinas, dado que o glicerol é subproduto da produção de biodiesel e que a tricaprilina, material de partida para a glicerólise e hidrólise, não é um composto abundante naturalmente. As reações existentes para a síntese de acilgliceróis podem ser catalisadas por via química ou enzimática, sendo esta última superior em diversos aspectos. Dois dos principais contrapontos à utilização de enzimas são seu alto custo e dificuldade de recuperação. A imobilização de enzimas é uma das maneiras existentes para contornar estas questões. A maioria dos estudos científicos relativos à obtenção destes compostos refere-se aos acilgliceróis de cadeia longa. Portanto, é necessário aprimorar a esterificação direta entre o glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase, através da compreensão da cinética reacional e da influência dos parâmetros reacionais. A existência de uma metodologia de separação, identificação e quantificação simples e eficaz também é importante, tornando as pesquisas relacionadas às caprilinas mais rápidas e menos complicadas. Desta maneira, este trabalho consistiu de três etapas principais: (1) a imobilização de lipases em resinas de troca aniônica, visando reduzir os custos em relação à lipase imobilizada comercial; (2) o desenvolvimento de um método de cromatografia em camada delgada capaz de quantificar as caprilinas formadas; (3) o estudo da reação de esterificação para a obtenção de caprilinas em regime descontínuo e descontínuo-alimentado. A resina DOWEX® 1X2-400 foi a que apresentou a melhor eficiência de imobilização (EI) da Palatase®. Sua atividade lipolítica foi apenas 12,7% inferior à versão imobilizada comercial da lipase, a Lipozyme® RM IM, indicando a viabilidade de substituição desta última. O desenvolvimento de método de cromatografia em camada delgada resultou em relações lineares para a detecção e quantificação de ácido caprílico, monocaprilina, dicaprilina e tricaprilina com R^2 e R^2_{pred} de 99,3%/98,73%; 98,9%/97,6%; 99,8%/99,8% e 99,7%/99,5%, respectivamente, e com valor-p de 0,000. As reações em regime descontínuo foram realizadas seguindo planejamento fatorial completo, no qual foram variadas a temperatura (30 ou 70°C), a proporção molar entre os reagentes (1:1 ou 3:1 – ácido caprílico : glicerol) e o tempo reacional (6 ou 10h). A análise de regressão do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico indicou que, nestas condições, os fatores relevantes para o resultado final são a temperatura e a proporção molar, bem como a interação entre eles. As melhores condições para a obtenção de mono e dicaprilinas foram, portanto, de 30°C e razão molar de 1:1. O estudo da cinética da reação indica que 40,4% do ácido caprílico são consumidos na primeira hora e que o consumo máximo ocorre na terceira hora de reação. Houve uma queda drástica no rendimento reacional, quando a reação foi conduzida em regime descontínuo-alimentado, provavelmente devido à menor eficiência catalítica da lipase devido ao baixo teor de água na primeira hora de reação.

Palavras chave: caprilinas, imobilização enzimática, lipases, atividade lipolítica, cromatografia em camada delgada.

ABSTRACT

STEINSTRÄESSER, Gabriela Caldas. **Lipase catalyzed esterification of glycerol and caprylic acid using batch and fed-batch operating mode**. 2018. 98f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

Caprylins are medium chain acylglycerols that find several applications in food, pharmaceutical and cosmetic fields. Direct esterification is an important route for the synthesis of caprylins, since glycerol is a byproduct of biodiesel production and tricaprylin, the starting material of glycerolysis and hydrolysis, is not a naturally abundant compound. The glycerides synthesis can be catalyzed by either chemical or enzymatic routes, the latter being superior in several aspects. The biggest issues regarding the use of enzymes are their high cost and difficult recovery. Using immobilized enzymes can minimize these concerns. Most of scientific studies concerning the obtainment of these compounds address to long chain acylglycerols. Thus, the improvement of lipase catalyzed esterification of glycerol and caprylic acid is necessary, by understanding the reaction kinetics and the role of reaction parameters. A simple and effective method of separation, identification and quantification of caprylins is also a relevant contributing factor for easier and faster researches. Therefore, this work consisted of three main steps: (1) immobilization of lipases on anion exchange resins in order to produce a cheaper alternative to imported commercial immobilized lipases; (2) development of a thin layer chromatographic method capable of quantifying caprylins; (3) studying the obtainment of caprylins by direct esterification in batch and fed batch systems. DOWEX[®] 1X2-400 resin presented the best immobilization efficiency (IE) results. Additionally, its lipolytic activity was only 12.7% lower than the commercial Lipozyme[®] RM IM, suggesting that Lipozyme's substitution is feasible. Regarding the developing of a thin layer chromatography method, linear correlations were obtained for detection and quantification of caprylic acid, monocaprylin, dicaprylin and tricaprylin, with a R^2 and R^2_{pred} of 99,3%/98,73%; 98,9%/97,6%; 99,8%/99,8% e 99,7%/99,5%, respectively, with a p-value of 0,000. The batch reactions were carried out according to a complete factorial design, in which the temperature (30 or 70°C), the molar ratio between the reagents (1:1 or 3:1) and reaction time (6h or 10h) were varied. The regression analysis of reactional yield expressed in terms of percentage of caprylic acid consumption indicated that only the temperature, molar-ratio and their interaction were important for reaction yields, within the studied conditions. The best conditions related to the obtainment of mono and dicaprylins were 30°C and molar ratio of 1:1. The reaction kinetics indicates that 40.4% of the caprylic acid is consumed within one hour of reaction and that the maximal consumption was achieved in the third hour. A drastic drop in reaction yield was observed when the fed batch mode was adopted, probably due a lower catalytic efficiency presented by lipase as a result of the lower water content in the first hour of reaction.

Keywords: Caprylins, enzymatic immobilization, lipases, lipolytic activity, thin layer chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fórmula estrutural de mono-, di- e triglicerídeos.....	15
Figura 2.	Fórmula estrutural da tricaprilina.....	18
Figura 3.	Esquema da reação de hidrólise de glicerídeos (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa).....	22
Figura 4.	Outras reações catalisadas por lipases.....	29
Figura 5.	Métodos de imobilização de enzimas.	32
Figura 6.	Curva padrão para a dosagem de proteínas solúveis através do método de diferença de absorbância a 215 e 225nm.....	55
Figura 7.	Curva padrão para a dosagem de glicerol através de método enzimático com detecção colorimétrica.....	56
Figura 8.	Curva padrão para a dosagem de ácido caprílico residual por método titulométrico.....	56
Figura 9.	Curva padrão para a determinação da atividade lipolítica através de método colorimétrico de hidrólise do pNPP, cujo produto é o composto pNP.....	57
Figura 10.	Placas analisadas pelo programa Just TLC [®] para análise de correlação entre as áreas das manchas e concentração das caprilinas e ácido caprílico.....	57
Figura 11.	Dosagem de ácido caprílico por CCD.....	58
Figura 12.	Dosagem de monocaprilina por CCD.....	58
Figura 13.	Dosagem de dicaprilina por CCD	59
Figura 14.	Dosagem de tricaprilina por CCD.....	59
Figura 15.	Gráficos de velocidade inicial versus concentração de substrato (Gráfico A - Lipozyme [®] RM IM/Gráfico B - P:1x2-400) e gráficos de Lineweaver-Burk (Gráfico C - Lipozyme [®] RM IM/Gráfico D - P:1x2-400) para a reação de hidrólise do pNPP.....	64

Figura 16.	Gráfico de Pareto resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico....	68
Figura 17.	Gráfico de probabilidade normal resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico.....	68
Figura 18.	Gráfico de Pareto resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.....	71
Figura 19.	Gráfico de probabilidade normal resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.....	72
Figura 20.	Placa de CCD com quatro pontos de aplicação referentes à reação catalisada pela enzima P:1x2-400 (pontos indicados pela Letra P azul) e com quatro pontos referentes às reações em regime descontínuo catalisadas por Lipozyme®RM IM (Indicadas pelos números 1, 3, 4 e 5) As manchas referentes à tricaprilina estão circuladas em azul.....	73
Figura 21.	Cinética reacional da reação de esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo, catalisada por Lipozyme® RM IM, expressa em % de consumo de ácido caprílico.....	76
Figura 22.	Cinética reacional da esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo e catalisado por Lipozyme® RM IM, com rendimento expresso em % de monocaprilina, dicaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Enzimas microbianas comerciais.....	28
Tabela 2.	Vantagens e desvantagens associadas à técnica de imobilização.....	31
Tabela 3.	Princípios e características relevantes das principais técnicas cromatográficas.....	37
Tabela 4.	Sistemas de solventes utilizados para separação de glicerídeos em CCD ou CCDAE.....	42
Tabela 5.	Concentrações das soluções utilizadas na análise de caprilinas e ácido caprílico por cromatografia em camada delgada.....	48
Tabela 6.	Volumes adicionados da solução de pNPP 3mg.mL ⁻¹ e respectivas concentrações resultantes (μM) utilizadas nos ensaios de determinação das constantes cinéticas das enzimas Lipozyme®RM IM e P:1x2-400.....	51
Tabela 7.	Planejamento fatorial completo para as reações de esterificação em regime descontínuo.....	52
Tabela 8.	Planejamento fatorial completo para as reações de esterificação em regime descontínuo-alimentado.....	54
Tabela 9.	Eficiência de imobilização de diferentes proteínas com resinas aniônicas.....	60
Tabela 10.	Atividade, teor de proteína e atividade específica para Palatase® solúvel e imobilizada em resina 1x2-400.....	62
Tabela 11.	Atividade, teor de proteína e atividade específica para Palatase® imobilizada em resina 1x2-400 e 1x4-200 e para Lipozyme® RM IM....	63
Tabela 12.	Equações de Linewaver-Burk e estimativa das constantes cinéticas referentes às enzimas Lipozyme® RM IM e P:1x2-400.....	65

Tabela 13.	Resultados das reações do planejamento fatorial completo (regime descontínuo) em termos de porcentagem de consumo dos reagentes, mols dos reagentes consumidos e razão molar de consumo entre os reagentes.....	66
Tabela 14.	Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico.....	67
Tabela 15.	Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de glicerol.....	70
Tabela 16.	Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.....	71
Tabela 17.	Porcentagens de monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina e ácido caprílico nos extratos orgânicos referentes às reações de esterificação em regime descontínuo do planejamento fatorial completo.....	74
Tabela 18.	Consumo de ácido caprílico em esterificação catalisada pela enzima P:1x2-400 versus reação de esterificação catalisada por Lipozyme® RM IM.....	75
Tabela 19.	Porcentagens de monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico da reação de esterificação catalisada pela enzima P:1x2-400.....	75
Tabela 20.	Cinética reacional da esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo e catalisado por Lipozyme® RM IM, com rendimento expresso em % de monocaprilina, dicaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico.....	77
Tabela 21.	Resultados das reações do planejamento fatorial completo (regime descontínuo-alimentado) em termos de porcentagem de consumo de ácido caprílico e porcentagens de monocaprilina e dicaprilina no extrato orgânico.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCM	Ácido Graxo de Cadeia Média
ANOVA	Análise de Variância
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CG	Cromatografia a Gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d^{20}	Densidade relativa a 20°C
DAG	Diacylglicerol
DVB	Divinilbenzeno
EI	Eficiência de Imobilização
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCM	Glicerídeo de Cadeia Média
GL	Graus de Liberdade
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPV	<i>High Production Volume</i>
k	Constante de adição exponencial
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MAG	Monoacylglicerol
OH	Grupos hidroxilas livres
PE	Ponto de ebulição
PF	Ponto de Fusão
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol

p NPP	Palmitato de p -nitrofenila
PTA	Proteína Total Adicionada
PTS	Proteína Remanescente no Sobrenadante
QM	Quadrados Médios
R^2	Coeficiente de determinação
$R^2_{(pred)}$	Coeficiente de determinação predito
RCO	Cadeias acil
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
SLS	Sistema Livre de Solventes
SQ	Soma dos Quadrados
TAG	Triacilglicerol
TCL	Triglicerídeos de Cadeia Longa
TCM	Triglicerídeos de Cadeia Média
U	Unidade de Atividade Enzimática
V	Volume em dado momento
V_0	Volume inicial
V_{ad}	Volume adicionado
V_f	Volume final
$V_{máx}$	Velocidade Máxima da Reação
θ	Tempo de enchimento do reator
φ	Vazão de alimentação
φ_i	Vazão inicial de alimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Glicerídeos	15
1.1.1. Propriedades e aplicações	16
1.1.2. Ácido caprílico	17
1.1.3. Glicerídeos de cadeia média e caprilinas	18
1.2. Métodos de obtenção de Glicerídeos	21
1.2.1. Hidrólise	22
1.2.2. Glicerólise	23
1.2.3. Esterificação direta	24
1.2.4. Alternativa enzimática	26
1.3. Esterificação direta catalisada por lipase	26
1.3.1. Lipases	27
1.3.2. Imobilização enzimática	30
1.3.3. Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	33
1.3.4. Meio reacional	34
1.3.5. Condições reacionais	34
1.4. Identificação e quantificação de lipídeos	36
1.4.1. Técnicas cromatográficas	36
1.4.2. Aspectos da cromatografia em camada delgada	39
1.4.3. Cromatografia de camada delgada na análise de glicerídeos	40
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVO(S)	44
3.1. Objetivos específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Materiais	45
4.2. Procedimentos analíticos	46
4.2.1. Dosagem de proteína solúvel	46
4.2.2. Dosagem do glicerol	46
4.2.3. Dosagem do ácido caprílico residual	46
4.2.4. Atividade lipolítica	47
4.2.5. Dosagem de ácido caprílico e caprilinas por CCD	47

4.3.	Imobilização da lipase (TOMOTANI, VITOLO, 2006).....	49
4.4.	Determinação da atividade lipolítica	49
4.5.	Determinação das constantes cinéticas.....	50
4.6.	Esterificação em regime descontínuo	52
4.7.	Cinética da esterificação em regime descontínuo	53
4.8.	Esterificação em regime descontínuo-alimentado.....	53
4.9.	Separação das caprilinas.....	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	Curva padrão para dosagem de proteína solúvel	55
5.2.	Curva padrão para dosagem de glicerol	55
5.3.	Curva padrão para dosagem do ácido caprílico residual	56
5.4.	Curva padrão da atividade lipolítica	56
5.5.	Curvas-padrão de dosagem de caprilinas e ácido caprílico por CCD.....	57
5.5.1.	Ácido caprílico	58
5.5.2.	Monocaprilina	58
5.5.3.	Dicaprilina.....	59
5.5.4.	Tricaprilina.....	59
5.6.	Imobilização enzimática.....	60
5.7.	Determinação da atividade lipolítica	61
5.8.	Determinação das constantes cinéticas.....	63
5.9.	Esterificação em regime descontínuo	65
5.9.1.	Análise de regressão do consumo de ácido caprílico	66
5.9.2.	Análise de regressão do consumo de glicerol.....	69
5.9.3.	CCD para a quantificação de produtos específicos	72
5.10.	Esterificação em regime descontínuo catalisada pela lipase P:1x2-400	74
5.11.	Cinética da esterificação em regime descontínuo catalisada por Lipozyme [®] RM IM..	76
6.	CONCLUSÕES.....	81
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
9.	APÊNDICES	94
10.	ANEXOS.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glicerídeos

Os glicerídeos, ou acilgliceróis, são constituídos por uma molécula de glicerol esterificada a uma, duas ou três moléculas de ácido graxo, formando mono- (MAG), di- (DAG) e triacilgliceróis (TAG), respectivamente (Figura 1) (INDRASENA, 2006).

Figura 1. Fórmula estrutural de mono-, di- e triglicerídeos.

Fonte: Elaborado pela autora

Os triglicerídeos são considerados lipídios neutros, dado que o grupamento carboxílico de cada ácido graxo foi neutralizado na formação das ligações éster. Podem ser classificados em simples, quando todos os ácidos graxos em sua estrutura são iguais (caprilinas, por exemplo), ou mistos, quando pelo menos um ácido graxo da estrutura é diferente. Os lipídios neutros são a classe mais abundante de lipídios: gorduras e óleos vegetais consistem de misturas de triglicerídeos, com traços de mono e diglicerídeos. Todos os triglicerídeos são insolúveis em água e não apresentam tendência própria de formar micelas altamente dispersas (REGITANO-D'ARCE, 2006; BARKER, 1991).

No entanto, devido à presença de grupos hidroxilas livres (OH) e cadeias acil (RCO), as moléculas de MAG e DAG são anfifílicas, tornando possível o seu uso como emulsificante, reduzindo a tensão superficial entre água e óleo.

1.1.1. Propriedades e aplicações

A natureza anfifílica dos mono e diglicerídeos os tornam objetos de interesse para diversos segmentos, como o farmacêutico, o alimentício e o cosmético (KOTWAL, DESHPANDE, SRINIVAS, 2011; FREGOLENTE et al., 2010), sendo frequentemente utilizados como misturas para estas aplicações, uma vez que estas possuem baixo custo e fornecem performance apropriada. Contudo, para alguns usos específicos, como para a fabricação de produtos de panificação e confeitaria, sorvete, margarina e manteiga de amendoim, emulsificantes com alta concentração de monoglicerídeos são necessários (FREGOLENTE et al., 2010).

Na indústria farmacêutica, os MAG são utilizados como aglutinante em comprimidos, como emoliente em emplastos de liberação lenta e como estratégia para aumentar a biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis administrados por via oral (KAEWTHONG et al., 2005; FLISZAR et al., 2005). No segmento cosmético, os monoacilgliceróis são utilizados como agente de textura e para melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG et al., 2005).

Os DAG, além de serem utilizados em conjunto com os MAG para fins emulsionantes, possuem qualidades nutricionais relevantes, podendo substituir triglicerídeos na composição de alimentos (FREGOLENTE et al., 2010).

Os óleos que contém diacilgliceróis possuem efeitos benéficos na obesidade e em outras desordens relacionadas ao excesso de peso. Estudos têm demonstrado que o consumo de óleo de DAG pode reduzir os níveis séricos de TAG pós-prandial e reduzir o acúmulo de gordura corporal. Os efeitos fisiológicos dos diacilgliceróis devem-se ao fato de serem metabolizados a moléculas menores com mais facilidade, sendo preferencialmente consumidos como fonte energética ao invés de armazenados. Os TAG em excesso, por sua vez, são acumulados sob a forma de gordura localizada (LO et al., 2008).

Ao contrário dos emulsificantes iônicos, os mono- e diglicerídeos podem ser ingeridos por humanos sem a ocorrência de efeitos colaterais ou irritações cutâneas (MACHADO et al., 2000). Adicionalmente, como emulsificantes não iônicos, as

moléculas de MAG e DAG são consideradas “emulsificantes verdes” devido a sua natureza biodegradável (DELEU, PAQUOT, 2004).

Estes fatores constituem potencial atratividade para pesquisadores e fabricantes, uma vez que há uma preocupação cada vez mais significativa do consumidor em relação aos produtos que ingere ou utiliza, além de uma tendência regulatória cada vez mais rígida em escala mundial.

1.1.2. Ácido caprílico

Ácidos graxos de cadeia média (AGCM) são compostos por 6 a 10 carbonos e não apresentam insaturações. Alguns autores também classificam o ácido láurico (12C) como AGCM (MARTEN, PFEUFFER, SCHREZENMEIR, 2006). São encontrados nos leites de alguns mamíferos, como o humano e o bovino, mas é a sua presença no leite caprino que resultou na denominação usual de três tipos de AGCM, a saber, ácido capróico (6C), ácido caprílico (8C) e ácido cáprico (10C), considerando que estes três ácidos graxos correspondem a aproximadamente 15% do total de ácidos graxos do leite de cabra. O óleo de coco também é fonte desses ácidos graxos, embora cerca de 50% da gordura presente neste óleo seja de ácido láurico (TREVIZAN, KESSLER, 2009; KOMPAN, KOMPREJ, 2012).

O ácido caprílico, ou ácido octanóico, é um ácido carboxílico saturado constituído por uma cadeia de oito carbonos, sendo encontrado nas fontes citadas anteriormente e também no óleo de babaçu, correspondendo a 3,5% do total de seus ácidos graxos constituintes (FREITAS, BUENO, CASTRO, 2004).

Há diversos métodos para a síntese do ácido caprílico. Entre eles podem-se citar a saponificação e subsequente destilação do óleo de coco; obtenção a partir do 1-hepteno e a oxidação do octanol (NCBI, 2015).

O ácido octanóico é listado como um produto químico de alto volume de produção (HPV, do inglês, *High Production Volume*), ou seja, é um composto produzido ou importado nos Estados Unidos da América em quantidades iguais ou superiores a um milhão de libras (aproximadamente 450 toneladas) (NCBI, 2015).

O ácido caprílico é um líquido oleoso com sabor ligeiramente rançoso, pouco solúvel em água (0,068 g/100g; 20°C), mas miscível com álcool, clorofórmio, éter, dissulfeto de carbono, éter de petróleo e ácido acético glacial. Algumas de suas propriedades físico químicas: PF = 16,7°C; PE = 240°C; $d^{20} = 0,910 \text{ g/cm}^3$; Flash Point = 130°C (MERCK INDEX, 2013).

1.1.3. Glicerídeos de cadeia média e caprilinas

Ácidos graxos podem ser utilizados como matéria-prima na reação de esterificação direta para a obtenção de glicerídeos (HAMERSKI, 2013) que, quando derivados dos ácidos graxos de cadeia média, são chamados de glicerídeos de cadeia média (GCM) (NANDI, GANGOPADHYAY, GHOSH, 2005). Os acilgliceróis que possuem uma, duas ou três moléculas de ácido caprílico esterificadas à molécula de glicerol são chamados genericamente de caprilinas (NAIR et al., 2004). A figura 2 representa a fórmula estrutural da tricaprilina:

Figura 2. Fórmula estrutural da tricaprilina.

Fonte: Elaborado pela autora

Os GCMs possuem aplicação específica nos campos alimentício, farmacêutico e cosmético. Estes compostos são solventes ideais para substâncias aromáticas,

esteroides, pigmentos e bases de perfume. (NANDI, GANGOPADHYAY, GHOSH, 2005).

Na indústria farmacêutica é comum a utilização de glicerídeos de cadeia média como emulsificantes para maximizar a biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis. As farmacopeias americana e europeia exigem que os GCMs sejam constituídos por 40,0% ou mais de monoglicerídeos e 7,0% ou menos de glicerina livre, permitindo que o restante dos compostos presentes sejam divididos entre diglicerídeos, triglicerídeos e ácidos graxos livres. Estas exigências permitem que uma ampla variedade de preparações esteja de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos (FLISZAR et al., 2005; LEE, PORTER, BOYD, 2013). Além disso, o departamento de *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos da América classifica os mono e diglicerídeos como GRAS (do inglês, *Generally Recognized as Safe*), permitindo seu uso em alimentos sem limitações além das boas práticas de manufatura (FDA, 2017).

Kim et al. (2005) estudaram a utilização de uma microemulsão composta por tricaprilina, Tween[®]80, Span[®]20 e heparina de baixo peso molecular conjugada ao ácido deoxicólico, em uma proporção de 5: 3: 1: 1, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade resultante da administração oral do conjugado. A microemulsão foi oralmente administrada em ratos e o consequente aumento de biodisponibilidade foi de 1,5%.

Os triglicerídeos de cadeia média (TCMs) têm sido utilizados como suplementos nutricionais para pacientes que possuem desordens de má-absorção causadas por ressecção intestinal ou outras doenças. Estes compostos também são utilizados em fórmulas infantis para alimentação de recém-nascidos e em dietas que requerem alta densidade energética (KIM, RHEE, 1991).

Os triglicerídeos de cadeia longa (TCLs) vêm sendo substituídos pelos de cadeia média, desde o surgimento destes últimos há aproximadamente seis décadas. Este fato se deve a uma significativa diferença entre eles: os TCM originam moléculas menores, fornecendo rotas absorptivas e metabólicas preferenciais. O metabolismo mais rápido dessas moléculas reduz o acúmulo destas no tecido adiposo (MUMME, STONEHOUSE, 2015).

Diversos estudos com humanos foram conduzidos com a finalidade de investigar o potencial dos TCMs como redutores de peso corporal. Mumme e Stonehouse (2015) realizaram uma meta-análise de estudos clínicos randomizados controlados realizados até março de 2014 e concluíram que o consumo de TCMs como parte da dieta, quando comparado com os TCLs, pode resultar em uma redução média do peso corporal de 0,51 Kg. Embora a redução seja pequena, os autores consideram que ela pode ser clinicamente relevante.

Outra propriedade que torna os triglicerídeos de cadeia média interessantes para certos fins terapêuticos é o fato de que seu metabolismo gera as três moléculas comumente denominadas como corpos cetônicos: a acetona, o acetoacetato e o D-beta-hidroxibutirato (TRAUL et al., 2000; LAFFEL, 1999). Estudos sugerem que os corpos cetônicos podem ser úteis em uma variedade de distúrbios neurológicos, sendo que dietas cetônicas têm sido utilizadas há séculos para reduzir a frequência de ataques epilépticos em pacientes pediátricos (MAYNARD, GELBLUM, 2013; FARAH, 2014).

Em um estudo de coorte retrospectivo, Maynard e Gelblum (2013), estudaram a eficácia da tricaprilina em pacientes com Doenças de Alzheimer de leve a moderada. Segundo os autores, os resultados indicam que a adição de tricaprilina à farmacoterapia usual para a Doença de Alzheimer foi associada à estabilização ou melhora da doença e da habilidade de realizar atividades cotidianas para a maioria dos pacientes após aproximadamente 19 meses de administração.

Há, ainda, potencial de uso das caprilinas em produtos alimentícios sujeitos a contaminação por micro-organismos patogênicos. Já foi demonstrado que o ácido caprílico e a monocaprilina são capazes de inativar patógenos infantis como o *Herpes simplex vírus 1*, o vírus sincicial respiratório, a *Haemophilus influenza* e o *Streptococcus* grupo B em leite humano e bovino e em fórmulas infantis a 37°C (NAIR et al., 2004). Chang, Redondo-Solano e Thippareddi (2010), por sua vez, avaliaram a eficiência da utilização do ácido caprílico e da monocaprilina em reduzir a população de *E.coli* O157:H7 e *Salmonella spp* em sementes de alfafa, que foram implicadas, juntamente com outras sementes de brotos, a diversos surtos de doenças humanas nos Estados

Unidos da América. Os resultados indicam que a monocaprilina foi mais efetiva que o ácido caprílico em reduzir as populações de bactérias e que a monocaprilina em uma concentração de 75mM pode ser usada como um sanitizante alternativo em sementes de alfafa sem comprometer as taxas de germinação. Em outro estudo, a monocaprilina também demonstrou capacidade em reduzir a atividade de *Listeria monocytogenes*, quando em concentração de 50mM e em combinação com ácido acético 1%, em salsichas de porco embaladas à vácuo mantidas a 4°C. Adicionalmente, a 45°C ou 50°C, esta combinação resultou em uma significativa inibição do crescimento bacteriano (GARCIA et al, 2007).

A monocaprilina demonstrou ser capaz de inibir a atividade microbiana também em tecidos (VLTAVSKA et al, 2012). Os autores do estudo demonstraram que tecidos modificados com uma solução etanólica a 15% de monocaprilina suprimiu o crescimento de leveduras patogênicas (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*) e de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*). Estes resultados indicam uma possível aplicação industrial, uma vez que estes fungos e bactérias são problemas recorrentes na estocagem de tecidos.

O mecanismo exato de ação do ácido caprílico e da monocaprilina em micro-organismos não é bem estabelecido. Em bactérias, suspeita-se que eles alterem a permeabilidade da membrana plasmática ou, ainda, que penetrem na célula e acidifiquem o meio intracelular, inativando enzimas e o transporte de aminoácidos. Pode haver, no entanto, uma limitação na eficácia antibacteriana destes compostos quando aplicados em matrizes ricas em nutrientes, como o leite, devido à formação de complexos com outros nutrientes, especialmente as proteínas (NAIR et al., 2004).

1.2. Métodos de obtenção de Glicerídeos

A produção dos glicerídeos pode ser realizada por três processos principais: a glicerólise de triglicerídeos; a esterificação direta de ácidos graxos com glicerol e a hidrólise de triglicerídeos, sendo as duas primeiras as rotas mais frequentemente

utilizadas (FREGOLENTE et al., 2010; DÍAZ et al., 2005), uma vez que a hidrólise possui baixa capacidade produtiva (HU, CHEN, XIA, 2013).

Estes três métodos podem ser conduzidos tanto por via química quanto por via enzimática empregando lipases, gerando uma mistura de mono-, di- e triglicerídeos e substratos que não reagiram. A proporção depende da presença e do tipo de catalisador e das condições da reação, como temperatura e razão molar entre os reagentes (COSTA, 2010).

1.2.1. Hidrólise

A hidrólise consiste na reação de uma molécula de MAG, DAG OU TAG, com uma molécula de água. Como produtos podem ser gerados diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres, conforme esquematizado na Figura 3.

Figura 3. Esquema da reação de hidrólise de glicerídeos (reação direta) e esterificação do glicerol (reação inversa).

Fonte: Elaborado pela autora

A hidrólise contínua de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos e glicerol é um processo padrão utilizado em escala industrial que não requer, necessariamente, a utilização de catalisadores. As gorduras normalmente são hidrolisadas em tratamento contracorrente com vapor em condições de elevadas temperatura e pressão (COSTA, 2010; SALIMON, ABDULLAH, SALIH, 2011).

Entretanto, a hidrólise não é extensivamente utilizada para a síntese de glicerídeos, uma vez que é necessário um rígido controle operacional para evitar a hidrólise completa dos triglicerídeos. Adicionalmente, o rendimento teórico da reação em termos de formação de monoglicerídeos é o mais baixo dos métodos disponíveis, uma vez que cada mol de TAG é capaz de gerar apenas um mol de MAG (HAMERSKI, 2013; COSTA, 2010).

Outro aspecto a ser considerado é que a disponibilidade e composição de triglicerídeos, um dos materiais de partida desta reação, variam de acordo com o óleo ou gordura utilizado. Desta maneira, a utilização deste método pode não ser interessante para a obtenção de MAG e DAG a partir de triglicerídeos pouco abundantes na natureza, como é o caso da tricaprilina.

1.2.2. Glicerólise

A glicerólise consiste na reação de uma molécula de TAG e glicerol, produzindo uma molécula de MAG e outra de DAG. Esta última reage com outra molécula de glicerol gerando duas novas moléculas de MAG. É importante observar a migração acil que ocorre entre as moléculas 1(3) MAG e (2) MAG e entre (1,2) DAG e (1,3) DAG, especialmente em situações em que apenas um dos isômeros é o produto desejado (ZHONG, XU, CHEONG, 2014).

Usualmente, a glicerólise é conduzida utilizando catalisadores básicos como o NaOH e Ca(OH)_2 em temperaturas que variam de 220°C a 260°C. A glicerólise comercial geralmente proporciona uma distribuição de MAG, DAG E TAG de 45-55, 38-45 e 8-12%, respectivamente (HAMERSKI, 2013; ZHONG, XU, CHEONG, 2014; SOLAESA et al, 2016).

A glicerólise é o processo mais convencional e conhecido na obtenção industrial de MAG e DAG, uma vez que teoricamente é a reação que obtém o melhor rendimento destas duas moléculas. No caso dos monoglicerídeos, um mol de TAG e dois mols de glicerol podem produzir três mols de MAG. Quando não há excesso de glicerol no meio, é possível direcionar a reação para um rendimento maior de DAG (HAMERSKI, 2013).

Este processo, quando catalisado por compostos alcalinos, apresenta algumas desvantagens. Além da utilização de altas temperaturas para realizar a reação, são necessárias várias etapas de alto custo para separar os produtos de interesse (KAPOOR, GUPTA, 2012). Adicionalmente, o eventual excesso de reagentes e os resíduos gerados pela reação podem ser impactantes do ponto de vista ambiental (HAMERSKI, CORAZZA, 2014).

1.2.3. Esterificação direta

A esterificação direta do glicerol com ácidos graxos é uma alternativa interessante para a obtenção de glicerídeos, visto que é possível controlar com mais precisão, a partir da prévia seleção do ácido graxo de interesse, quais compostos serão gerados (MOSTAFA, MAHER, ABDELMOEZ, 2013). Além disso, é um método especialmente útil quando o triglicerídeo que serviria de reagente para a hidrólise ou glicerólise não é encontrado facilmente na natureza.

Visto que o glicerol é um subproduto de diversos processos, como da produção de biodiesel, da hidrólise, saponificação e transesterificação de óleos e gorduras, e da fermentação das leveduras, existe, atualmente, um excesso de oferta deste composto. Esta alteração da dinâmica de oferta e demanda resultou em uma redução de custo significativa do glicerol, situação que o torna uma escolha vantajosa em processos nos quais pode ser utilizado, como a glicerólise e a esterificação direta (CHAKRABORTY, MANDAL, 2015). Adicionalmente, a esterificação direta pode utilizar, quando disponíveis, ácidos graxos obtidos como subprodutos dos processos de desodorização de óleos vegetais (HAMERSKI, 2013).

A reação de esterificação é, basicamente, o inverso da reação de hidrólise (Figura 3). O equilíbrio entre a reação direta e inversa é usualmente feito pelo controle do conteúdo de água do meio reacional (COSTA, 2010).

Convencionalmente, a esterificação direta é conduzida em temperaturas mais baixas do que a glicerólise (entre 89°C e 120°C) e com a utilização de catalisadores homogêneos ácidos, que podem ser ácidos fortes orgânicos ou inorgânicos. Tradicionalmente, o ácido sulfúrico, o ácido fosfórico e o ácido sulfônico são os mais utilizados neste processo (HOO, ABDULLAH, 2014). Estima-se que aproximadamente 80% dos processos de manufatura utilizem catalisadores ácidos (MOSTAFA, MAHER, ABDELMOEZ, 2013).

Os catalisadores ácidos apresentam, entretanto, problemas inerentes como corrosão, difícil reciclagem, promoção de reações secundárias e geração de efluentes ácidos (KOTWAL, DESHPANDE, SRINIVAS, 2011). Ademais, o produto gerado nesta reação é, geralmente, uma mistura de mono-, di- e triglicerídeos, sais e outros subprodutos, além dos catalisadores ácidos utilizados. Desta maneira, etapas dispendiosas de destilação, neutralização e descoloração são normalmente necessárias (HOO, ABDULLAH, 2014).

Outro inconveniente desta reação é que a seletividade para MAG é extremamente baixa, dado que os catalisadores ácidos facilitam a degradação do MAG a partir de reações com o ácido graxo (oxidação ou dimerização) ou com o glicerol (polimerização, desidratação em acroleína e oxidação) (COSTA, 2010).

Devido a estas questões associadas aos catalisadores ácidos, esforços têm se voltado para a utilização de outros compostos sólidos como catalisadores. Entre os compostos estudados encontram-se sais de estanho, titanatos orgânicos, sílica-gel, resinas de troca iônica, materiais mesoporosos funcionalizados e peneiras moleculares zeolíticas (KOTWAL, DESHPANDE, SRINIVAS, 2011; RAJENDRAN; PALANISAMY, THANGAVELU, 2009). Entretanto, limitações do tamanho dos poros, diminuição da atividade na presença do subproduto água e a formação de produtos indesejados com o glicerol são alguns dos problemas apresentados por esses catalisadores (KOTWAL, DESHPANDE, SRINIVAS, 2011).

1.2.4. Alternativa enzimática

A exigência crescente de implantação de processos e tecnologias menos impactantes para o meio ambiente resultou em um aumento do interesse acadêmico e industrial no desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis para diversos processos.

Desta maneira, como alternativa ao processo convencional e com o objetivo de atender legislações referentes ao controle ambiental, é interessante substituir a síntese química por reações enzimáticas (BASTOS, 2013; PAPPALARDO, et al, 2017).

A utilização de enzimas como biocatalisadores em reações químicas pode ser, dependendo da enzima e das condições empregadas, superior aos métodos tradicionais devido à sua capacidade de catalisar os processos químicos mais complexos em condições ambientais e experimentais amenas (BASTOS, 2013). Além disso, a especificidade e seletividade típicas das enzimas proporcionam produtos de qualidade, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (MORE, WAGHMARE, GOGATE, 2017).

Contudo, as enzimas também possuem características que podem prejudicar sua aplicação industrial: são geralmente instáveis, podem ser inibidas fortemente por substratos e produtos; sua recuperação do meio reacional pode ser difícil e funcionam adequadamente somente em substratos naturais e em condições fisiológicas. Entretanto, a característica que provavelmente mais limita a aplicação em escala industrial é o seu alto preço (BASTOS, 2013; CHOI, HAN, KIM, 2015; ZHAO et al, 2017).

Técnicas de imobilização são frequentemente aplicadas para tentar reduzir estes problemas, pois facilitam a reutilização e podem aumentar a estabilidade e eficiência enzimáticas (KAEWTHONG et al., 2005).

1.3. Esterificação direta catalisada por lipase

Nas últimas décadas, o uso de lipases em reações de esterificação emergiu como uma possível substituição às abordagens químicas tradicionalmente utilizadas (LANGONE, SANT'ANNA, 1999). Este fato deve-se não somente às vantagens em

relação aos parâmetros reacionais e às qualidades inerentes às enzimas, como também a uma especial versatilidade apresentada pelas lipases, que possuem um amplo espectro de substratos e uma alta estabilidade a condições extremas de reação (FREITAS et al., 2007; GOFFERJÉ et al., 2014).

1.3.1. Lipases

As lipases são enzimas (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) que catalisam reversivelmente, em condições naturais, a hidrólise de triacilgliceróis, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essas enzimas são distintas de outras esterases, pois atuam de forma única em substratos insolúveis em água, pois são capazes de agir na interface óleo-água ou água-óleo de soluções emulsionadas (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008).

As lipases são enzimas ubíquas encontradas nos tecidos de diversos micro-organismos, plantas e animais, possuindo papel fundamental no metabolismo e digestão (REIS et al., 2009; AMINI, 2017). Lipases isoladas de diferentes fontes podem possuir propriedades distintas, especialmente quando concerne à especificidade (de acordo com o tipo de substrato, tamanho da cadeia do ácido graxo, posição do ácido graxo no glicerol, entre outros aspectos), termoestabilidade e faixa de pH ótimo (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

No âmbito econômico e acadêmico há um interesse especial nas lipases microbianas devido à sua maior estabilidade, facilidade de manipulação genética, ausência de flutuações sazonais de abastecimento e rápido crescimento dos micro-organismos em meios de cultura de baixo custo (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Atualmente, a maioria das enzimas microbianas é obtida industrialmente por meio de fermentação aeróbia por cultura submersa, que permite um melhor controle das condições de crescimento em relação à fermentação em meios sólidos (HASAN, SHAH, HAMEED, 2006).

Os fungos são especialmente valorizados, pois as enzimas produzidas por eles são normalmente extracelulares, facilitando a recuperação delas do meio de cultura.

Além disso, a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (COSTA, 2010).

As lipases têm aplicação em diversos segmentos, tais como nas indústrias de detergente, alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica (HOUDE, KADEMI, LEBLANC, 2004). A diversidade de aplicações deriva, parcialmente, da ampla disponibilidade comercial dessas enzimas. A Tabela 1 resume as principais lipases microbianas comercialmente disponíveis e seus fabricantes (SHU et al., 2010).

Tabela 1- Enzimas microbianas comerciais.

Fabricante	Fontes de lipases microbianas comerciais
Novozymes	<i>Thermomyces lanuginosus</i> ; <i>Candida antarctica</i> B; <i>Rhizomucor miehei</i> ; <i>Candida antarctica</i> A; <i>Humicola lanuginosa</i>
Genencor	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> ; <i>Pseudomonas mendocina</i>
Amano.	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Candida rugosa</i> ; <i>Penicillium Roqueforti</i> ; <i>Penicillium camemberti</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Rhizopus oryzae</i> ; <i>Mucor javanicus</i> ; <i>Rhizomucor miehei</i>

Fonte: SHU et al (2010)

A versatilidade catalítica é uma das características mais marcantes das lipases, tornando-as muito importantes na síntese orgânica. Conforme esquema da Figura 4, as lipases são capazes de catalisar não somente a hidrólise e a esterificação, como também outras reações, como a interesterificação, alcoólise, acidólise e a aminólise (RAJENDRAN; PALANISAMY, THANGAVELU, 2009; MIRANDA, MIRANDA, SOUZA, 2015).

Dado que a hidrólise é uma reação de equilíbrio, as lipases terão ação hidrolítica ou esterificante em função das condições da reação. Na presença de água, o equilíbrio é deslocado no sentido da hidrólise. Por sua vez, para favorecer a esterificação de ácidos graxos e glicerol é necessário que haja pouca água no meio reacional (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008).

Figura 4. Outras reações catalisadas por lipases.

Interesterificação

Alcoólise

Acidólise

Aminólise

Fonte: Elaborado pela autora

Embora uma condição quase anidra seja necessária para a obtenção de bons rendimentos na esterificação, a presença de traços de água é essencial para manter a conformação correta da enzima e, portanto, essencial para a manutenção da atividade catalítica (KOTTING, EIBL, 1994).

O amplo uso das lipases também pode ser atribuído a outras qualidades dessas enzimas. Como hidrolases, elas não necessitam de cofator, fato que permite que sejam dissolvidas na interface óleo-água em condições ambientes. As lipases apresentam graus variados de especificidade, sendo que algumas delas podem ser regio-, quimo-

e/ou enantiosseletivas e podem agir em um amplo espectro de temperaturas (HOUDE, KADEMI, LEBLANC, 2004). Não obstante, o alto custo e dificuldade de reutilização dessas enzimas podem ser fatores limitantes para a sua utilização (KOTWAL, DESHPANDE, SRINIVAS, 2011).

1.3.2. Imobilização enzimática

Entende-se por enzima imobilizada, aquela física e/ou quimicamente associada a um suporte, usualmente sólido, insolúvel em água, inerte e não essencial para atividade catalítica da enzima (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008). A imobilização pode significar, portanto, que a enzima está confinada em determinado espaço ou que está ligada a carreadores sólidos ou, ainda, que as enzimas estão ligadas entre si (iguais ou distintas). Qualquer uma dessas opções deve ser capaz de reduzir a mobilidade enzimática enquanto retém ou aumenta a atividade catalítica (HARTMEIER, 1988).

Na catálise homogênea, na qual o substrato e enzima estão presentes em uma solução homogênea, pode ser difícil ou mesmo impossível separar os biocatalisadores dos produtos resultantes da bioconversão (HARTMEIER, 1988). Adicionalmente, enzimas não imobilizadas podem ser inibidas por substratos e/ou produtos, ser pouco estáveis e apresentar baixa atividade catalítica em reações que envolvem componentes não fisiológicos (SKORONSKI et al., 2014).

A imobilização torna possível a catálise heterogênea, a qual permite separar com mais facilidade o biocatalisador ao fim da reação. A redução de custos associada à reutilização da enzima é o principal objetivo da técnica de imobilização. Dependendo do caso podem existir outros benefícios como o aumento da estabilidade, da atividade catalítica e da seletividade e a diminuição da inibição (RODRIGUES, FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). A Tabela 2 resume as principais vantagens e desvantagens associadas à imobilização enzimática.

Tabela 2- Vantagens e desvantagens associadas à técnica de imobilização.

Vantagens	Desvantagens
Desenvolvimento de sistemas contínuos	Custo adicional de suporte, reagentes e de operação de imobilização
Flexibilidade no projeto de reatores	Perdas de atividade durante a imobilização
Efluentes livres de catalisadores	Técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alto peso molecular
Maior versatilidade na etapa de separação	Possíveis restrições difusionais

Fonte: Coelho, Salgado e Ribeiro (2008).

A escolha de utilizar ou não este recurso dependerá da reação e dos catalisadores envolvidos. Se a enzima possui baixo custo, por exemplo, o uso da imobilização oferecerá menores possibilidades de desenvolvimento comercial frente a uma técnica convencional com enzima livre em solução (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008).

As enzimas imobilizadas são classificadas de acordo com o método de imobilização (Figura 5). Esta classificação abrange as mais usuais formas de imobilização de biocatalisadores, ainda que não englobe todas. Metodologias que combinam as técnicas clássicas de imobilização são frequentemente desenvolvidas, por exemplo. Desta maneira, frequentemente são encontradas na literatura outras classificações (HARTMEIER, 1988).

Existem diversos tipos de suporte, que podem diferir em vários aspectos. Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, sintéticos ou naturais, e possuir graus de porosidade variados, entre outras características. Além de ter baixo custo, o suporte ideal deve possuir algumas qualidades como inércia, estabilidade, regenerabilidade e habilidade de aumentar a atividade/especificidade enzimática e de reduzir inibições e

contaminações microbianas. Desta maneira, a escolha do suporte dependerá essencialmente da reação a ser realizada (DATTA, CHRISTENA, RAJARAM, 2013).

Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas

. Fonte: Adaptado de Drioli e Giorno (1999) e Coelho, Salgado e Ribeiro (2008).

Em tese, todas as técnicas demonstradas na Figura 5 podem ser aplicadas para a imobilização de lipases (UHLIG, 1998). Contudo, a técnica mais utilizada é a de adsorção, a qual apresenta baixo custo e poucos efeitos deletérios para a atividade e seletividade enzimática (MENONCIN et al., 2009).

O princípio da técnica de adsorção é bastante simples quando comparado a outros métodos. Neste processo, a enzima é ligada ao suporte através de ligações não covalentes, tais como interações hidrofóbicas, ligações iônicas, entre outras (VITOLO, 2015, VOLPATO, 2009).

A adsorção por interação eletrostática e/ou iônica está sujeita a diversas variáveis experimentais, como pH, temperatura, força iônica e concentrações da enzima e do agente adsorvente, devendo estas condições serem rigorosamente controladas (TOMOTANI, VITOLO, 2006).

Entre os diversos tipos de suporte para este tipo de imobilização encontram-se as bentonites, cerâmica porosa, alumina e resinas de troca iônica, materiais considerados baratos, abundantes, mecanicamente resistentes, quimicamente estáveis, atóxicos, não poluentes e facilmente regeneráveis. Além disso, estes suportes possuem densidade adequada para serem compactados em reatores do tipo coluna ou para ficarem em suspensão na solução, como ocorre em reator operado em regime descontínuo, descontínuo-alimentado e contínuo com agitação. (TOMOTANI, VITOLO, 2006).

Neste trabalho, propõe-se não somente a utilização de lipase imobilizada disponível comercialmente (Lipozyme[®] RM IM), como também o uso de lipase imobilizada no laboratório, com o objetivo de obter menores custos relacionados ao processo. Para tal, a enzima livre foi adsorvida em DOWEX[®], uma resina de troca iônica.

1.3.3. Lipase de *Rhizomucor miehei*

A lipase extracelular produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei* (RML) foi primeiramente descrita em 1973 e tem sido estudada em diversos trabalhos acadêmicos, uma vez que foi a primeira lipase a ter a estrutura definida com resolução de 1,9 Å e por seu mecanismo de ativação interfacial ser bem conhecido (RODRIGUES, FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A RML é uma lipase regioespecífica para as posições 1 e 3 da molécula de glicerol, capaz de clivar glicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeias curtas e longas (UHLIG, 1998).

Comercializada pela empresa Novozymes, a enzima está disponível na forma livre (Palatase[®] 20000L) ou imobilizada (Lipozyme[®] RM IM). O pH ótimo para ambas as formas de RML é de 7 a 10 e a temperatura ótima varia de 30 a 50°C (NOVOZYMES, 2015).

O suporte para a enzima imobilizada, Duolite ES 562, é uma resina de troca aniônica fraca, formada basicamente de copolímeros de fenol-formaldeído. A maioria

dos requerimentos para uma imobilização adequada, já citados neste presente trabalho, é atendida por este suporte (SKORONSKI et al., 2014).

1.3.4. Meio reacional

A catálise enzimática em solventes orgânicos tem sido extensivamente estudada para a hidrólise de gorduras, interesterificação e para a síntese de ésteres, peptídeos e compostos opticamente ativos. Enzimas livres ou imobilizadas são utilizadas em sistema de duas fases, sistema de fase reversa ou sistema com micelas invertidas (KIM, RHEE, 1991). Em pesquisas acadêmicas, as reações de esterificação enzimática foram majoritariamente realizadas em solventes como hexano, heptano ou terc-butanol (GOFFERJÉ et al., 2014).

O uso de solventes orgânicos é justificado pela baixa solubilidade e estabilidade que a maioria dos compostos com mais de quatro átomos de carbono apresentam em água. Adicionalmente, a remoção da água pode ser um processo mais demorado e dispendioso do que a remoção de solventes orgânicos, que possuem ponto de ebulição mais baixo (GOTOR-FERNÁNDEZ, BRIEVA, GOTOR, 2006).

Embora a maioria das sínteses com lipase seja conduzida em solventes orgânicos, diversos trabalhos acadêmicos descrevem a realização da esterificação enzimática apenas com a presença da lipase imobilizada e dos substratos (LANGONE, SANT'ANNA, 1999).

O sistema livre de solventes (SLS) evita problemas de toxicidade e inflamabilidade decorrente dos solventes orgânicos, resultando em um processo mais seguro e ambientalmente amigável. Adicionalmente, a ausência de solventes resulta em menos etapas de separação e purificação, diminuindo os custos relacionados ao processo. Ainda, a produtividade volumétrica é maior, uma vez que não há solventes ocupando espaço no reator (FREITAS et al., 2007).

1.3.5. Condições reacionais

As condições reacionais aplicadas em estudos de esterificação enzimática em SLS são diversas. Em geral, os parâmetros variados pelos autores são temperatura, tempo reacional e proporção entre os reagentes.

Hu, Chen e Xia (2013) investigaram a influência de parâmetros reacionais na obtenção de dicaprilinas em sistema descontínuo. Os autores concluíram que a condução da reação utilizando agitador magnético foi mais eficiente do que uso de um banho termostático agitado, uma vez que o primeiro método ofereceu uma maior interface de contato entre os reagentes. A proporção de lipase (Novozym 435, de *Candida antarctica*) e a agitação foram fixados em 4% da massa total e 450 rpm, respectivamente. A temperatura ótima da reação foi de 60°C, obtendo uma taxa de conversão de ácido caprílico de 94,42%. A razão entre o ácido caprílico e o glicerol foi estequiométrica para a obtenção de dicaprilinas (2:1). Segundo os autores, embora uma quantidade maior de ácido caprílico tenha aumentado a formação de DAG, uma quantidade extra do ácido graxo pode causar inativação enzimática, afetando a reutilização da enzima. O tempo reacional de 6 horas foi suficiente para praticamente alcançar o rendimento total, sendo que a reação foi finalizada com o tempo de 10h.

Em um trabalho sobre a obtenção enzimática de 1,3-diacilgliceróis simétricos através da esterificação direta com glicerol em SLS, Rosu, Yasui, Iwasaki e Yamane (1999) obtiveram um rendimento máximo de 98% em dicaprilinas. A lipase imobilizada Lipozyme RM IM foi fixada em 4% da massa e a agitação em 300rpm. Os maiores rendimentos de DAG foram alcançados com temperaturas entre 25 e 35°C, sendo o tempo de 6 a 8 horas suficiente para alcançar um rendimento satisfatório. O rendimento máximo de DAG foi obtido com a proporção molar entre ácido caprílico e glicerol de 4:1. Quantidades insignificantes de MAG e TAG foram obtidas.

Neste mesmo estudo foi avaliado o efeito da proporção enzimática na conversão inicial (período de 15 minutos) de ácido caprílico. Foi observado que, quanto maior a proporção enzimática, maior a velocidade de obtenção de 1,3-DAG simétricos, provavelmente devido à redução do efeito da migração acil.

Langone e Sant'Anna (1999) estudaram a síntese enzimática de triglicerídeos de cadeia média em SLS. Embora um rendimento satisfatório em tricaprilina não tenha sido alcançado, observou-se que a 60°C, com uma concentração enzimática de 9% e razão molar entre ácido caprílico e glicerol de 1:1, ocorreu o maior consumo de ácido

caprílico. Os rendimentos em monocaprilina e dicaprilina foram de 61% e 20%, respectivamente.

A maioria das esterificações enzimáticas requer um longo período de tempo para a obtenção de rendimentos adequados. Visando contornar esta questão, Wan et al. (2012) estudaram a síntese enzimática de caprilinas em SLS, utilizando um reator de coluna de fluxo ascendente, alcançando uma conversão de ácido caprílico de 90,1% após 4 horas de reação. Para fins comparativos, os autores conduziram a mesma reação em batelada, em condições semelhantes, obtendo um rendimento de 88% após 9 horas de reação.

Mais recentemente, More, Waghmare e Gogate (2017) aplicaram um tratamento ultrassônico nos estágios iniciais da reação, visando intensificar a obtenção de tricaprilina catalisada por lipase. Os autores concluíram que, com um rendimento máximo em tricaprilina de 94,8% após 7 horas de reação, o tratamento influenciou de maneira substancial a velocidade e o rendimento reacionais.

1.4. Identificação e quantificação de lipídeos

1.4.1. Técnicas cromatográficas

A complexidade natural dos lipídeos requer métodos relevantes para sua análise. Técnicas adequadas para separação, identificação e quantificação de lipídeos são essenciais e dentro das metodologias existentes, a cromatografia é de suma importância (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2005).

Entre as técnicas cromatográficas mais empregadas na análise de lipídeos encontram-se a cromatografia a gás (CG), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em camada delgada (CCD). O princípio comum que as envolve é a diferença de afinidade que diferentes moléculas apresentam pelas fases estacionária e móvel. (NICHOLS, 2002; HINRICHSEN, STEINHART, 2006). A Tabela 3 contém os princípios básicos de cada uma destas técnicas (FUCKS et al., 2011). A cromatografia em camada delgada será revisada mais detalhadamente ao longo deste projeto.

Tabela 3- Princípios e características relevantes das principais técnicas cromatográficas.

Técnica	Princípios e características relevantes
CCD	Separação ocorre em uma fase estacionária, normalmente sílica gel, devido a diferenças de polaridade entre os analitos. Frequentemente é utilizada como método inicial quando misturas mais complexas de lipídeos precisam ser separadas.
CLAE	Separação ocorre em uma fase estacionária em alta pressão através da eluição de diversos solventes. A detecção de lipídeos saturados pode ser difícil devido à falta de regiões na molécula que absorvam UV.
CG	Separação de compostos voláteis através do arraste deles com gás inerte. Compostos diferentes possuirão distintos tempos de retenção na fase estacionária. Como só compostos voláteis podem ser analisados, muitas vezes é necessária a derivatização da amostra.

Fonte: Fucks et al.(2011).

A cromatografia em camada delgada fornece resultados menos precisos que a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HINRICHSSEN, STEINHART, 2006). Este é provavelmente um dos principais motivos para a aparente obsolescência da técnica (FUCKS et al., 2011).

Entretanto, dois avanços foram essenciais para a manutenção da cromatografia de camada delgada e da sua versão de alta eficiência CCDAE (versão que possui partículas menores na fase estacionária, resultando em melhor qualidade de separação) como ferramentas indispensáveis para a química analítica. Primeiramente, ocorreu uma crescente disponibilidade comercial de placas de CCD pré-revestidas, fato que aumentou significativamente a reprodutibilidade em comparação às montagens manuais do aparato. Além disso, a disponibilidade e a variedade de materiais adsorventes para a fase estacionária também aumentaram, oferecendo mais recursos para a realização de separações mais eficientes (FUCKS et al., 2011).

Além disso, a CCD é uma ferramenta rápida, de fácil realização e que possui baixo custo, em relação às outras técnicas cromatográficas. A CCD permite, ainda, que sejam realizadas medições quantitativas diretamente na placa, através do uso de densitometria (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2005), técnica cujas manchas são geradas por reagentes aplicados sobre os lipídeos. As manchas podem ser lidas e transformadas em picos proporcionais à quantidade original do composto (SHAHIDI, WANASUNDARA, 2002). Atualmente, avanços computacionais diminuíram custos para a obtenção desta análise quantitativa: o densímetro foi substituído por um computador pessoal com um escâner e um *software* adequado (HINRICHSEN, STEINHART, 2006).

Algumas desvantagens relacionadas à CG e à CLAE podem, também, influenciar na escolha pela CCD. Apesar de apresentar alta sensibilidade e resolução, além de necessitar de pouquíssima amostra, a cromatografia gasosa é uma técnica complexa e com elevado custo de instalação e manutenção. As amostras devem ser voláteis e estáveis termicamente, caso contrário estas precisam ser derivatizadas (SANTOS, 2013).

A cromatografia líquida de alta eficiência oferece separações de alta qualidade e seu acoplamento com a espectrometria de massas (EM) é bem estabelecido. Entretanto, é uma técnica mais demorada e que utiliza volumes maiores de solventes que o CCD. Este último fato torna a cromatografia em camada delgada mais barata em relação aos elementos consumíveis e menos prejudicial para o meio ambiente (FUCKS et al., 2011).

Em projetos de pesquisa nos quais inúmeras análises qualitativas e quantitativas são necessárias, o CCD pode ser uma ferramenta de triagem que fornece resultados precisos, econômicos e rápidos, adiando a aplicação de técnicas mais caras e complexas para as etapas finais do trabalho. A cromatografia em camada delgada pode e deve, portanto, ser considerada para uso em laboratórios de pesquisa e indústrias.

1.4.2. Aspectos da cromatografia em camada delgada

A CCD é uma técnica de separação na qual os componentes de uma mistura lipídica são diferencialmente distribuídos entre uma fase sólida estacionária, presente sob a forma de uma camada fina disposta sobre um suporte constituído de material inerte, e uma fase móvel (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2005).

Uma pequena quantidade da mistura de lipídeos a ser separada é aplicada a 1,5-2,0 cm do fundo do suporte. A placa é colocada então em uma câmara ou recipiente que contém o solvente ou mistura de solventes escolhidos para a corrida. O solvente move-se pra cima devido à ação capilar, carregando os diferentes lipídeos a distâncias distintas, dependendo da polaridade destes. Quando o solvente se aproxima do topo da placa, esta é retirada e seca naturalmente ou por métodos artificiais. A detecção dos lipídeos pode ser realizada através de reagentes que criam uma mancha sobre a placa (SHAHIDI, WANASUNDARA, 2002). Diferentes reagentes para revelação estão disponíveis atualmente, podendo ser escolhidos de acordo com sua especificidade e pelo fato de serem destrutivos ou não (FUCKS et al., 2011).

A identificação dos lipídeos de interesse é realizada pela comparação do valor R_f do lipídeo investigado com o R_f de um padrão. O valor R_f é basicamente a distância percorrida pela substância dividida pela distância total percorrida pelo solvente. Desta maneira, quanto menor o R_f , mais afinidade a substância apresenta pela fase estacionária, e por isso, mais rapidamente ela é retida. Em alguns casos, é preciso suplementar as amostras com os padrões, a fim de obter melhores resultados (HINRICHSSEN, STEINHART, 2006).

A quantificação das manchas pode ser realizada através da densitometria, já mencionada anteriormente, ou ainda, se métodos de revelação não destrutivos forem usados, os lipídeos podem ser recuperados através da raspagem da mancha. Em seguida, os lipídeos podem ser extraídos com solventes adequados e quantificados por gravimetria, espectrofotometria ou por cromatografia gasosa (SHAHIDI, WANASUNDARA, 2002).

Diversos autores tiveram sucesso na identificação e/ou quantificação de glicerídeos utilizando uma dessas duas técnicas. Yang et al. (2004) conseguiram

identificar triglicerídeos resultantes da glicerólise de nata do leite, depois de corrida em CCD, saponificação e metilação das moléculas de TAG e aplicação das amostras em GC. Severino (2014) utilizou a mesma metodologia para a análise de triglicerídeos estruturados feitos a partir de tripalmitina e de óleo de semente de uva. Sek, Porter e Charman (2001), por sua vez, quantificaram glicerídeos de cadeia média e longa, após corrida em CCDAE, com densitometria *in situ*.

A aplicação das amostras é normalmente realizada manualmente com o auxílio de uma seringa de vidro. Atualmente, há ferramentas comercialmente disponíveis que possibilitam aplicar as amostras com mais precisão, levando a melhores resultados em termos de reprodutibilidade e acurácia. No entanto, estas ferramentas possuem alto custo, fato que compromete a economia da CCD (HINRICHSSEN, STEINHART, 2006).

1.4.3. Cromatografia de camada delgada na análise de glicerídeos

Lipídeos simples como o colesterol e seus ésteres, ácidos graxos livres, MAGs, DAGs e TAGs são geralmente separados em placas de sílica-gel, que podem conter agentes ligantes conectando o material adsorvente de maneira uniforme em uma placa de vidro ou alumínio. (INDRASENA, 2006; NICHOLS, 2002). Alumina e kieselguhr (diatomito) também são utilizadas como fase estacionária. Em alguns casos, para aprimorar a separação, os adsorventes podem ser modificados a partir da impregnação com outras substâncias (SHAHIDI, WANASUNDARA, 2002).

Na separação de acilgliceróis, entre as modificações mais comuns de fase estacionária, está a impregnação da sílica-gel com ácido bórico (H_3BO_3). O objetivo desta modificação é prevenir a isomerização de 1(3) e (2) monoacilgliceróis e de (1,2) e (1,3) diacilgliceróis, permitindo uma separação mais adequada das formas isoméricas (FUCKS et al., 2011). Thomas, Scharoun e Ralston (1965) foram os primeiros autores a obterem uma separação satisfatória de monoglicerídeos isoméricos utilizando este sistema, até então empregado para a separação de carboidratos.

Existem diversos sistemas de solventes para a separação de uma ampla gama de componentes lipídicos. O solvente ou mistura de solventes mais adequados devem ser escolhidos cuidadosamente para a finalidade desejada. Em alguns casos,

uma única corrida é suficiente para uma separação adequada. Em outros, torna-se necessário realizar corridas múltiplas com diferentes sistemas de solventes para obtenção de maior resolução (INDRASENA, 2006).

Fases móveis constituídas por hexano ou éter de petróleo como componentes principais e acetona e éter etílico como agentes polares modificantes são frequentemente utilizados para a separação de lipídeos simples. Os ácidos acético e o fórmico são frequentemente adicionados para manter os ácidos graxos livres na sua forma completamente protonada. Considerando que a sílica gel é polar e o sistema de solventes tem natureza apolar, os glicerídeos são retidos na seguinte ordem, do mais polar (menor R_f) para o mais apolar (maior R_f): MAG, DAG, ácidos graxos livres e TAG. Caso não haja ácido presente na fase móvel, os ácidos graxos livres ficam em uma posição intermediária aos MAG e DAG (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2005)

Vários sistemas de solventes, com corrida única ou múltipla, foram aplicados por diversos autores. A Tabela 4 mostra alguns sistemas de solventes já testados e que possuem potencial de aplicação para separação de ácidos graxos de cadeia média.

Os métodos de detecção utilizados variam de acordo com a necessidade ou não de quantificação e se essa quantificação será realizada a partir da recuperação da amostra ou *in situ*. Há reagentes não destrutivos, como a 2',7'-diclorofluoresceína ou o iodo, e reagentes destrutivos, como a tradicional solução alcoólica a 50% de ácido sulfúrico. Este último método é particularmente interessante para a quantificação com densitometria, porque após a solução ser borrifada sobre a placa e esta ser aquecida a 180-220°C, ocorre o surgimento de manchas pretas intensas que contrastam consideravelmente com a placa. (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2005; FUCKS et al., 2011).

Tabela 4- Sistemas de solventes utilizados para separação de glicerídeos em CCD ou CCDAE

Referência	Corrida	Solvente(s)	% (v/v)	Observações
Sek, Porter e Charman, 2001	1	Hexano	100	Quatro corridas foram necessárias para separação de caprilinas realizada por CCDAE. Foi alcançada separação adequada de ácidos graxos livres, MAG, DAG e TAG. Não ocorreu separação de isômeros 1(3) e (2) MAG e de (1,2) e (1,3) DAG.
	2	Metanol-água (97:3, v/v) /Clorofórmio	15:85	
	3	Éter etílico/ hexano	90:10	
	4	Éter etílico/ hexano	35:65	
Thomas, Scharoun e Ralston, 1965	1	Clorofórmio/acetona	96:4	Separação de glicerídeos através de CCD realizada com placa de sílica-gel com ácido bórico incorporado. Ocorreu separação de isômeros 1(3) e (2) MAG e de (1,2) e (1,3) DAG
Nikolova - Damyanova, 2005	1	Hexano/éter etílico/ ácido acético	80:20:2	Ocorreu separação de ácidos graxos livres, MAG, DAG e TAG. Ocorreu a separação (1,2) e (1,3) DAG
Fucks et al, 2011	1	Hexano/éter etílico/ ácido acético	70:30:1	Antes da corrida, devem ser realizadas duas corridas prévias com éter etílico até 3,0cm para permitir a migração dos MAG da origem. Ocorreu uma boa separação de ácidos graxos livres, MAG, DAG e TAG. Ocorreu a separação (1,2) e (1,3) DAG.

2. JUSTIFICATIVA

A natureza biodegradável e atóxica dos glicerídeos somada à sua capacidade emulsionante os tornam aplicáveis em diversos segmentos e justificam o crescente interesse científico em aprimorar o processo de obtenção destes compostos.

Preterir vias químicas de obtenção em favorecimento das vias enzimáticas é uma escolha inteligente e de tendência crescente na biotecnologia. Enzimas permitem planejar o processo de forma a obter produtos mais específicos, gerando menos subprodutos e resíduos. Além disso, permitem operar em condições de reação mais brandas, reduzindo custos e impactos ambientais.

Embora haja considerável quantidade de material acadêmico relacionado à obtenção enzimática de glicerídeos de cadeia longa, o mesmo não ocorre com os de cadeia curta, constituídos por ácidos graxos de doze carbonos ou menos.

No que concerne às caprilinas, este fenômeno pode ser facilmente observado. Existe, ainda, uma defasagem de pesquisas sobre possíveis aplicações terapêuticas destes compostos e no desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação rápidos e práticos.

A menor disponibilidade na natureza das caprilinas, quando comparada aos glicerídeos de cadeia longa, pode ser parcialmente responsável por este baixo interesse científico e industrial. A obtenção de tricaprilina, disponível em fontes específicas como o leite de alguns mamíferos e o óleo de coco, exige diversas etapas de extração, isolamento e purificação, que podem desencorajar o seu uso como matéria-prima em reações como a hidrólise e glicerólise.

Este trabalho foi concebido, planejado e executado considerando os pontos acima e buscando amenizar algumas das questões relacionadas.

3. OBJETIVO(S)

Sintetizar caprilinas através da esterificação do glicerol com ácido caprílico em reator operado em regime descontínuo ou descontínuo-alimentado. Desenvolver metodologia de separação, identificação e quantificação para caprilinas.

3.1. Objetivos específicos

- a) Operar o reator em regime descontínuo convencional, utilizando enzimas imobilizadas (versão comercial e versão imobilizada em laboratório), visando determinar as condições reacionais que resultem em melhores rendimentos;
- b) Operar o reator em regime descontínuo convencional visando determinar a cinética da reação com a enzima imobilizada comercial;
- c) Imobilizar a lipase por adsorção em resinas de troca iônica (tipo DOWEX[®]);
- d) Determinar as constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$ da Lipozyme[®]RM IM e da enzima imobilizada em DOWEX[®];
- e) Operar o reator em regime descontínuo-alimentado, visando fixar as condições relacionadas com a obtenção preferencial de monocaprilina, dicaprilina ou tricaprilina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Para a elaboração das curvas-padrão foram utilizados:

- Dosagem de proteína solúvel: albumina bovina fração V. Segundo Cohn (INLAB, código 1870);
- Dosagem de glicerol: glicerol (Fluka, pureza $\geq 98\%$);
- Dosagem do ácido caprílico residual: ácido octanóico (SIGMA[®], pureza $\geq 98\%$);
- Atividade lipolítica: *p*-nitrofenol (SIGMA[®], código 1048);
- Determinação do ácido caprílico e caprilinas por CCD: ácido octanóico (SIGMA[®], pureza $\geq 98\%$), monocaprilina (TCI, pureza $\geq 98\%$); dicaprilina (AccuStandard[®], código (GS-002N) e tricaprilina (TCI, pureza $\geq 93\%$). Foram utilizadas placas de sílica-gel sem indicador fluorescente da SIGMA[®] (código 995700-25EA).

A resinas aniônicas (1X2:100-400; 1X4:50-400; 1X8:50-400; 2X8:100-400), adquiridas da Dow Chemical[®], foram utilizadas para imobilizar as seguintes proteínas:

- Albumina bovina fração V. Segundo Cohn (INLAB, código 1870);
- Albumina bovina livre de ácidos graxos (INLAB, código 1873);
- Lipase microbiana solúvel Palatase[®]20000L (Novozymes[®], código L4277);
- Lipase microbiana em pó (SIGMA[®], código: 62298; *Rhizomucor miehei*).

A determinação da atividade lipolítica foi realizada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (SIGMA[®], código N2752). Adicionalmente, foram utilizados: Triton X-100 (código T9284), deoxicolato de sódio (código D5670) e goma arábica (código G9752), todos fabricados pela SIGMA[®].

Para as reações de esterificação foram utilizados glicerol e ácido caprílico (pureza $\geq 98\%$), (Fluka) como substratos para a produção de mono-, di- e triacilglicerois. A lipase imobilizada Lipozyme[®]RM IM (Novozymes) foi utilizada como catalisador das reações de esterificação.

Todos os reagentes e solventes necessários para a realização dos experimentos são de grau analítico.

4.2. Procedimentos analíticos

4.2.1. Dosagem de proteína solúvel

A curva padrão de dosagem de proteína solúvel foi elaborada de acordo com método preconizado por Segel (1979) e adaptado por Tomotani e Vitolo (2006), no qual é utilizada a diferença de absorção no ultravioleta a 215 e 225nm para soluções de albumina bovina em água destilada, com concentrações que variam de 10 a 100µg/ mL.

4.2.2. Dosagem do glicerol

A curva padrão de dosagem do glicerol foi elaborada através da adaptação do método enzimático com detecção colorimétrica descrito por Valdez et al. (2012).

Em tubos Eppendorf foram adicionadas de 20-100µL de solução de glicerol 0,68mmol.L⁻¹ e adicionou-se água destilada até se completar o volume de 1mL. O teor de glicerol adicionado variou de 1,25 a 6,26µg. Em seguida, adicionou-se 1mL da mistura reagente* do kit enzimático da Bioclin[®] (Quibasa). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C por 10 min. A leitura a 500nm foi realizada imediatamente após a reação, dado que a cor desenvolvida é estável por apenas 30 minutos.

* O kit Bioclin[®] é constituído por: ATP, MgCl₂, glicerol-kinase, glicerol-3-fosfato oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol. O pH da solução é 7,0.

4.2.3. Dosagem do ácido caprílico residual

O rendimento das reações foi avaliado por meio do consumo do ácido caprílico inicialmente adicionado. Para dosagem do ácido caprílico residual, aproximadamente 0,5g do extrato orgânico concentrado descrito no item “4.9.” é adicionado a 10mL de etanol absoluto. O conteúdo é titulado com solução de NaOH 0,3M na presença de fenolftaleína (BHALLA et al, 2009).

A curva padrão foi elaborada a partir da titulação de 0,63 a 5,05 mmol de ácido caprílico, dissolvidos em 1mL de éter de petróleo e 10mL de etanol absoluto.

4.2.4. Atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica foi utilizado, com pequenas adaptações, o método colorimétrico simplificado por Gupta, Rathí e Gupta (2002) e modificado por Baron (2008). A determinação baseia-se na hidrólise enzimática do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), que resulta na liberação de *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, cuja concentração é determinada no espectrofotômetro a 410nm.

Neste método de determinação da atividade lipolítica são preparadas duas soluções:

Solução A: *p*NPP em isopropanol (concentração de 3mg.mL⁻¹).

Solução B: 11,11mL de Triton X-100, 0,55g de goma arábica e 1,11g de deoxicolato de sódio em 500mL de tampão fosfato 0,05M pH 7,0.

Desta maneira, a curva padrão foi elaborada diluindo-se *p*NP em 9mL da solução B e 1mL de isopropanol (sem a presença de *p*NPP), resultando em uma variação do teor de *p*NP de 0,025 µmol.mL⁻¹ a 150 µmol.mL⁻¹.

Os tubos foram deixados em banho-maria a 37°C antes da leitura da absorbância a 410nm.

4.2.5. Dosagem de ácido caprílico e caprilinas por CCD

Sobre placas de sílica-gel (20 x 20 cm; espessura = 0,25 mm) foram marcadas as linhas de partida e de chegada para o percurso da fase móvel, sendo de 14 cm a distância entre elas. Sobre a linha de partida foram dispostos em espaços regulares 10 µL de cada padrão, elaborados conforme Tabela 5.

Padrões de mesma concentração, mas referentes a compostos diferentes, foram aplicados sobre o mesmo ponto de partida na placa, uma vez que o sistema deve ser capaz de separar a mistura de produtos resultante de uma reação de esterificação entre ácido graxo e glicerol. Todos os pontos foram aplicados em duplicata.

Tabela 5- Concentrações das soluções utilizadas na análise de caprilinas e ácido caprílico por cromatografia em camada delgada.

Concentração (mg de acilglicerol/g de n-hexano)	Substância			
	Ácido Caprílico	Monocaprilina	Dicaprilina	Tricaprilina
10	+	-	+	+
15	+	-	+	+
20	+	+	+	+
25	+	+	+	+
30	+	+	+	+
35	+	+	+	+
40	-	+	+	+
45	+	+	+	+

Legenda: (+) padrão elaborado para a referida concentração/ (-) sem padrão para a referida concentração.

A fase móvel foi constituída por n-hexano, éter etílico e ácido acético na proporção 80:20:1(v/v/v). As placas com as amostras aplicadas foram colocadas em câmara de vidro hermética e retiradas após a fase móvel alcançar a linha de chegada. As placas foram deixadas a temperatura ambiente para secagem.

A revelação das placas foi realizada por imersão de cinco segundos na solução reveladora, constituída por: 1,5g de KMNO_4 , 10g de Na_2CO_3 , 1,25mL de NaOH 10% e 200mL de água destilada. As placas foram deixadas para secar a temperatura ambiente por dois dias, até atingirem um ponto no qual não houvesse mais mudanças visíveis no aspecto das manchas.

As placas foram, então, fotografadas com uma máquina digital, permitindo resolução mínima de 5.0 píxeis. As imagens foram analisadas no programa Just TLC[®] software 4.0.3 (2013). Considerações sobre a operacionalidade e limitações do *software* constam no apêndice B.

4.3. Imobilização da lipase (TOMOTANI, VITOLO, 2006)

As resinas foram lavadas previamente com água deionizada com pH ajustado para 6,5. As suspensões, compostas por 100mg da resina e 25 mL de água deionizada foram agitadas (120rpm) por 24h a 32°C. Em seguida, as resinas foram separadas por centrifugação (3500rpm/15min).

Foram preparadas soluções de cada proteína para posterior imobilização, de maneira que a concentração final em proteína fosse de aproximadamente 200 µg/mL. A concentração exata de cada solução foi determinada utilizando-se o procedimento de dosagem de proteína solúvel descrito neste trabalho.

A imobilização foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: A um erlenmeyer com capacidade de 125 mL foram adicionados 25 mL da solução de proteína (totalizando 5mg) e 100mg de resina (retirada do tubo de centrifugação com o auxílio de 25mL de água deionizada). O volume final de imobilização foi de 50 mL, resultando em uma concentração de proteína pré-imobilização de 100 µg/mL. A mistura foi mantida em agitação (150rpm) a 32°C por 4h.

Em seguida, a suspensão foi centrifugada (3500 rpm//15min), recolhendo-se o sobrenadante para análise da proteína residual.

4.4. Determinação da atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica foi aplicado o método previamente descrito no tópico “4.2.4” nas seguintes enzimas:

- Lipozyme[®] RM IM;
- Palatase 20000L
- Palatase 20000L imobilizada na resina aniônica 1x2-400 (P:1x2-400)
- Palatase 20000L imobilizada na resina aniônica 1x4-200 (P:1x4-200)

As enzimas imobilizadas no laboratório foram submetidas ao procedimento de imobilização descrito no tópico “4.3”. O sobrenadante foi recolhido para análise do teor de proteína residual e as resinas foram deixadas em estufa a 50°C, por uma hora, até a completa evaporação da água. O produto Lipozyme[®] RM IM foi umedecido e submetido ao mesmo processo de secagem.

Foram utilizadas as seguintes soluções para a realização do ensaio:

Solução A: pNPP em isopropanol (concentração de 3mg.mL^{-1}).

Solução B: 11,11mL de Triton X-100, 0,55g de goma arábica e 1,11g de deoxicolato de sódio em 500mL de tampão fosfato 0,05M pH 7,0.

Para as enzimas imobilizadas, foi aplicado o seguinte procedimento: Foram adicionados 1mL da solução A à 9mL da solução B, previamente aquecida a 37°C , resultando em uma concentração final de pNPP de $790\mu\text{M}$. A mistura foi colocada em banho-maria a 37°C , por exatos 5 minutos. Ao final deste tempo, foram adicionados 10mg da enzima. O sistema foi agitado com o auxílio de um agitador magnético por 3 minutos. Então, a agitação foi suspensa e a mistura foi deixada em repouso no banho-maria por 2 minutos para que ocorresse a precipitação da enzima imobilizada. O tempo total de reação foi, portanto, de cinco minutos. Ao se alcançar o tempo estipulado, 1mL do meio reacional foi recolhido para leitura da absorbância a 410nm.

O mesmo procedimento foi utilizado na determinação da atividade lipolítica para a Palatase[®], com a seguinte modificação: Foram adicionados 1mL da solução A à 8,9mL da solução B e a reação foi catalisada com a adição ao sistema de 0,1mL de uma solução 1:200 de Palatase[®] (feita em tampão fosfato 0,05M pH 7,0). A concentração proteica da solução 1:200 de Palatase[®] foi determinada através do método da diferença de absorção no UV a 215nm e 225nm.

4.5. Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas K_m (constante de Michaelis-Menten) e $V_{\text{máx}}$ (velocidade máxima) foram determinadas para as enzimas imobilizadas Lipozyme[®]RM IM e P:1x2-400. Para tal, foram adicionados diferentes volumes da solução A a 9mL da solução B (descritas no item 4.4), resultando em diferentes concentrações de pNPP (tabela 6). Quando necessário, adicionou-se isopropanol para completar o volume reacional de 10mL.

Tabela 6: Volumes adicionados da solução de *p*NPP 3mg.mL⁻¹ e respectivas concentrações resultantes (μM) utilizadas nos ensaios de determinação das constantes cinéticas das enzimas Lipozyme[®]RM IM e P:1x2-400.

Volume adicionado (mL) de <i>p</i>NPP 3mg.mL⁻¹	Concentração final de <i>p</i>NPP (μM)
0,250	195,50
0,325	256,75
0,400	316,00
0,550	434,50
0,700	553,00
0,850	671,50
1,000	790,00

Cada mistura foi colocada em banho-maria a 37°C. Foram adicionados 10mg de enzima ao meio reacional para iniciar as reações de hidrólise. Os seguintes protocolos de reação foram adotados:

- a) Lipozyme[®]RM IM: Após a adição da enzima, sucederam-se 10s de agitação manual. A leitura da absorbância a 410nm de uma alíquota de 1mL foi realizada após 65 segundos do início da reação. Portanto, o tempo total de reação foi de 1,083 minutos;
- b) P:1x2-400: Após a adição da enzima, sucederam-se 10s de agitação manual. A leitura da absorbância a 410nm de uma alíquota de 1mL foi realizada após 120 segundos do início da reação. Desta maneira, o tempo total de reação foi de 2 minutos.

Os resultados das leituras foram convertidos em atividade lipolítica através da curva padrão obtida no subtópico 4.2.4.

4.6. Esterificação em regime descontínuo

Em recipiente com 125 mL de capacidade nominal foram colocados glicerol e ácido caprílico, totalizando 50g. O recipiente foi colocado em banho-maria, para que a reação transcorresse nas temperaturas determinadas. A água foi retirada do meio reacional depois de 1 hora do início da reação, por evaporação decorrente da redução da pressão ocasionada pela utilização de uma bomba de vácuo.

Foi adotado um planejamento fatorial completo (Tabela 7), variando-se temperatura, tempo reacional e proporção molar entre os reagentes, com o objetivo de determinar a importância de cada parâmetro estudado, bem como a relevância das interações entre os fatores. A agitação e quantidade de enzima foram fixados em 400 rpm e 5% da massa reacional, respectivamente. A agitação foi realizada com o auxílio de um agitador magnético.

Tabela 7: Planejamento fatorial completo para as reações de esterificação em regime descontínuo

Ordem	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção molar (ácido caprílico: glicerol)
1	30	10	1:1
2	70	10	1:1
3	30	6	1:1
4	30	6	3:1
5	30	10	3:1
6	70	6	1:1
7	70	10	3:1
8	70	6	3:1

Caso o modelo resultante necessitasse de ajustes quadráticos, um planejamento central composto completo seria adotado.

Uma vez alcançado o tempo de reação programado, as reações foram interrompidas filtrando-se a vácuo o conteúdo do reator. O filtrado foi recolhido para

posterior separação e quantificação das caprilinas formadas e dosagem do ácido caprílico e glicerol residuais. A quantificação das caprilinas em CCD foi realizada através da normalização das áreas das manchas.

Para fins comparativos, a enzima imobilizada no laboratório P:1x2-400 foi utilizada para catalisar uma reação com parâmetros idênticos à reação 3 do planejamento fatorial completo exposto na tabela 7.

4.7. Cinética da esterificação em regime descontínuo

Nas melhores condições estabelecidas no item 4.6, foram realizados quatro ensaios com os mesmos parâmetros, variando-se apenas a duração da reação, que foi estabelecido entre 1 a 4 horas. Portanto, os parâmetros fixos foram: temperatura (30°C), proporção molar entre os reagentes (1:1), agitação (400rpm, com agitador magnético) e quantidade de enzima (5% da massa reacional). As reações foram conduzidas em recipiente com 125 mL de capacidade nominal, onde foram colocados glicerol e ácido caprílico, totalizando 50g de reagentes. O vácuo foi aplicado em todas as reações após a primeira hora de reação, exceto na reação que durou apenas uma hora. Uma vez alcançado o tempo de reação programado, as reações foram interrompidas filtrando-se a vácuo o conteúdo do reator. O filtrado foi recolhido para posterior separação e quantificação das caprilinas formadas e dosagem do ácido caprílico.

Os rendimentos foram avaliados através da dosagem de ácido caprílico consumido e das porcentagens de mono-, di- e tricaprilina formadas. Os dados obtidos foram complementados com os rendimentos das reações 1 e 3, realizadas no tópico 4.6, que avaliaram a mesma reação com duração de 6 e 10 horas, respectivamente.

4.8. Esterificação em regime descontínuo-alimentado

Para análise da reação de esterificação em regime descontínuo alimentado, foi adotado um planejamento fatorial completo (Tabela 8), variando-se o tempo de enchimento do reator (θ) e a constante de adição exponencial (k). A agitação, quantidade de enzima, temperatura, tempo total de reação e proporção molar entre os

reagentes foram fixados em 400 rpm, 5% da massa reacional, 30°C, 6 horas e 1:1, respectivamente. A agitação foi realizada com o auxílio de um agitador magnético.

O glicerol foi adicionado paulatinamente de acordo com a lei de adição exponencial crescente, conforme equação 1. A forma integrada da lei de adição exponencial crescente resulta na equação de trabalho representada na equação 2. Os volumes realmente adicionados em cada reação da tabela 8, bem como a dedução das correspondentes equações de cálculo estão apresentados no Apêndice A. As quantidades determinadas de glicerol foram adicionadas a cada 0,25h (15 minutos).

Tabela 8: Planejamento fatorial completo para as reações de esterificação em regime descontínuo-alimentado.

Ordem	θ (h)	k (h ⁻¹)
1	2	0,8
2	5	0,8
3	5	0,2
4	2	0,2

$$\varphi = \varphi_i \cdot e^{kt} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: Φ = vazão de alimentação (g.h⁻¹); Φ_i = vazão inicial de alimentação (g.h⁻¹); k = constante de adição exponencial (h⁻¹); t = tempo de adição (h).

$$V_{ad} = (V - V_0) = (V_f - V_0) \cdot \left[\frac{(e^{kt} - 1)}{(e^{k\theta} - 1)} \right] \quad (\text{Equação 2})$$

Onde V_{ad} = volume de glicerol a ser adicionado; V = Volume reacional em dado momento; V_f = Volume reacional final; V_0 = Volume reacional inicial; θ = tempo de enchimento do reator; k = constante de adição exponencial.

4.9. Separação das caprilinas

Os filtrados foram homogeneizados em vórtex por 10 min e, imediatamente após, amostras de 5g foram transferidas para um funil de separação. Adicionaram-se

45 mL de éter de petróleo. Após agitação vigorosa, procedeu-se a três lavagens sucessivas com 30 mL de água destilada cada. A fase aquosa foi recolhida para a dosagem do glicerol residual e a fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador a 70°C, por 20 min e a 60 rpm (FREITAS, et al., 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva padrão para dosagem de proteína solúvel

A análise de regressão resultou no modelo linear disposto na figura 6. O modelo obtido possui um R^2 de 99,4% e um R^2_{pred} de 99,3%, é significativo (valor-p 0,000) e possui valor-p para falta de ajuste de 0,107. Desta maneira, o modelo pode ser considerado bem ajustado.

Figura 6. Curva padrão para a dosagem de proteínas solúveis através do método de diferença de absorbância a 215 e 225nm.

5.2. Curva padrão para dosagem de glicerol

A análise de regressão resultou no modelo linear disposto na Figura 7. O modelo obtido pode ser considerado ajustado uma vez que possui um R^2 de 99,9% e um R^2_{pred} de 99,75% e é significativo com um valor-p de 0,000.

Figura 7. Curva padrão para a dosagem de glicerol através de método enzimático com detecção colorimétrica.

5.3. Curva padrão para dosagem do ácido caprílico residual

A análise de regressão resultou no modelo linear disposto na Figura 8. Obteve-se R^2 e R^2_{pred} de 99,9% e 99,8%, respectivamente (valor-p 0,000). O valor-p obtido para falta de ajuste é de 0,353. Desta maneira, o modelo pode ser considerado bem ajustado.

Figura 8. Curva padrão para a dosagem de ácido caprílico residual por método titulométrico.

5.4. Curva padrão da atividade lipolítica

A análise de regressão resultou no modelo linear disposto na Figura 9. O modelo obtido pode ser considerado bem ajustado, uma vez que resultou em um R^2 de

99,5% e um R^2_{pred} de 99,3 (valor-p de 0,000). Adicionalmente, obteve-se valor-p para falta de ajuste de 0,081.

Figura 9. Curva padrão para a determinação da atividade lipolítica através de método colorimétrico de hidrólise do *p*NPP, cujo produto é o composto *p*NP.

5.5. Curvas-padrão de dosagem de caprilinas e ácido caprílico por CCD

As placas utilizadas para a análise de correlação entre as áreas das manchas e concentrações dos compostos estudados estão representadas na Figura 10.

Figura 10. Placas analisadas pelo programa Just TLC® para análise de correlação entre as áreas das manchas e concentração das caprilinas e ácido caprílico.

Os modelos lineares foram obtidos através da plotagem das áreas das manchas fornecidas pelo programa contra as respectivas concentrações. Abaixo, seguem os modelos individuais de cada substância analisada:

5.5.1. Ácido caprílico

A análise de regressão das médias dos pontos resultou no modelo linear disposto na Figura 11. O modelo obtido pode ser considerado bem ajustado, uma vez que resultou em um R^2 de 99,3% e um R^2_{pred} de 98,73% (valor-p de 0,000). Adicionalmente, a análise dos resíduos indica que o modelo é adequado.

Figura 11. Dosagem de ácido caprílico por CCD.

5.5.2. Monocaprilina

O modelo linear resultante da análise de regressão das médias dos pontos está contido na Figura 12. Obteve-se R^2 e R^2_{pred} de 98,9% e 97,6% (valor-p de 0,000), respectivamente, demonstrando, em conjunto com a análise de resíduos, a adequabilidade do modelo para determinação da concentração de monocaprilina.

Figura 12. Dosagem de monocaprilina por CCD.

5.5.3. Dicaprilina

A análise de regressão das médias das áreas resultou no modelo linear disposto na Figura 13. Obteve-se R^2 e R^2_{pred} de 99,8% (valor-p 0,000). A análise de resíduos mostrou-se adequada. Desta maneira, o modelo pode ser considerado bem ajustado.

Figura 13. Dosagem de dicaprilina por CCD

5.5.4. Tricaprilina

A análise de regressão das médias dos pontos resultou no modelo linear disposto na Figura 14. O modelo obtido pode ser considerado bem ajustado, uma vez que resultou em um R^2 de 99,7% e um R^2_{pred} de 99,5% (valor-p de 0,000). Adicionalmente, a análise dos resíduos indica que o modelo é adequado.

Figura 14. Dosagem de tricaprilina por CCD

5.6. Imobilização enzimática

As resinas utilizadas para imobilizar a albumina bovina *fração V*. Segundo *Cohn*, a albumina livre de ácidos graxos e a Palatase® estão contidas na Tabela 9. A lipase de *Rhizomucor miehei* em pó foi imobilizada apenas com três resinas: 1x2-400; 1x4-200 e 1x4-400, que obtiveram eficiência alta, média e baixa, respectivamente, na imobilização da Palatase®. Para cada amostra, a leitura de absorbância a 215 e 225nm foi realizada em quintuplicata.

A eficiência da imobilização (EI) é expressa através da relação:

$$EI = [(PTA - PTS) \div PTA] \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde: PTA = quantidade total de proteína adicionada (antes da adsorção) e
PTS = quantidade de proteína remanescente no sobrenadante.

Tabela 9: Eficiência de imobilização de diferentes proteínas com resinas aniônicas

Resina	Albumina Fração V	Albumina livre de AGs	Palatase®	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em pó
1x2:100	12,46	14,66	-37,28	-
1x2:200	50,55	44,37	91,29	-
1x2:400	95,32	89,08	92,51	82,28
1x4:50	-	-	-4,15	-
1x4:100	9,48	12,09	-2,90	-
1x4:200	9,52	14,11	-21,57	28,21
1x4:400	22,14	19,35	74,50	35,85
1x8:50	-	-	-13,68	-
1x8:100	9,03	14,49	-71,25	-
1x8:200	10,03	12,05	-23,94	-
1x8:400	12,78	11,30	-16,29	-
2x8:100	-	13,97	-16,44	-
2x8:200	-	7,84	-32,66	-
2x8:400	-	9,05	-47,47	-

As resinas aniônicas da Dow[®] são divididas em tipo I e tipo II. O tipo é indicado pelo primeiro número na nomenclatura da resina. A quantidade de ligações cruzadas é indicada pelo número que aparece após o “x” no nome, sendo expressa em porcentagem de divinilbenzeno (DVB). Desta maneira, os números 2, 4 e 8 indicam que há 2%, 4% e 8% de DVB na resina, respectivamente. Por fim, os números 50, 100, 200 e 400 indicam o tamanho das aberturas na malha, sendo as resinas designadas com o valor 50 as que apresentam maiores aberturas, e as designadas com o valor 400, as que possuem menores aberturas (DOW CHEMICAL COMPANY, 200?).

Os dados obtidos indicam que, para ambos os tipos de albumina, a eficiência de imobilização tende a aumentar com o estreitamento das aberturas da malha, indicando uma retenção mais adequada destas proteínas.

Para a maioria das resinas, a imobilização da Palatase[®] resultou em uma concentração de enzima remanescente no sobrenadante superior à concentração inicial. Dado que a Palatase[®] é um preparado enzimático para fins industriais, espera-se que haja alguma impureza no produto. Logo, é provável que as impurezas remanescentes no sobrenadante tenham interferido no padrão de leitura da absorbância. O fato de que, na imobilização da lipase de *Mucor miehei* em pó (preparado para fins analíticos que apresenta grau de pureza elevado), o mesmo não tenha ocorrido, corrobora a provável interferência das impurezas nas leituras da Palatase[®]. Nos casos em que o valor de EI foi positivo, supõe-se que as resinas 1X2-200 e 1X2-400 foram capazes de adsorver os eventuais interferentes.

Além da determinação do teor de proteína residual no sobrenadante, a determinação da atividade lipolítica foi fundamental para realizar a comparação entre a Palatase[®] imobilizada no laboratório e a Lipozyme[®] RM IM. A atividade lipolítica também auxiliou na compreensão dos resultados negativos de imobilização obtidos para a Palatase[®].

5.7. Determinação da atividade lipolítica

O ensaio de atividade lipolítica foi conduzido nas enzimas comerciais e na Palatase[®] imobilizada na resina 1x2-400, uma vez que esta apresentou a melhor

eficiência de imobilização. Adicionalmente, também foi realizada a análise da Palatase® imobilizada na resina 1x4-200, com o objetivo de determinar se ocorreu a adsorção de lipase, mesmo com os resultados de eficiência de imobilização indicando o contrário. Todas as determinações foram realizadas em quintuplicata.

Para o cálculo da atividade foi utilizada a equação 4, sendo uma unidade de atividade enzimática (U) definida como a liberação de 1µmol de pNP por minuto.

$$A = -0,00425 + 6,292 w \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: A = Absorbância a 410nm e w = 1µmol/mL de pNP.

As atividades lipolíticas da solução de Palatase® 1:200 e da lipase P:1x2-400 foram comparadas por meio da atividade específica, medida que corresponde à expressão da atividade (U) por quantidade de proteína em mg, conforme Tabela 10:

Tabela 10: Atividade, teor de proteína e atividade específica para Palatase® solúvel e imobilizada em resina 1x2-400.

	Palatase® 1:200	P:1x2-400
Atividade (U)	$1,92 \times 10^{-1}$	$2,28 \times 10^{-1}$
Teor de proteína (mg)	$1,14 \times 10^{-3}$	$4,86 \times 10^{-1}$
Atividade específica (U/mg)	168,42	0,47

A atividade específica para as enzimas imobilizadas foi calculada através da massa de resina utilizada (Tabela 11), visto que não é possível determinar a quantidade de proteína adsorvida na versão comercial da lipase imobilizada.

A imobilização da enzima livre resultou em considerável diminuição da atividade lipolítica específica, de acordo com a tabela 11. Entretanto, conforme já citado neste presente trabalho, a utilização de enzimas na forma imobilizada pode ser favorável em outros aspectos, justificando o interesse em sua aplicação e no desenvolvimento de novos sistemas de imobilização.

Tabela 11: Atividade, teor de proteína e atividade específica para Palatase® imobilizada em resina 1x2-400 e 1x4-200 e para Lipozyme® RM IM

	P:1x2-400	Lipozyme® RM IM	P:1x4-400
Atividade (U)	$2,28 \times 10^{-1}$	$2,61 \times 10^{-1}$	$1,67 \times 10^{-1}$
Massa (mg)	10,30	10,30	10,60
Atividade específica (U/mg)	$22,13 \times 10^{-3}$	$25,34 \times 10^{-3}$	$15,75 \times 10^{-3}$

.Ademais, a atividade específica da enzima P:1x2-400 foi apenas 12,7% menor do que a versão comercial. Portanto, dentro da categoria de enzimas imobilizadas, a versão produzida em laboratório possui caráter competitivo, podendo ser considerada como alternativa à Lipozyme® RM IM.

Os resultados de atividade específica para a enzima P:1x4-200 confirmam a ocorrência da adsorção da lipase na resina, contrariando os resultados de eficiência de imobilização (Tabela 9). Portanto, é possível que tenha ocorrido interferência de impurezas na leitura da absorbância do sobrenadante, demonstrando que a viabilidade destas resinas para a imobilização da Palatase® deve ser avaliada apenas após a condução do ensaio de atividade lipolítica.

5.8. Determinação das constantes cinéticas

Para ambas as enzimas estudadas, cada concentração foi analisada em triplicata e os valores de absorbância convertidos em $\mu\text{mol/mL}$ de *p*NP através da equação 4, descrita no tópico 5.7. Estes valores, por sua vez, foram divididos pelo tempo total da reação, resultando na velocidade inicial da reação para cada ensaio.

As médias das velocidades iniciais da reação para cada concentração de substrato foram utilizadas para construir os gráficos A e B da figura 15, que se referem à Lipozyme® RM IM e a P:1x2-400, respectivamente. Os valores inversos de cada um dos eixos cartesianos foram utilizados para construir os gráficos de Lineweaver-Burk, dispostos na mesma figura (o Gráfico C refere-se à Lipozyme® RM IM; o Gráfico D refere-se à P:1x2-400), cuja equação de regressão linear permite determinar as constantes cinéticas, dado que o ponto de interceptação entre a reta e os eixos das

ordenadas equivale a $1/V_{\max}$ e o ponto de intercepção entre a reta e o eixo das abscissas equivale a $-1/K_m$. A tabela 12 sumariza as equações de regressão linear obtidas e os correspondentes R^2 e R^2_{pred} , bem como as estimativas das constantes cinéticas.

Figura 15. Gráficos de velocidade inicial versus concentração de substrato (Gráfico A - Lipozyme[®] RM IM/Gráfico B - P:1x2-400) e gráficos de Lineweaver-Burk (Gráfico C - Lipozyme[®] RM IM/Gráfico D - P:1x2-400) para a reação de hidrólise do pNPP.

Tabela 12: Equações de Linewaver-Burk e estimativa das constantes cinéticas referentes às enzimas Lipozyme[®] RM IM e P:1x2-400

	Lipozyme [®] RM IM	P:1x2-400
Equação de regressão	$\frac{1}{V} = 5,952 + 5334 x \frac{1}{[S]}$	$\frac{1}{V} = 4,041 + 11550 x \frac{1}{[S]}$
R ²	97,08% (Valor-p 0,000)	98,49% (Valor-p 0,000)
R ² pred	95,22% (Valor-p 0,000)	97,46% (Valor-p 0,000)
K _m	896,14 μmol.mL ⁻¹	2858,20 μmol.mL ⁻¹
V _{máx}	0,168 μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹	0,247 μmol.mL ⁻¹ .min ⁻¹

Os gráficos de velocidade inicial versus concentração do substrato indicam que as reações transcorreram na fase linear da curva hiperbólica de Michaelis-Menten, ou seja, as concentrações de substrato não foram suficientes para ocasionar a saturação das enzimas Lipozyme[®] RM IM e P:1x2-400. Desta maneira, as constantes cinéticas contidas na tabela 12 podem ser consideradas uma estimativa e indicam que a enzima P:1x2-400 foi mais ativa que a Lipozyme, apresentando um V_{máx} 31,98% maior. Entretanto, o K_m aproximadamente três vezes menor apresentado pela Lipozyme[®] RM IM indica que ela requer menos substrato que a enzima P:1x2-400 para atingir metade da V_{máx}. Embora em ambos os casos as lípases tenham sido imobilizadas através do mesmo método, ou seja, adsorção, mas em resinas quimicamente diferentes, então discordâncias nos valores das constantes cinéticas são plausíveis, uma vez que o efeito, sobretudo, de difusão, depende muito das características físicas e químicas do material adsorvente [VITOLLO, 2015].

5.9. Esterificação em regime descontínuo

Os produtos da reação de esterificação entre o glicerol e ácido caprílico foram analisados em termos do percentual de consumo de ácido caprílico e glicerol. A Tabela 13 compila estes dados, bem como demonstra os mols de ácido caprílico e glicerol consumidos e a razão molar de consumo entre eles. O experimento fatorial completo foi analisado estatisticamente no programa Minitab[®]17.

Tabela 13: Resultados das reações do planejamento fatorial completo (regime descontínuo) em termos de porcentagem de consumo dos reagentes, mols dos reagentes consumidos e razão molar de consumo entre os reagentes.

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção molar (AC:glicerol)	% de consumo		Mols consumidos		Razão molar AC/Glicerol consumido
				Ácido Caprílico	Glicerol	Ácido Caprílico	Glicerol	
1	30	10	1:1	65,51%	61,77%	0,1389	0,1309	1,061
2	70	10	1:1	17,09%	33,14%	0,0362	0,0703	0,515
3	30	6	1:1	68,21%	72,25%	0,1446	0,1532	0,944
4	30	6	3:1	28,00%	62,97%	0,0801	0,0598	1,339
5	30	10	3:1	25,03%	69,94%	0,0716	0,0664	1,078
6	70	6	1:1	8,92%	15,44%	0,0189	0,0327	0,578
7	70	10	3:1	7,25%	35,39%	0,0207	0,0336	0,616
8	70	6	3:1	5,45%	41,22%	0,0156	0,0392	0,398

5.9.1. Análise de regressão do consumo de ácido caprílico

Nesta análise de regressão foi aplicada a ferramenta *Stepwise* do programa Minitab®17, um recurso automático que sistematicamente elimina variáveis insignificantes ou adiciona as variáveis mais significantes, visando obter o modelo mais relevante estatisticamente. Foi estabelecido um valor α de 0,1 para a entrada ou remoção de termos.

A análise de variância para o experimento fatorial tem como objetivo avaliar os efeitos dos fatores, assim como padrões de interação entre eles, e está contida na Tabela 14:

Tabela 14: Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	5	0,444438	0,088888	174,93	0,006
Linear	3	0,384629	0,128210	252,32	0,004
Temperatura	1	0,273948	0,273948	539,14	0,002
Tempo	1	0,000231	0,000231	0,45	0,570
Proporção	1	0,110450	0,110450	217,37	0,005
Interações de 2 fatores	2	0,059808	0,029904	58,85	0,017
Temperatura * tempo	1	0,003058	0,003058	6,02	0,134
Temperatura * proporção	1	0,056751	0,056751	111,69	0,009
Erro	2	0,001016	0,000508		
Total	7	0,445454			

Conforme estipulado anteriormente, fatores com valor-p superior a 0,10 são considerados não significativos. Portanto, pode-se considerar relevante estatisticamente para o rendimento reacional a temperatura e a proporção molar entre os reagentes, bem como a interação entre eles. O tempo reacional e sua interação com outros parâmetros, por sua vez, não interfere de forma significativa no rendimento. É importante salientar, entretanto, que estas conclusões são válidas apenas para os intervalos dos parâmetros reacionais estudados. Com o gráfico de Pareto (Figura 16), é possível dimensionar a magnitude e relevância dos efeitos: Os fatores que se estendem para além da linha de referência, calculada com base no termo erro, são potencialmente importantes.

Figura 16. Gráfico de Pareto resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico.

A figura referente à probabilidade normal (Figura 17) exhibe os efeitos negativos do lado esquerdo e efeitos positivos do lado direito, demonstrando, portanto, que a temperatura e a proporção molar entre os reagentes exercem um efeito negativo significativo no rendimento reacional, enquanto a interação entre esses fatores exerce um efeito positivo significativo. A linha ajustada indica onde se deveria esperar que os pontos estivessem caso o efeito fosse zero.

Figura 17. Gráfico de probabilidade normal resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de ácido caprílico.

A análise fatorial resultou no modelo linear representado pela equação 5, que possui um R^2 de 99,77% e um R^2_{pred} de 96,35%, com valor-p de 0,006. Estes dados em conjunto com a análise dos resíduos indicam que o modelo está bem ajustado.

$$\begin{aligned} \% \text{ consumo} = & 1,5746 - 0,02158\omega - 0,0217 \beta - \\ & 0,3281 \gamma + 0,000489 \omega * \beta + 0,004211 \omega * \gamma \end{aligned} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde= ω , β e γ correspondem aos fatores temperatura, tempo e proporção molar, respectivamente.

Pode-se inferir, portanto, que melhores rendimentos são esperados em temperaturas mais brandas e com uma proporção molar igual ou próxima a 1:1. Como não há diferença estatística entre um tempo reacional de seis ou dez horas, o menor valor deve ser considerado para a condução de futuras reações, por questões de custo-benefício.

Rendimentos maiores em temperaturas mais brandas também foram obtidos por Rosu, Yasui, Iwasaki e Yamane (1999). Estes autores obtiveram um consumo de ácido caprílico superior a 95% em suas reações. Os parâmetros reacionais estudados pelos autores foram muito similares aos deste trabalho, diferindo significativamente apenas na proporção molar entre os reagentes (de 2 a 4 mols de ácido caprílico para 1 mol de glicerol) e na massa inicial de reagentes (cerca de 10% do valor estipulado no item 4.6). Entretanto, o fator que possivelmente mais contribuiu para o alto rendimento foi o rígido controle do conteúdo de água, determinado por titulação de Karl Fischer ao longo da reação, reforçando a grande importância que este fator exerce na esterificação entre o glicerol e ácidos graxos. .

5.9.2. Análise de regressão do consumo de glicerol

Os efeitos dos fatores no rendimento reacional também foram analisados considerando o consumo do glicerol, visando compreender se a determinação do glicerol residual pode ser considerada um procedimento analítico alternativo à titulação

do ácido caprílico para a determinação do rendimento. A Tabela 15 resume os dados de análise de variância fatorial:

Tabela 15: Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em porcentagem de consumo de glicerol.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	1	0,25113	0,251128	33,52	0,001
Linear	1	0,25113	0,251128	33,52	0,001
Temperatura	1	0,25113	0,251128	33,52	0,001
Erro	6	0,04496	0,007493		
Total	7	0,29609			

Conforme é possível observar, a análise do rendimento realizada com base na porcentagem de consumo do glicerol apontou que apenas a temperatura é um parâmetro relevante. Esta conclusão contrasta com a obtida através da análise do consumo de ácido caprílico e indica que a porcentagem de glicerol consumido não é o método analítico mais adequado para a determinação do rendimento reacional. Como uma mesma quantidade de glicerol pode reagir uma, duas ou três vezes, formando mono-, di- e tricaprilina, respectivamente, a porcentagem de consumo do glicerol pode não fornecer uma relação direta com o rendimento reacional.

A análise absoluta de mols de glicerol consumidos resulta em conclusão similar à obtida com a determinação do consumo de ácido caprílico, conforme é possível observar na tabela 16 e nas Figuras 18 e 19. Nesta análise estatística foi aplicada a ferramenta *Stepwise*, com α de 0,1 para entrada ou remoção de termos.

Tabela 16: Análise de variância fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	3	0,013348	0,004449	17,72	0,009
Linear	2	0,011300	0,005650	22,50	0,007
Temperatura	1	0,006891	0,006891	27,45	0,006
Proporção	1	0,004409	0,004409	17,56	0,014
Interações de 2 fatores	1	0,002048	0,002048	8,16	0,046
Temperatura * proporção	1	0,002048	0,002048	8,16	0,046
Erro	4	0,001004	0,000251		
Total	7	0,014352			

Figura 18. Gráfico de Pareto resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.

Figura 19. Gráfico de probabilidade normal resultante da análise fatorial do rendimento reacional expresso em mols de glicerol consumidos.

A análise fatorial resultou no modelo linear representado pela equação 6, que possui um R^2 de 93,00% e um R^2_{pred} de 72,01%, com valor-p de 0,009. Portanto, em conjunto com a análise dos resíduos, estes dados indicam que o modelo obtido é estatisticamente inferior ao modelo resultante da porcentagem de consumo de ácido caprílico.

$$\text{Mols consumidos} = 0,2736 - 0,003067 \omega - 0,0635 \gamma + 0,000800 \omega * \gamma \quad (\text{Equação 6})$$

Onde= ω e γ correspondem aos fatores temperatura e proporção molar, respectivamente.

5.9.3. CCD para a quantificação de produtos específicos

Foram selecionadas as quatro reações de maior rendimento (1, 3, 4 e 5) para análise em cromatografia em camada delgada (tabela 17). A figura 20 mostra a placa de CCD utilizada para a análise dos produtos específicos obtidos em regime

descontínuo, bem como os produtos específicos obtidos na reação catalisada pela enzima P:1x2-400 (tópico 5.10). Os resultados obtidos referem-se à porcentagem de cada composto no extrato orgânico dos produtos (obtenção do extrato foi descrita no item 4.9). Esta porcentagem foi obtida através da normalização das áreas das manchas. A quantidade de tricaprilina foi muito baixa ou inexistente nas reações realizadas por dois motivos principais: interferência do ácido caprílico em soluções mais concentradas e quantidade de tricaprilina formada inferior à capacidade de detecção do método, provavelmente devido à especificidade 1,3 da enzima Lipozyme[®] RM IM.

Figura 20. Placa de CCD com quatro pontos de aplicação referentes à reação catalisada pela enzima P:1x2-400 (pontos indicados pela Letra P azul) e com quatro pontos referentes às reações em regime descontínuo catalisadas por Lipozyme[®] RM IM (Indicadas pelos números 1, 3, 4 e 5) As manchas referentes à tricaprilina estão circuladas em azul.

Tabela 17: Porcentagens de monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina e ácido caprílico nos extratos orgânicos referentes às reações de esterificação em regime descontínuo do planejamento fatorial completo.

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção Molar	% no extrato orgânico			
				MAG	DAG	TAG	Ác. Caprílico residual
1	30	10	1	48,45%	17,25%	2,47%	31,84%
3	30	6	1	49,61%	19,01%	-	31,38%
4	30	6	3	21,50%	17,03%	-	61,47%
5	30	10	3	19,06%	15,94%	0,67%	64,32%

Legenda: (-) concentração abaixo do limite de detecção, mesmo nas menores diluições.

Conforme Tabela 17, quantidades maiores de monocaprilina e dicaprilina foram obtidas com a proporção molar entre os reagentes de 1:1, sendo esta a condição mais relevante entre as estudadas para a obtenção destes produtos. As quantidades de ácido caprílico residuais para as reações 1 e 3 são consistentes com as quantidades obtidas com a titulação do ácido caprílico: Reação 1 (CCD= 31,84%/ Titulação: 34,49%); Reação 3 (CCD= 31,38% Titulação: 31,79%). Entretanto, o número de repetições dos pontos e a precisão dos valores mostram que o método de titulação é mais adequado para a determinação do ácido caprílico residual.

5.10. Esterificação em regime descontínuo catalisada pela lipase P:1x2-400

O extrato orgânico desta reação foi analisado em triplicata em relação ao teor de ácido caprílico residual e a média das titulações foi comparada com o resultado obtido na reação 3 do planejamento fatorial completo, catalisado por Lipozyme[®] RM IM, conforme tabela 18

Tabela 18: Consumo de ácido caprílico em esterificação catalisada pela enzima P:1x2-400 versus reação de esterificação catalisada por Lipozyme[®] RM IM.

	% média de consumo de ácido caprílico
P:1x2-400	53,31%
Lipozyme [®] RM IM	68,21%

O rendimento apenas 14,9% inferior apresentado pela enzima imobilizada no laboratório indica a adequabilidade de seu uso em reações de esterificação entre o ácido caprílico e o glicerol, demonstrando que a enzima P:1x2-400 é uma alternativa viável à versão comercialmente disponível.

Para a análise da quantidade de caprilinas específicas formadas, o concentrado orgânico foi diluído em n-hexano e aplicado em quatro pontos da placa de CCD (Figura 20). As médias dos resultados obtidos constam na tabela 19:

Tabela 19: Porcentagens de monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico da reação de esterificação catalisada pela enzima P:1x2-400.

Tipo de caprilina	% no extrato orgânico
Monocaprilina	32,12%
Dicaprilina	23,80%
Tricaprilina	4,99%
Ácido caprílico	39,08%

Embora tenha resultado em rendimento inferior em termos de consumo de ácido caprílico, a reação catalisada pela enzima P:1x2-400 produziu mais dicaprilina do que a reação correspondente catalisada pela Lipozyme[®] RM IM. (Reação 3 da tabela 17). Adicionalmente, a reação catalisada pela enzima P:1x2-400 foi a que mais produziu tricaprilina dentre todas as reações realizadas neste trabalho.

As características distintas das resinas adsorventes presentes nas enzimas Lipozyme[®] RM IM e P:1x2-400 provavelmente impactam na composição dos produtos da reação de esterificação. Os efeitos únicos de difusão de cada resina, por exemplo,

influenciam no tempo de permanência dos substratos no sítio ativo da enzima, fornecendo mais ou menos tempo para que as moléculas de ácido caprílico sejam esterificadas ao glicerol, à monocaprilina ou à dicaprilina. Um tempo maior de retenção também permitiram que o ácido caprílico esterificado à posição 1 e 3 da molécula de glicerol migrasse para a posição 2, liberando novamente as posições 1 e/ou 3 para a ação da enzima 1,3 específica. Assim, um tempo de retenção maior ocasionado pela resina DOWEX[®] provavelmente explica a maior quantidade de dicaprilina e tricaprilina observadas na reação de esterificação catalisada pela enzima P:1X2-400.

5.11. Cinética da esterificação em regime descontínuo catalisada por Lipozyme[®] RM IM

Os produtos da reação de esterificação entre o glicerol e ácido caprílico foram analisados em termos do percentual de consumo de ácido caprílico. A titulação foi realizada em triplicata e as médias dos valores utilizadas para construir o gráfico presente na figura 21.

Figura 21. Cinética reacional da reação de esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo, catalisada por Lipozyme[®] RM IM, expressa em % de consumo de ácido caprílico.

A primeira hora de reação resultou em um consumo de ácido caprílico de 40,40%, valor superior ao rendimento apresentado pelas reações 2, 4, 5, 6, 7 e 8 do planejamento fatorial completo, mesmo após 6 horas de reação (tabela 13), reforçando que a temperatura de 30°C e proporção molar de 1:1 entre os reagentes são as condições mais adequadas para um melhor rendimento.

Os resultados da cromatografia em camada delgada estão expostos na tabela 20 e na figura 22:

Tabela 20: Cinética reacional da esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo e catalisado por Lipozyme[®] RM IM, com rendimento expresso em % de monocaprilina, dicaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico.

Tempo (h)	MAG (%)	DAG (%)	Ácido caprílico residual (%)
1	32,57%	12,83%	54,60%
2	35,39%	19,74%	44,87%
3	43,39%	19,89%	36,71%
4	46,21%	19,92%	33,87%
6	49,61%	19,01%	31,38%
10	48,45%	17,25%	31,84%

A análise da figura 22 permite inferir que, tanto para a monocaprilina quanto para a dicaprilina, o rendimento máximo é praticamente alcançado na quarta hora de reação. Desta maneira, demonstra-se que a interrupção da reação poderia ocorrer antes das 6 horas previamente estipuladas, resultando em economia de tempo e energia.

Figura 22. Cinética reacional da esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico, em regime descontínuo e catalisado por Lipozyme[®] RM IM, com rendimento expresso em % de monocaprilina, dicaprilina e ácido caprílico no extrato orgânico.

5.12. Esterificação em regime-descontínuo alimentado.

Os produtos da reação de esterificação entre o glicerol e ácido caprílico foram analisados em termos do percentual de consumo de ácido caprílico e percentuais de mono e dicaprilinas formadas. Os dados obtidos constam na tabela 21:

Tabela 21: Resultados das reações do planejamento fatorial completo (regime descontínuo-alimentado) em termos de porcentagem de consumo de ácido caprílico e porcentagens de monocaprilina e dicaprilina no extrato orgânico.

Ordem	Θ (h)	k (h^{-1})	% de consumo de ácido caprílico (titulação)	Monocaprilina (%)	Dicaprilina (%)	Ácido caprílico residual (%) (CCD)
1	2	0,8	27,13%	19,78%	10,95%	69,27%
2	5	0,8	31,45%	13,61%	16,21%	70,18%
3	5	0,2	30,93%	20,36%	12,38%	67,26%
4	2	0,2	30,85%	23,61%	16,03%	60,36%

Os rendimentos obtidos foram muito similares entre si para que fosse possível determinar a influência dos parâmetros estudados (θ e k). Por conseguinte, a análise do experimento fatorial completo no Minitab[®]17 não resultou em um modelo estatisticamente adequado.

Comparando o rendimento médio (30,09%) das reações realizadas em regime descontínuo-alimentado com o rendimento de 68,21% da reação 3 (tabela 13) realizada com os mesmos parâmetros reacionais em regime descontínuo, observou-se uma queda drástica do consumo de ácido caprílico. Como não há precedentes na literatura sobre a reação de esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico realizada em regime descontínuo-alimentado, é difícil determinar com exatidão a causa deste rendimento inferior.

É possível que haja problemas operacionais envolvidos, dado que para permitir a adição de glicerol a cada 15 minutos, era necessário interromper temporariamente o vácuo aplicado ao sistema, possivelmente limitando a eficiência da remoção da água formada. Outra explicação aceitável é que, embora a remoção da água do meio reacional seja necessária para o deslocamento do equilíbrio no sentido da esterificação, a presença de traços de água é essencial para manter a conformação correta da enzima. Inicialmente, apenas o ácido caprílico e a lipase estavam presentes nos reatores e, somente após a adição de quantidades mínimas de glicerol (Apêndice A) que as reações tiveram início. Assim, possivelmente a quantidade de água formada durante a primeira hora de reação não tenha sido o suficiente para manter a capacidade catalítica máxima da Lipozyme[®] RM IM. Bódalo et al. (2009) chegaram à conclusão similar quando observaram que, em reações de esterificação do ácido ricinoleico, um tempo de remoção de água maior levou à uma leve desidratação da lipase e consequente perda de atividade. Zhang e Hayes (1999), por sua vez, demonstraram que a desidratação da RML reduziu a velocidade da reação de esterificação entre a frutose e o ácido oleico, em comparação ao experimento controle, no qual os reagentes não foram submetidos à desidratação antes da reação.

As quantidades de mono e dicaprilina formadas foram maiores na reação 4, realizada com um tempo de enchimento do reator (θ) de 2 horas e constante de adição

exponencial (k) de $0,2h^{-1}$. Na prática, estes parâmetros reacionais significam que quantidades maiores de glicerol foram adicionadas na primeira hora de reação (Apêndice A), reforçando a possível necessidade de mais glicerol nos momentos iniciais da reação.

Logo, mais estudos sobre a obtenção de caprilinas através da esterificação do glicerol e do ácido caprílico em regime descontínuo-alimentado são necessários, preferencialmente com um controle do teor de água mais rígido durante a operação. A adoção de um regime de alimentação com Θ e k menores também seria indicado, além do emprego das leis de adição como linear crescente, linear decrescente entre outras (ROCHA FILHO, VITOLO, 2017).

6. CONCLUSÕES

Os resultados de EI demonstram a adequabilidade do procedimento de imobilização desenvolvido no laboratório. Adicionalmente, determinou-se a atividade lipolítica, as constantes cinéticas de hidrólise para as enzimas P:1x2-400 e Lipozyme[®] RM IM e o rendimento reacional de uma reação de esterificação catalisada pela enzima P:1x2-400. Os resultados demonstram a viabilidade do uso da enzima imobilizada em laboratório em relação à versão imobilizada comercial.

O método analítico mais adequado para a determinação do rendimento foi o da titulação do ácido caprílico residual, uma vez que a análise de regressão foi significativa e resultou em um modelo estatisticamente adequado. Os melhores resultados foram obtidos a 30°C e proporção molar entre os reagentes de 1:1, com o tempo reacional não exercendo efeitos significativos no rendimento. Dentro das condições estudadas, a caprilina obtida em maior quantidade foi a monocaprilina.

Utilizando os mesmos parâmetros, houve uma queda significativa no rendimento quando a reação foi conduzida em regime descontínuo-alimentado. Ainda, não foi possível estabelecer um modelo estatisticamente relevante, pelo fato de os rendimentos das quatro reações realizadas serem muito similares entre si. A diminuição do rendimento pode estar relacionada a questões operacionais ou à quantidade insuficiente de água no início da reação para manter a conformação ideal da enzima. Como não há precedentes na literatura sobre esta reação ser conduzida em regime descontínuo-alimentado, mais estudos são necessários, inclusive usando alimentação do substrato (glicerol, no caso) no reator baseada em outras leis de adição.

Foi demonstrado que o método de cromatografia em camada delgada desenvolvido resulta em uma relação linear e estatisticamente significativa entre a área da mancha e a concentração de caprilinas e ácido caprílico. Entretanto, a determinação deste triglicerídeo pode ser prejudicada em misturas com grande concentração do ácido graxo em questão, dado que estas condições proporcionam a sobreposição das manchas.

As reações de esterificação realizadas neste trabalho resultaram em um bom rendimento (68,21%) em um tempo curto de reação, conforme demonstrado pela cinética reacional. O delineamento experimental permitiu analisar a influência dos parâmetros reacionais e poderá nortear futuros trabalhos sobre o tema.

Finalmente, espera-se que os métodos desenvolvidos neste presente trabalho possam contribuir com a obtenção, identificação e quantificação de outros glicerídeos de cadeia curta e média.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Otimização dos parâmetros reacionais em regime descontínuo, analisando o efeito do aumento da proporção molar entre ácido caprílico e glicerol;
- b) Determinar a influência do conteúdo de água na reação, aplicando um controle mais rígido deste aspecto;
- c) Realizar mais estudos sobre a reação de esterificação entre glicerol e ácidos graxos em regime descontínuo-alimentado;
- d) Melhorar a configuração do reator operado em regime descontínuo-alimentado;
- e) Avaliar a reação de esterificação através de processo operado em regime descontínuo-alimentado com a adição de substrato seguindo outras leis de adição;
- f) Avaliar a reação em regime descontínuo-alimentado pela adição do ácido caprílico ao invés do glicerol, uma vez que a lipase requer dois substratos para atuar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINI, Z.; ILHAM, Z.; ONG, H. C.; MAZAHARI, H.; CHEN, W. State of art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v.141, p. 339-353, 2017.
- BARKER, R. D. J. Lipids. In: CURREL, B. C.; DAM-MIERAS, R. C. E. **The molecular fabric of cells**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1991, cap. 6, p. 152.
- BARON, A. M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**, 2008. 154f. Dissertação (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BASTOS, A. K. P. **Estudo da seletividade de lipases para a obtenção de ésteres de ácidos graxos**. 2013. 106 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- BHALLA, R.; SINGH, A. K.; PRADHAN, S.; UNNIKUMAR, K. R. Lipids: structure, function and biotechnology aspects. In: CHAUHAN, A. K.; VARMA, A. **A textbook of molecular biotechnology**. New Delhi: I.K. International Publishing Houser Pvt, Ltd, 2009, cap. 8, p.183-184.
- BÓDALO, A.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C.; MURCIA, M. D.; ORTEGA, S. Influence of the operating conditions on lipase-catalyzed synthesis of ricinoleic acid in solvent-free systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 214-219, 2009.
- CHAKRABORTY, R.; MANDAL, E. Fast and energy efficient glycerol esterification with lauric acid by near and far-infrared irradiation: Taguchi optimization of kinetics evaluation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 50, p. 93-99, 2015.
- CHANG, S. S.; REDONDO-SOLANO, M.; THIPPAREDDI, I. H. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* spp on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 141-146. 2010.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Óleos e gorduras. In:_____. **Tecnologia enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ, 2008. cap. 18, p. 196-197.
- COSTA, P. H. G. S. **Síntese de monoestearato de glicerila para uso cosmético**: comparação entre as vias química e enzimática. 2010. 233 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- DATTA , S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013
- DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 6-7, p. 641-646, 2004.
- DÍAZ, I.; MOHINO, F.; BLASCO, T.; SASTRE, E.; PÉREZ-PARIENTE, J. Influence of the alkyl chain length of HSO₃⁻ R- MCM- 41 on the esterification of glycerol with fatty acids. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 80, n. 1-3, p. 33-42, 2005.
- DOW CHEMICAL COMPANY. DOWEX™ **Fine Mesh Spherical Ion Exchange Resins**: Material Safety Data Sheet. Michigan: DOW®, [200?]. 9p. Disponível em:<http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_006f/0901b8038006f232.pdf?filepath=liquidseps/pdfs/noreg/177-01509.pdf&fromPage=GetDoc>. Acesso em: 02 jun. 2016.
- DRIOLI, E.; GIORNO, L. Catalytic membrane reactors (CMRs). In:_____. **Biocatalytic membrane reactors**: applications in biotechnology and the pharmaceutical industry. London: Taylor & Francis Ltd, 1999. cap. 2, p. 53.
- FARAH, B. A. Effects of caprylic triglyceride on cognitive performance and cerebral glucose metabolism in mild Alzheimer's disease: a single case observation. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. 133, p. 1-5, 2014.
- FDA. Food and Drug Administration. **Listing of specific substances listed as GRAS**. Code of Federal Regulations. Maryland: Department of Health and Human Services, 2017. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1505>>. Acesso em: 04 jan. 2018.
- FLISZAR, K. A.; WUELFING, W. P.; LI, Z.; REED, R. A. Profiling of medium chain glycerides used in pharmaceutical formulation development by reversed-phase HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 4, p. 896-900, 2005.

- FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; FILHO, R. M. Monoglyceride and diglyceride production through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 7, p. 1879- 1887. 2010.
- FREITAS, L. BUENO, T.; CASTRO, H. F. Esterificação enzimática do glicerol com ácido láurico em meio isento de solventes empregando lipase imobilizada. In: VI INIC - ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ II EPG - ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO LATINO AMERICANO, 2004, São José dos Campos. **Anais eletrônicos...** São José dos Campos-SP: UNIVAP, 2004. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2004/trabalhos/epg/pdf/EPG3-15.pdf>. Acesso em: 19 jul. 2015.
- FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p. 1360-1366, 2007.
- FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; BARCZA, M.V.; CASTRO, H.F. Alternativa potencial para aproveitamento do glycerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**, v.31, n.9, p.2277-2281, 2009.
- FUCKS, B; SÜß, R.; TEUBER, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography - a review of the current state. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2754-2774, 2011.
- GARCIA, M.; AMALARADIOU, M. A.; ANNAMALAI, T.; SURENDRANATH, S.; LEE, S.; HOAGLAND, T.; DZUREC, D.; FAUSTMAN, C.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Lysteria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1594-1599, 2007.
- GOFFERJÉ, G; STÄBLER, A.; HERFELLNER, T.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; FLÖTER, E. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude *Jatropha* oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 1-7, 2014.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful catalysts for the preparation of pharmaceuticals. . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3-4, p. 111-120, 2006.

- GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and estereases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 1, p. 98-99, 2002.
- HAMERSKI, F. **Esterificação de ácidos graxos com glicerol em reações catalisadas por hidróxido duplo lamelar**. 2013. 99 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2013.
- HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L. LDH-catalyzed esterification of lauric acid with glycerol in solvent free-system. **Applied Catalysis A: General**, v. 475, p. 242-248, 2014.
- HARTMEIER, W. General principles. In:_____. **Immobilized biocatalysts: an introduction**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. cap. 1, p. 14-17.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- HINRICHSSEN, N.; STEINHART, H. Techniques and applications in lipid analysis. In: KRAMER, J. K. G.; MCDONALD, R. E.; BRENNAN, T.; MOSSOBA, M. M. **Lipid analysis and lipidomics: new techniques and applications**. Urbana: AOCS Press, 2006. cap. 1. p. 3-26.
- HOO, P.; ABDULLAH, A. Z. Direct synthesis of mesoporous 12-tungtosphoric acid SBA-15 catalyst for selective esterification of glycerol and lauric acid to monolaurate. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 274-287, 2014.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.
- HU, D.; CHEN, J.; XIA, Y. A comparative study on production of middle chain diacylglycerol through enzymatic esterification and glycerolysis. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 1457-1463, 2013.
- INDRASENA, W. M. Application of preparative layer chromatography to lipids. In: KOWALSKA, T.; SHERMA, J. **Preparative layer chromatography**. Florida: CRC Press, 2006. cap. 12, p. 299-324.
- Just TLC software 4.0.3 User Guide**; Sweday, Lund, Sweden, july 2013.

- KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-HITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1525-1530, 2005.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 503-508, 2012.
- KIM, S. K.; LEE, E. H.; VAISHALI, B.; LEE, S.; LEE, Y.; KIM, C.; MOON, H. T., BYUN, Y. Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 1-2, p. 32-42, 2005.
- KIM, S. M.; RHEE, J. S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 7, p.499-501, 1991.
- KOMPAN, D.; KOMPREJ, A. The effect of fatty acids in goat milk on health. In: CHAIYABUTR, N. **Milk Production – An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health**. Rijeka: Intech, 2012. Cap.1. p. 3-28.
- KOTTING, J.; EIBL, H. Lipases and phospholipases in organic synthesis. In: WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases: their structure, biochemistry and application**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. cap.14, p. 289-293.
- KOTWAL, M.; DESHPANDE, S. S.; SRINIVAS, D. Esterification of fatty acids with glycerol over Fe-Zn double-metal cyanide catalyst. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 14, p. 1302-1306, 2011.
- LAFFEL, L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v.15, n.6, p.412-426,1999.
- LANGONE, M. A. P.; SANT'ANNA, G. L. Enzymatic synthesis of medium- chain triglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 759-770, 1999.
- LEE, K. W. Y.; PORTER, C. J. H.; BOYD, B. J. A Simple Quantitative Approach for the Determination of Long and Medium Chain Lipids in Bio-relevant Matrices by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection. **AAPS PharmSciTech**, v. 14, n.3, p. 927-934, 2013.

- LO. S.; TAN, C.; LONG, K.; YUSOFF, M. S .A.; LAI,O. Diacylglycerol oil- properties, process and products: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 3, p. 223- 233, 2008.
- MACHADO, M. S.; PARIENTE-PEREZ, J.; SASTRE, E.; CARDOSO,D.; GUERÉÑU, A. M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolit molecular sieves. **Applied catalysis A: General**, v. 203, p. 321-328, 2000.
- MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v.16, p. 1374-82, 2006.
- MAYNARD, S. D.; GELBLUM, J. Retrospective cohort study of the efficacy of caprylic triglyceride in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 9, n. 1619-1627, 2013.
- MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e tecnologia dos alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.
- MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. O'NEIL, M. J., editor-in-chief. 15th Edition, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2013.
- MIRANDA, A. S.; MIRANDA, L. S. M.; SOUZA, R. O. M. A. Lipases: valuable catalysts for dynamics kinetic resolutions. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 372-393, 2015.
- MORE, S. B.; WAGHMARE, J. T.; GOGATE, P. R. Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 253,261, 2017
- MOSTAFA, N. A.; MAHER, A.; ABDELMOEZ, W. Production of mono-, di-, and triglycerides from waste fatty acids through esterification with glycerol. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 9, p. 900-907, 2013.
- MUMME, K.; STONEHOUSE, W. Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 115, n. 2, p. 249-263, 2015.
- NAIR, M. K. M.; VASUDEVAN, P.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 611-616, 2004.

NANDI, S.; GANGOPADHYAY, S.; GHOSH, S. Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 725-728, 2005.

NCBI. Pubchem. **Octanoic Acid**: Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/octanoic_acid > Acesso em: 08 ago. 2015.

NICHOLS, D. S. Principles of lipid analysis. In: SIKORSKI, Z. E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Florida: CRC Press, 2002. cap. 9.

NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Lipid analysis by TLC. In: CAZES, J. **Encyclopedia of chromatography**. 2nd ed. Florida: CRC Press, 2005. cap. 202, p. 965-969.

NOVOZYMES. Disponível em:<<http://www.novozymes.com/> > Acesso em: 12 ago. 2015.

PAPPALARDO, V. M.; BOERIU, C. G.; ZACCHERIA, F.; RAVASIO, N. Synthesis and characterization of arabinose-palmitic acid esters by enzymatic esterification. **Molecular, Catalysis**, v. 433, p. 383-390, 2017.

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

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Química básica dos lipídeos. In: OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H .F. **Fundamentos de ciência e tecnologia dos alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 5, p. 196-242.

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

ROCHA FILHO, J.A., VITOLO, M. **Guia para aulas práticas de biotecnologia de enzimas e fermentação**. São Paulo: Blücher, 2017. 170p.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. . **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n.1-2, p. 1-22, 2010.

- ROSU, R.; YASUI, M.; IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-Diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n.7, p.839-43, 1999.
- SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. **Chemistry Central Journal**, v.5, p. 1-9, 2011.
- SANTOS, N. A. C. **Desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor de lipídeos em microalgas visando a produção de biodiesel**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- SEGEL, I.H. **Bioquímica: teoria e problemas**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 527p.
- SEK, L.; PORTER, C. J. H.; CHARMAN, W. N. Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 3-4, p. 651-661, 2001.
- SEVERINO, A. C. F. **Produção de sucedâneos de gordura de leite humano a partir de tripalmitina e de óleo de grão de uva, catalisada por lipases imobilizadas**. 2014. 55 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar-Processamento de Alimentos) – Instituto Superior de agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Extraction and analysis of lipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2nd ed. Florida: CRC Press, 2002. cap. 5.
- SHU, Z.; JIANG, H.; LIN, R.; JIANG, Y.; LIN, L.; HUANG, J. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 1-8, 2010.
- SKORONSKI, E.; PADOIN, N.; SOARES, C.; FURIGO, A. Stability of immobilized *Rhizomucor miehei* lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n.3, p. 633-641, 2014

- SOLAESA, A.G.; SANZ, M.T.; FALKEBORG, M.; BELTRAN, S.; GUO, Z. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. **Food Chemistry**, v. 190, n. 960-967, 2016.
- THOMAS, A. E.; SCHAROUN, J. E.; RALSTON, H. Quantitative estimation of isomeric monoglycerides by thin-layer chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 9, n. 10, p. 789-792, 1965.
- TOMOTANI, E. J.; VITOLO, M. Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 1325-1331, 2006
- TRAUL, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 79-98, 2000.
- TREVIZAN, L.; KESSLER, A. M. Lipídeos na nutrição de cães e gatos: metabolismo, fontes e uso em dietas práticas e terapêuticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 15-25, 2009.
- UHLIG, H. Description of enzymes. In:_____. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998. cap. 3, p. 187-188.
- VALDEZ, H.C.; AMADO, R.S.; SOUZA, F.C.; D'ELIA, E.; VIEIRA, E.C. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. **Química Nova**, v.35, n.3, p.1-14, 2012.
- VITOLO, M. Enzimas: as proteínas catalisadoras. In:_____. **Biotecnologia Farmacêutica: aspectos sobre aplicação industrial**. São Paulo: Blücher Ltda, 2015, cap. 5, p. 210- 221.
- VLTAVSKA, P.; KASPARKOVA, V.; JANIS, R.; BUNKOVA, L. Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n.7, p. 849-856, 2012
- VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas em glicerol**, 2009. 147 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

- WAN, H.; HU, X.; SEO, Y.; XIA, Y. A facile enzymatic synthesis of partial glycerides in an up-flow column reactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 1564-1567, 2012.
- YANG, T.; ZHANG, H.; MU, H.; SINCLAIR, A.J.; XU, X. Diacylglycerols from butterfat: production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 10, p. 979-987, 2004.
- ZHANG, X.; HAYES, D. G. Increased rate of lipase-catalyzed saccharide-fatty acid esterification by control of reaction medium. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, n.12, p.1495-1499, 1999.
- ZHAO, K.; CAO, X.; DI, Q.; WANG, M.; CAO, H.; DENG, L.; LIU, J.; WANG, F.; TAN, T. Synthesis, characterization and optimization of a two-step immobilized lipase. **Renewable Energy**, v. 103, p. 383-387, 2017.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A – Volumes de glicerol adicionados e dedução das correspondentes equações de adição

Equação base para dedução das equações individuais:

$$V_{ad} = (V - V_0) = (V_f - V_0) \cdot \left[\frac{(e^{kt} - 1)}{(e^{k\theta} - 1)} \right]$$

Onde V_{ad} = volume de glicerol a ser adicionado; V = Volume reacional em dado momento; V_f = Volume reacional final; V_0 = Volume reacional inicial; θ = tempo de enchimento do reator; k = constante de adição exponencial.

Volumes de ácido caprílico e glicerol adicionados (massa total dos reagentes de 50g, na proporção molar de 1:1):

Considerando as densidades relativas de $1,26\text{g.mL}^{-1}$ para o glicerol e $0,91\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido caprílico e massas finais de 19,49g de glicerol e 30,51g de ácido caprílico, serão adicionados paulatinamente um total de 15,47mL de glicerol, para um volume inicial de 33,53 mL de ácido caprílico no reator. Desta maneira, o termo da equação $(V_f - V_i)$ é o valor fixo de 0,1547L. Substituindo os termos θ e k pelos valores constantes na tabela 8 obtêm-se as seguintes equações:

Reação	θ (h)	k (h^{-1})	Equação de adição
1	3	0,8	$V_{ad} = 0,00156 \cdot e^{0,8t} - 0,00156$
2	6	0,8	$V_{ad} = 0,00013 \cdot e^{0,8t} - 0,00013$
3	6	0,2	$V_{ad} = 0,00672 \cdot e^{0,2t} - 0,00672$
4	3	0,2	$V_{ad} = 0,01897 \cdot e^{0,2t} - 0,01897$

Os volumes reais adicionados constam na tabela abaixo. O volume foi corrigido por um fator de 1,124, após ter sido observada uma discrepância na massa efetivamente adicionado em relação à massa final teórica de glicerol, provavelmente devido ao fato de o glicerol ter sido mantido à 80°C antes da adição, visando diminuir sua viscosidade e facilitar a manipulação.

t(h)	Reação 1		Reação 2		Reação 3		Reação 4	
	V _{ad} (mL)	V adicionado (mL)	V _{ad} (mL)	V adicionado (mL)	V _{ad} (mL)	V adicionado (mL)	V _{ad} (mL)	V adicionado (mL)
0,00	0,39	0,39	0,03	0,03	0,39	0,39	1,09	1,09
0,25	0,86	0,47	0,07	0,04	0,79	0,41	2,24	1,15
0,50	1,44	0,58	0,12	0,05	1,22	0,43	3,45	1,21
0,75	2,14	0,71	0,18	0,06	1,67	0,45	4,72	1,27
1,00	3,01	0,86	0,25	0,07	2,15	0,47	6,06	1,34
1,25	4,06	1,05	0,34	0,09	2,64	0,50	7,46	1,40
1,50	5,34	1,29	0,44	0,11	3,17	0,52	8,94	1,48
1,75	6,91	1,57	0,57	0,13	3,71	0,55	10,49	1,55
2,00	8,83	1,92	0,73	0,16	4,29	0,58	12,12	1,63
2,25	11,17	2,34	0,93	0,19	4,90	0,61	13,83	1,71
2,50	14,04	2,86	1,17	0,24	5,54	0,64	15,63	1,80
2,75	17,53	3,49	1,46	0,29	6,21	0,67	17,53	1,89
3,00	-	-	1,81	0,35	6,92	0,71	-	-
3,25	-	-	2,25	0,43	7,66	0,74	-	-
3,50	-	-	2,78	0,53	8,44	0,78	-	-
3,75	-	-	3,42	0,65	9,26	0,82	-	-
4,00	-	-	4,21	0,79	10,12	0,86	-	-
4,25	-	-	5,18	0,96	11,02	0,91	-	-
4,50	-	-	6,36	1,18	11,98	0,95	-	-
4,75	-	-	7,80	1,44	12,98	1,00	-	-
5,00	-	-	9,55	1,76	14,03	1,05	-	-
5,25	-	-	11,70	2,15	15,14	1,11	-	-
5,50	-	-	14,32	2,62	16,30	1,16	-	-
5,75	-	-	17,53	3,20	17,52	1,22	-	-
6,00	-	-	-	-	-	-	-	-
Total		17,53		17,53		17,52		17,53

APÊNDICE B – Aspectos operacionais do *software* JustTLC 4.0.3

a) Modo de análise das manchas

De acordo com o manual do usuário, o *software* JustTLC 4.0.3 trabalha com imagens digitais, nos formatos tif, tiff, jpg, jpeg, png e bitmap, e analisa as manchas das imagens considerando a área que elas ocupam e a intensidade da cor. O programa converte automaticamente as imagens para uma escala de cinza, dado que os algoritmos utilizados na análise das imagens operam apenas em imagens monocromáticas. O método de transformação utilizado é uma conversão bem estabelecida comumente utilizada em *softwares* de edição de fotos.

O *software* foi desenvolvido exclusivamente para a análise de imagens de CCD. Desta maneira, os algoritmos de processamento foram selecionados e aprimorados para lidar com problemas específicos inerentes a este tipo de imagem.

b) Etapas de análise das manchas

Antes da inserção da imagem no *software* JustTLC 4.0.3, deve-se selecionar que tipo de imagem será analisada: padrão (fundo claro e manchas escuras) ou negativa (fundo escuro e manchas claras).

Então, executam-se as seguintes etapas, que podem ser realizadas automaticamente (e manualmente corrigidas, se necessário), ou de maneira totalmente manual.

- Identificação da mancha;
- Contorno da mancha;
- Comparação entre manchas e diferentes pratos de TLC.

c) Dificuldades operacionais encontradas pelo *software* JustTLC 4.0.3

As maiores dificuldades enfrentadas pelo *software* são:

- ruído da imagem, que ocorre devido à estrutura não uniforme da superfície ou devido ao processo de escaneamento utilizado.;
- Fundo da imagem variável;
- Manchas sobrepostas

O *software* aplica diferentes estratégias para a resolução destas questões, incluindo a possibilidade de delimitar a área da mancha manualmente.

d) Particularidades do uso do *software* JustTLC 4.0.3 nas análises realizadas neste trabalho

Embora o programa seja capaz de analisar as manchas de maneira tridimensional, os volumes obtidos para as caprilinas não foram consistentes, observando-se grandes variações para uma mesma concentração. Provavelmente, o método de revelação da placa não permitiu uma análise de volume precisa, uma vez que a oxidação das caprilinas proporcionada pela solução de permanganato de potássio continua ocorrendo por um longo período de tempo e varia conforme condições ambientes, tais como temperatura e umidade. A área da mancha, entretanto, manteve-se igual desde o momento inicial da revelação. Assim, foi possível relacionar as áreas das manchas com a concentração de caprilinas, obtendo-se as correlações lineares observadas no tópico 5.5.

10. ANEXOS

ANEXO A- Histórico Escolar

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 6828223/1 - Gabriela Caldas Steintraesser

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5735-7/2	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras (1)	15/10/2015	18/11/2015	75	5	100	A	N	Concluída
EDM5100-2/2	A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	01/03/2016	03/06/2016	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5805-2/2	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5700-3/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/04/2016	09/06/2016	90	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5768-5/1	Princípios de Fermentação Contínua	26/04/2016	27/06/2016	75	5	100	A	N	Concluída
FBT5706-3/2	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	01/08/2016	02/10/2016	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5773-7/8	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	01/08/2016	10/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/3	Aprimoramento Pedagógico	16/08/2016	12/09/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/3	Atualização em Ciências Farmacêuticas	26/09/2016	02/10/2016	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0407 Fundamentos da Análise Sensorial de Alimentos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)	01/02/2017	30/06/2017	-	1	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

- 1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 07/02/2018.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência. Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 31/08/2017

Impresso em: 15/02/2018 11:07:14