UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

ARIELA VELOSO DE PAULA

**Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite
com óleo de soja**

Lorena
2008

ARIELA VELOSO DE PAULA

**Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite
com óleo de soja**

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Engenharia Química.

Área de Concentração: Processos Catalíticos
e Biocatalíticos

Orientador: Dr. Júlio César dos Santos

Lorena

2008

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Paula, Ariela Veloso de

Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite com óleo de soja / Ariela Veloso de Paula; orientador Júlio Cesar dos Santos.-- Lorena, 2008.

110 f: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Lipase 2. Imobilização 3. Interesterificação enzimática 4. Gordura do leite 5. Óleo de soja. I. Título.

577.152.9 - CDU

Dedicatória

*Aos meus queridos avós: Sr. De Paula (in memoriam) e Dona Aracy,
por serem os grandes responsáveis pela realização deste sonho,
por cada ensinamento e princípio plantado em meu coração,
por serem exemplos de vida, honestidade e respeito,
pelo amor incondicional...*

*À minha mãe Laura,
por me ajudar a transformar cada sonho em realidade,
pela paciência, força e presença marcante em cada etapa deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Seu amor e Sua presença marcante em todos os momentos e acima de tudo por ter me possibilitado esta conquista. Obrigada pela constante proteção de um Pai, sempre renovando minha fé e esperança. Sou grata por todas as oportunidades que tens designado para minha vida. Sem Ti, nada teria feito. Sem Ti, nada seria.

Ao Dr. Júlio César dos Santos, meu orientador e amigo. Obrigada por sua competente contribuição em minha vida profissional como orientador. Agradeço pela confiança, incentivo e estímulo, por sua permanente disponibilidade e apoio constante em cada etapa deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro, pela valiosa co-orientação, por cada um de seus ensinamentos, por seu exemplo e apoio constante. Obrigada por ter sido a grande responsável por meu ingresso nessa carreira e acima de tudo, por acreditar em mim.

À minha querida vovó Aracy, que bem sabe o valor da conquista deste título, pelas longas conversas ao telefone que sempre me alegraram tanto. Tão distantes e tão presentes. Obrigada por ter me possibilitado ser tudo que sou hoje.

À minha mamãe, Laura, por estar sempre ao meu lado me apoiando. Sua presença me encoraja a superar os obstáculos. Louvo a Deus por sua vida, e pelo privilégio de ser sua filha.

Ao meu querido pai, Antonio Veloso, por seu, incentivo e amor dedicado durante todo esse período.

Ao meu amado irmão Renan, por seu incentivo, paciência e acima de tudo o amor que nos une, que é muito especial.

Aos meus queridos tios Ricardo e Arlene, pelo apoio e presença marcante. Obrigada pelo carinho e incentivo permanente durante a execução deste trabalho e em todas as outras etapas de minha vida.

Aos meus queridos tios Gerson e Rose, por me servirem de exemplo e estarem sempre presentes me encorajando. Obrigada porque tenho a certeza de que sem o carinho e as constantes orações de vocês não teria conseguido.

À minha família, pela presença constante em todos os momentos de minha vida, pelo apoio moral e afetivo e por toda valorização que deram à minha formação e educação.

Aos meus queridos amigos e irmãos, Feliz e Alexandre, verdadeiros presentes de Deus em minha vida. Vocês são muito especiais. Sou grata pelo apoio, incentivo e companhia constante e acima de tudo, por me sustentarem em oração.

À minha querida amiga irmã Gisele Fátima. Não poderia deixar de agradecer a você minha querida, por sua amizade sincera e ajuda incansável. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, desde o nosso ingresso na faculdade. Este trabalho também é seu.

Às amigas Fátima, Liana, Aline, Maria José, Priscila e Abigail que estiveram sempre presentes, me apoiando amorosa e pacientemente.

Aos colegas presentes e aos que já participaram do nosso grupo de trabalho: Alessandra, Ana Paula, André, Bia, Caio, Cláudia, Felipe, Grazielle, Guilherme, Josiane, Larissa, Matheus, Patrícia, Patrícia (IC), Raquel, Renato e Rodrigo, pela ajuda, amizade e ótima convivência no laboratório. Este trabalho é também de cada um de vocês.

À Eng. Bioquímica Joseana Rocha do Monte, pela valiosa e incansável ajuda na análise de eletroforese.

Aos diversos funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, que com paciência e dedicação, tornaram possível a existência da instituição e a concretização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pela atenção e disposição na leitura e avaliação desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido.

À todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado, meus sinceros agradecimentos.

*“Não to mandei eu? Esforça-te, e tem bom ânimo;
não temas, nem te espantes; porque o SENHOR teu Deus é contigo,
por onde quer que andares”*

Bíblia Sagrada

*“Atingir objetivos é um processo que envolve esforço conjunto:
entrar em contato com nosso coração, determinar um curso a seguir e, então,
depender de Deus e estar disposto a deixar que Ele nos guie, um passo de cada vez”*

Sheila West

RESUMO

PAULA, A. V. **Seleção de preparações comerciais de lipase para interesterificação da gordura do leite com óleo de soja.** 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2008.

O presente projeto teve como objetivo selecionar lipases comerciais para a interesterificação enzimática da gordura do leite com óleo de soja visando à obtenção de produto enriquecido com ácidos graxos essenciais. Foram testadas lipases de diferentes fontes microbianas (*Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizomucor miehei*) imobilizadas em matriz híbrida polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) previamente caracterizada quanto às suas propriedades físico-químicas e morfológicas. Tanto as enzimas livres como imobilizadas, foram inicialmente caracterizadas com relação às suas atividades hidrolítica e de esterificação. Em função da alta complexidade das matérias-primas “gordura do leite e óleo de soja”, optou-se pela triagem inicial da enzima em um sistema reacional modelo de interesterificação. Como reagentes de partida, foram escolhidos tripalmitina e trioleína, uma vez que os ácidos graxos palmítico e oléico estão presentes em grande quantidade nos triglicerídeos que compõem as matérias-primas de interesse. Assim, as lipases imobilizadas no suporte POS-PVA foram empregadas na catálise de reações de interesterificação no sistema modelo empregando-se hexano como solvente. O valor mais elevado de rendimento de interesterificação (31%) foi obtido com o emprego da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), sendo esta enzima selecionada para continuidade do trabalho. Testes adicionais foram efetuados para verificar a influência da concentração de trioleína e tripalmitina no rendimento da reação. Neste caso, o melhor resultado foi alcançado no substrato equimolar de tripalmitina e trioleína (40mM), para o qual observou-se um rendimento de interesterificação de 45%, em 24 h de reação. O sistema imobilizado selecionado foi caracterizado quanto às suas propriedades físico-químicas e de estabilidade, empregando-se técnicas como difratometria de raios-X e espectroscopia no infravermelho. Foi observada boa estabilidade à estocagem, mantendo-se 100% da atividade hidrolítica inicial após 120 dias de armazenamento. Finalmente, foram realizados testes de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja sendo que, de maneira geral, a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em POS-PVA promoveu o aumento na concentração dos triglicerídeos C₂₆-C₃₄ e C₄₆-C₅₀, e diminuição dos triglicerídeos C₃₈, C₄₄ e C₅₄, obtendo-se 12% de rendimento de interesterificação. A análise de textura do meio reacional e do produto interesterificado mostrou que a simples mistura física de óleo de soja com a gordura do leite provocou uma diminuição de mais de 50% na consistência desta gordura. Após a reação de interesterificação, o produto obtido apresentou redução de aproximadamente 24 % na consistência em relação à da mistura física das matérias-primas, devido à incorporação dos ácidos graxos insaturados do óleo de soja nos triglicerídeos presentes na gordura do leite, e à formação de mono e diglicerídeos devida à hidrólise parcial das matérias-primas. Assim, os resultados promissores obtidos com o uso da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036) imobilizada em POS-PVA, tanto na reação modelo de interesterificação de tripalmitina com trioleína quanto nas matérias-primas lipídicas, possibilitaram a seleção deste sistema enzimático visando ao seu emprego no bioprocessamento de interesse.

Palavras-chave: Lipase. Imobilização. Interesterificação enzimática. Gordura do leite. Óleo de soja.

ABSTRACT

PAULA, A. V. **Selection of commercial lipase preparations for interesterification of milkfat with soybean oil.** 2008. 110 f. Dissertation (Master of Science in Chemical Engineering) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2008.

The objective of this work was to select a commercial lipase for enzymatic interesterification of milkfat with soybean to obtain a product enriched with essential fatty acids. Lipases from different microbial sources (*Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizomucor miehei*) were immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix (POS-PVA) previously characterized in relation to its physico-chemical and morphological properties. All lipase preparations in both free and immobilized forms were initially characterized, regarding their hydrolytic and esterification activities. Owing to the high complexity of the raw materials “milkfat and soybean oi”, the lipase screening assay was carried out using a model interesterification system consisted of tripalmitin and triolein. These triglycerides were chosen as starting materials since palmitic and oleic fatty acids are present at high amount proportions in the raw materials. Thus, immobilized lipase derivatives on POS-PVA were used to catalyze the interesterification of tripalmitin with triolein in the presence of hexane as solvent. The highest interesterification (31%) was obtained using the lipase from *Rhizopus oryzae* (L036P) and therefore, this enzyme was selected for continuing the work. Additional tests were performed to verify the influence of the molar ratio between triolein and tripalmitin in the reaction yield. The best result was achieved for the substrate containing equimolar amounts of tripalmitin and triolein (40 mM), attaining 45% of interesterification yield at 24 h reaction. The selected immobilized system was characterized in relation to its physico-chemical and stability properties using techniques as X-ray diffractometry and IR spectroscopy. High stability was found for the immobilized lipase that maintained full original activity after 120 days storage at 4°C. Finally, interesterification tests of milkfat with soybean oil were carried out, and the use of *Rhizopus oryzae* lipase immobilized in POS-PVA increased the concentration of the triglycerides C₂₆-C₃₄ and C₄₆-C₅₀, and decreased the concentration of the triglycerides C₃₈, C₄₄ and C₅₄, which corresponded to 12% of interesterification yield. The texture analysis of both reaction medium and interesterified product showed that simple physical blend of soybean oil with milk fat reduced more than 50% the milkfat consistency. After the interesterification reaction, the obtained product showed even lower consistency (24% reduction) in comparison with the physical raw materials blend, due to the incorporation of unsaturated fatty acids from soybean oil in the triglycerides of milkfat, and to the formation of mono and diglycerides resulting from partial hydrolysis of the raw materials. Thus, the promising results obtained using *Rhizopus oryzae* lipase (L036P) immobilized on POS-PVA, both in the model interesterification reaction of tripalmitin with triolein and in the lipid raw materials, indicated the suitability of the selected immobilized derivative to be applied in the proposed bioprocess.

Keywords: Lipase. Immobilization. Enzymatic interesterification. Milkfat. Soybean oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases.....	21
Figura 2.2. Reações envolvidas no sítio catalítico das lipases: mecanismo de interesterificação.....	23
Figura 2.3. Porcentagem de ácido graxo obtido na hidrólise da manteiga catalisada por Piccantase A	25
Figura 2.4. Porcentagem de ácido graxo obtido na hidrólise da manteiga catalisada por Piccantase R8000.....	26
Figura 2.5. Principais métodos de imobilização de enzimas.....	29
Figura 2.6. Reações de hidrólise e policondensação do silano.....	31
Figura 2.7. Representação esquemática da reação entre uma molécula de glicerol e três ácidos graxos para a formação do triglicerídeo. As letras R_1 , R_2 e R_3 representam a cadeia carbônica dos ácidos graxos ligados ao glicerol.	32
Figura 2.8. Estrutura de um ácido graxo saturado (a) e insaturado (b)	33
Figura 2.9. Ácidos graxos com ligação não conjugada (a) e ligação conjugada (b).	33
Figura 2.10. Representação dos isômeros cis e trans de ácidos graxos.....	36
Figura 2.11. Razão LDL/HDL do colesterol, a partir da ingestão de diferentes tipos de gorduras	38
Figura 2.12. Classificação dos principais tipos de gorduras com relação à recomendação de sua ingestão baseada no risco a saúde humana.....	39
Figura 4.1. Atividade das lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) em função da concentração do substrato (pH 7 a 37 °C). ▼ dados experimentais, linha sólida (dados ajustados pelo Programa Enzyme fitter).	58
Figura 4.2. Eletroforese em gel das lipases de <i>Rhizopus oryzae</i> obtidas de diferentes fornecedores.....	60
Figura 4.3. Consumo de butanol (○) e ácido butírico (■) na formação de butirato de butila (▲) em reações de esterificação de catalisadas pela Lipase A (a), Lipase M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P(g), na forma livre.	62
Figura 4.4. Atividade relativa de esterificação (%) das lipases em estudo na forma livre.....	63
Figura 4.5. Estrutura química do suporte POS-PVA.....	64

Figura 4.6. Esquema da reação de ativação do suporte POS-PVA com metaperiodato de sódio e da imobilização da enzima.....	65
Figura 4.7. Espectros no infra-vermelho do suporte POS-PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio.....	66
Figura 4.8. Difractometria de Raios X do suporte POS-PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio.....	67
Figura 4.9. Micrografias do suporte POS-PVA não ativado (a) e ativado com metaperiodato de sódio (b) (aumento de 2000X).....	67
Figura 4.10. Consumo de butanol (○) e ácido butírico (■) na formação de butirato de butila (▲) em reações de esterificação catalisadas por Lipase A (a), Lipase M (b) Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio.	71
Figura 4.11. Atividade relativa de esterificação (%) das lipases imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio	72
Figura 4.12: Perfil da concentração de triglicerídeos formados (-●- C50; -▲- C52) e consumidos (-■- C48; -▼- C54) nas reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína, catalisadas por lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g), imobilizadas em POS-PVA. Os Triglicerídeos foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes.	74
Figura 4.13. Rendimento de interesterificação (barras) e teor de ácidos graxos (●) na reação de interesterificação da tripalmitina com trioleína catalisada por lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) imobilizadas em POS-PVA.	75
Figura 4.14: Perfil da concentração de triglicerídeos formados (-●- C50; -▲- C52) e consumidos (-■- C48; -▼- C54) nas reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína, catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P) imobilizada em POS-PVA, empregando diferentes concentrações de substratos (PPP:OOO): 40:40 (a), 40:60 (b), 60:60 (c). Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes.	78
Figura 4.15. Rendimento de interesterificação (barras) e teor de ácidos graxos (●) na reação de interesterificação da tripalmitina com trioleína catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P) imobilizada em POS-PVA, empregando diferentes concentrações de substratos (PPP:OOO): 40:40 (a), 40:60 (b), 60:60 (c).	78
Figura 4.16. Composição de equilíbrio (%) resultante da interesterificação de uma mistura equimolar binária de tripalmitina e trioleína.	79
Figura 4.17. Espectros no infravermelho do suporte ativado, das enzimas livres e do derivado imobilizado selecionado: lipase de <i>R. oryzae</i> (L036P).	81

Figura 4.18. Difractometria de Raios X do suporte ativado, da enzima livre e do derivado imobilizado selecionado: lipase de <i>R. oryzae</i> (L036P).	82
Figura 4.19. Distribuição Granulométrica da lipase de <i>R. oryzae</i> imobilizada em suporte POS-PVA, ativado com metaperiodato de sódio.....	83
Figura 4.20. Composição em triglicerídeos da gordura do leite pura e da mistura reacional (80% gordura do leite / 20% óleo de soja) não interesterificada.....	84
Figura 4.21. Perfil de concentração dos triglicerídeos da mistura reacional inicial e do produto interesterificado da reação catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P), em 72 horas de reação.	85
Figura 4.22. Rendimento de interesterificação (barra vazada) e grau de hidrólise (●) da reação de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P).	86
Figura 4.23. Perfil de concentração dos triglicerídeos da gordura do leite e do produto interesterificado na reação catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P), em 72 horas de processo.	87
Figura 4.24. Consistência da gordura do leite, da mistura das matérias-primas não interesterificada e do produto interesterificado da reação catalisada por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036P), em 72 horas de reação.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Especificidade natural de algumas lipases disponíveis comercialmente	19
Tabela 2.2. Aplicações industriais de lipases microbianas.....	20
Tabela 2.3. Características, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas	29
Tabela 2.4. Composição de ácidos graxos: manteiga e óleo de soja.	34
Tabela 2.5. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) da gordura do leite.....	40
Tabela 2.6. Exemplos de estudos realizados visando à interesterificação enzimática de gordura do leite	42
Tabela 2.7. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) do óleo de soja.....	43
Tabela 2.8. Composição do óleo de soja em triglicerídeos	44
Tabela 3.1. Valores de atividade, temperatura e pH ótimo das Lipases utilizadas neste trabalho (dados fornecidos pelos fabricantes).	45
Tabela 3.2. Condições operacionais para dosagem de triglicerídeos por Cromatografia Gasosa	54
Tabela 4.1. Atividade hidrolítica, atividade específica e teores de umidade e proteína das lipases selecionadas.	56
Tabela 4.2. Valores de K_m (mM) e V_{max} (U/g) obtidos para as diferentes preparações de lipase em estudo.....	59
Tabela 4.3. Área superficial específica, volume de poros e tamanho médio de poros e do suporte POS-PVA antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio.....	64
Tabela 4.4. Composição elemental superficial da matriz híbrida POS-PVA pura e ativada com metaperiodato de sódio ($NaIO_4$)	68
Tabela 4.5. Teores de umidade e atividade hidrolítica dos derivados imobilizados em suporte POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio.....	69

LISTA DE SIGLAS

HDL	High Density Lipoprotein (lipoproteína de alta densidade – “colesterol bom”)
K_m	Constante de Michaelis-Menten (mM)
L034P	Lipomod TM 34P
L036P	Lipase L036P
L338P	Lipomod TM 338P
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade – “colesterol ruim”)
NaIO₄	Metaperiodato de sódio
OOO	Trioleína
PEG	Polietilenoglicol
POS-PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
PPP	Tripalmitina
PVA	Álcool polivinílico
TAG	Triglicerídeo
TEOS	Tetraetilortossilicato
V_{máx}	Velocidade máxima (U/g)

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Lipases e suas aplicações.....	18
2.1.1. <i>Lipases</i>	18
2.1.2. <i>Reações catalisadas por lipases</i>	20
2.1.3. <i>Interesterificação catalisada por lipase</i>	22
2.1.4. <i>Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente</i>	24
2.2. Imobilização das Lipases.....	27
2.2.1. <i>Vantagens</i>	27
2.2.2. <i>Técnicas de Imobilização</i>	28
2.2.3. <i>Suportes para imobilização</i>	30
2.2.4. <i>Imobilização em polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)</i>	30
2.3. Óleos e gorduras	32
2.3.1. <i>Aspectos gerais</i>	32
2.3.2. <i>Ácidos graxos essenciais</i>	34
2.3.3. <i>Óleos e gorduras como alimentos funcionais</i>	35
2.3.4. <i>Consumo de gordura TRANS</i>	36
2.4. <i>Interesterificação da gordura do leite com óleo de soja</i>	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	45
3.1.1. <i>Enzimas</i>	45
3.1.2. <i>Substratos</i>	45
3.1.3. <i>Matérias-primas</i>	46
3.1.4. <i>Outros materiais e reagentes</i>	46
3.2. Principais equipamentos	46
3.3. Procedimento experimental	47
3.3.1. <i>Obtenção do suporte</i>	47
3.3.2. <i>Ativação do suporte</i>	47
3.3.3. <i>Imobilização das lipases comerciais</i>	48
3.3.4. <i>Reações de interesterificação em sistema modelo com tripalmitina e trioleína</i>	48
3.3.5. <i>Condições reacionais da interesterificação da gordura do leite com óleo de soja</i>	48
3.4. Métodos de Análise	49
3.4.1. <i>Caracterização bioquímica, cinética e de estabilidade das enzimas livres e dos derivados imobilizados</i>	49
3.4.2. <i>Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização, das enzimas livres e sistema imobilizado</i>	51
3.4.3. <i>Acompanhamento das reações de interesterificação</i>	53

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Propriedades das lipases em estudo na sua forma livre.....	56
4.1.1. <i>Atividade hidrolítica das lipases comerciais</i>	56
4.1.2. <i>Cinética da hidrólise de azeite de oliva catalisada pelas lipases em estudo</i>	57
4.1.3. <i>Aplicação das lipases em estudo em meio orgânico</i>	61
4.2. Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)	63
4.2.1. <i>Porosidade e resistência mecânica</i>	64
4.2.2. <i>Análise por espectroscopia no infravermelho e difratometria de Raios X</i>	66
4.2.3. <i>Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e análise elemental superficial</i>	67
4.3. Imobilização das lipases em polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA).....	68
4.3.1. <i>Rendimento de imobilização</i>	68
4.3.2. <i>Atividade de esterificação dos derivados imobilizados</i>	69
4.4. Aplicação das lipases imobilizadas em reações de interesterificação da tripalmitina e trioleína empregando hexano como solvente	72
4.4.1. <i>Seleção do biocatalisador</i>	72
4.4.2. <i>Aplicação da lipase selecionada em reações de interesterificação com variação da concentração de substrato</i>	77
4.5. Caracterização do derivado imobilizado selecionado	80
4.5.1. <i>Análise por espectroscopia no infravermelho e difratometria de Raios X</i>	80
4.5.2. <i>Análise granulométrica do derivado imobilizado selecionado</i>	82
4.5.3. <i>Estabilidade á estocagem</i>	83
4.6. Aplicação da lipase imobilizada selecionada em reações de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja	83
4.6.1. <i>Composição em triglicerídeos das reações catalisadas por lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> (L036)</i>	84
4.6.2. <i>Consistência do produto interesterificado</i>	87
5. CONCLUSÕES.....	89
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	105

1.INTRODUÇÃO

As exigências do consumidor por produtos mais saudáveis, associadas às novas descobertas científicas sobre os efeitos na saúde humana de diversos alimentos, tradicionais ou desenvolvidos mais recentemente pela indústria, têm motivado a busca por processos adequados à produção de alimentos com características específicas. Entre eles, os óleos e gorduras modificadas têm recebido especial atenção, graças à importância do consumo adequado dos mesmos na dieta visando à promoção e manutenção da saúde.

A gordura do leite é uma importante fonte de calorias na dieta e apresenta sabor bastante apreciado quando presente em produtos alimentícios. Entretanto, ela tem sido vista como prejudicial à saúde por conter quantidades razoáveis de colesterol e ácidos graxos saturados, os quais têm implicação no aumento de doenças cardiovasculares. Esta característica, aliada ao fato da gordura do leite ter baixa espalhabilidade sob temperatura de refrigeração doméstica, levou o consumidor a substituir a manteiga por margarinas a base de óleos vegetais hidrogenados. No entanto, há grandes quantidades de ácidos graxos de configuração “trans” em produtos oriundos da hidrogenação parcial de óleos vegetais e o consumo de elevadas quantidades de gorduras contendo estes ácidos graxos tem sido apontado como prejudicial à saúde. Estudos indicam que os ácidos graxos “trans” têm impacto nos níveis de colesterol sanguíneo e provocam aumento nos níveis de LDL (Low Density Lipoprotein) e redução de HDL (High Density Lipoprotein), representando importante fator de risco para as doenças cardiovasculares. O consumo de margarinas com elevado teor de gordura “trans” tem sido, inclusive, apontado como sendo mais danoso à saúde que o simples consumo das gorduras saturadas presentes na manteiga.

As indústrias de alimentos têm procurado desenvolver novas tecnologias visando à obtenção de gorduras mais saudáveis. Um processo interessante é a mistura da gordura do leite com óleos vegetais, o que possibilita a obtenção de produtos com melhores características nutricionais pelo aumento da quantidade de gordura insaturada. Além disso, melhores propriedades de espalhamento sob temperatura de refrigeração doméstica podem ser conferidas à manteiga. Esta mistura, quando associada à interesterificação, pode resultar em diminuição na dureza e no caráter sólido da gordura do leite pela indução de uma grande queda na quantidade de sólidos presentes e mudança na estrutura da rede cristalina.

A obtenção de um produto que alie o sabor da gordura do leite com as características físicas e de composição (menor teor de gordura saturada, presença de ácidos graxos essenciais) desejáveis dos óleos vegetais, pode ser conseguida por processos de interesterificação enzimática dessas matérias-primas.

Particularmente, as lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) representam um grupo de enzimas com grande potencial para modificação de óleos e gorduras visando à obtenção de alimentos funcionais com características específicas. São biocatalisadores de grande importância em diferentes áreas, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Este fenômeno é primariamente devido à sua capacidade de utilização de uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade frente à temperatura, pH e solventes orgânicos, e à sua quimio-regio e enantioseletividade. Estas enzimas têm sido utilizadas em diversos segmentos industriais, como o setor alimentício (desenvolvimento de aromas, maturação de queijos, lipídeos estruturados), farmacológico (síntese de naxopreno, ibuprofeno), agroquímico (inseticidas, pesticidas), oleoquímico (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes), formulação de detergentes e meio ambiente (redução do teor de lipídeos de águas residuárias).

Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo a seleção de lipase comercial a ser empregada na interesterificação da gordura do leite com óleo de soja. Este óleo foi escolhido com base em sua composição química, rica em ácidos graxos insaturados, incluindo os essenciais linoléico e linolênico.

A gordura do leite possui uma faixa de fusão que se estende até temperaturas elevadas. Desta forma, a fim de evitar a solidificação do sistema reacional, uma condição exigida pelo processo é maior temperatura, o que indica o uso de enzima na forma imobilizada. De fato, apenas com o emprego de técnicas de imobilização é possível atingir a estabilização adequada da enzima em processos com elevada temperatura. Além disso, a possibilidade de reutilização do biocatalisador, bem como seu emprego em processos contínuos são vantagens oferecidas por esta técnica.

Deste modo, com base na estabilidade térmica e na possibilidade de aplicação em alimentos, foram pré-selecionadas lipases comerciais das seguintes fontes: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *Penicillium roqueforti* e *Rhizomucor miehei*, as quais foram imobilizadas em matriz híbrida polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), obtida pela técnica sol-gel. Este suporte foi selecionado baseando-se em resultados

satisfatórios anteriormente obtidos no Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP).

Deve-se destacar também que, em função da alta complexidade das matérias-primas “gordura do leite e óleo de soja”, optou-se pela seleção inicial da enzima baseada em um sistema reacional modelo de interesterificação. Como reagentes de partida, foram escolhidos tripalmitina e trioleína, uma vez que os ácidos graxos palmítico e oléico estão presentes em grande quantidade nos triglicerídeos que compõem as matérias-primas de interesse.

Em uma primeira etapa, foi realizada a caracterização das enzimas tanto na forma livre como imobilizada com relação ao seu desempenho em reações de hidrólise de emulsões de azeite de oliva e esterificação em meio orgânico. Antes de se dar início à imobilização das lipases comerciais, fez-se uma caracterização do suporte POS-PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio, quanto às suas propriedades físico-químicas e morfológicas, empregando-se análises de difratometria de Raios-X, microscopia eletrônica de varredura, análise elemental superficial, espectroscopia de infravermelho, porosimetria e resistência mecânica (microdureza). Em etapa posterior, o desempenho das enzimas em estudo foi avaliado nas reações modelo de interesterificação de tripalmitina e trioleína, para seleção dos biocatalisadores. A lipase selecionada foi empregada em reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína em diferentes concentrações. Em seguida, realizou-se a caracterização do biocatalisador selecionado quanto às suas propriedades físico-químicas e de estabilidade. Por último, o desempenho do sistema foi avaliado em reações de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipases e suas aplicações

2.1.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) constituem um importante grupo de enzimas para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), atuando sobre as ligações ésteres presentes na molécula e promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, como a hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reação reversível, o equilíbrio pode ser alterado pelo controle do teor de água do meio reacional (CASTRO; ANDERSON, 1995; JAEGER; REETZ, 1998; LOPEZ-HERNANDEZ; GARCIA; HILL, 2005).

Estas enzimas não requerem cofatores, são regioespecíficas, atuam em uma larga faixa de pH (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004) e apresentam a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Com relação à especificidade, a literatura relata que esta é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação enzima-substrato (JENSEN, 1983). As lipases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade posicional (inespecíficas ou 1,3-específicas) ou quanto à especificidade por ácidos graxos (UHLIG, 1998). Cada um dos tipos de especificidade são apresentados a seguir:

⇒ *Lipases inespecíficas*: nesse caso, todos os ácidos graxos, independentemente da posição que ocupam na molécula de glicerol, são hidrolisados produzindo tanto ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995; CASTRO et al., 2004);

⇒ *Lipases 1,3 específicas*: liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formando produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não regiosseletivas (CASTRO et al., 2004; FREITAS et al, 2006a);

⇒ *Lipases ácido graxo específicas*: atuam especificamente ou preferencialmente na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função de seu tamanho de cadeia ou insaturação (CASTRO et al., 2004; GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003). Um exemplo é a lipase de *Geotrichum candidum*, que mostra elevada seletividade por ácidos graxos insaturados, sendo específica para ligação cis ω -9, com uma preferência pelo ácido oléico em relação ao esteárico por um fator de 100 para 1 (CHARTON; MACRAE, 1993; GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003).

Além disso, lipases podem apresentar ainda especificidade estereoquímica, atuando particularmente sobre um tipo de isômero ótico (QUEIROZ, 2002).

A Tabela 2.1 apresenta a especificidade posicional de algumas lipases disponíveis comercialmente, conforme dados fornecidos pelos fabricantes.

Tabela 2.1. Especificidade natural de algumas lipases disponíveis comercialmente

Lipase	Fonte	Especificidade Natural	Fornecedor
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>	Moderadamente 1,3 específica	Amano (Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão)
Lipase M	<i>Mucor javanicus</i>	Não específica	Amano (Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão)
Lipase L036P	<i>Rhizopus oryzae</i>	Altamente 1,3 seletiva	Biocatalysts (Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra)
Lipomod TM 34P	<i>Candida rugosa</i>	Não específica	Biocatalysts (Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra)
Lipomod TM 338P	<i>Penicillium roqueforti</i>	Moderadamente 1,3 específica	Biocatalysts (Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra)
Piccantase® A	<i>Rhizomucor miehei</i>	Moderadamente 1,3 específica	DSM (DSM Food Specialties, Delft, Holanda)

A versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam selecionadas para aplicações potencias em diversos setores, como: alimentício, de detergentes, farmacêutico, têxtil, cosmético e indústrias de papel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Algumas das principais aplicações estão resumidas na Tabela 2.2 (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Tabela 2.2. Aplicações industriais de lipases microbianas

Indústria	Ação Catalítica	Produto ou aplicação
<i>Detergentes</i>	Hidrólise de gordura	Remoção de manchas de óleos e gorduras
<i>Laticínios</i>	Hidrólise de gordura, amadurecimento do queijo	Desenvolvimento de sabor em leite, queijo e manteiga
<i>Panificação</i>	Melhoria do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
<i>Molhos</i>	Melhoria da qualidade	Maionese, molhos, coberturas
<i>Frigoríficos</i>	Desenvolvimento do sabor	Derivados de carne e peixe, remoção de gorduras
<i>Óleos e Gorduras</i>	Interesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, glicerol, mono e di-glicerídeos
<i>Produtos farmacêuticos</i>	Interesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais, auxiliares digestivos
<i>Cosméticos</i>	Síntese	Emulsificantes, hidratantes
<i>Couro</i>	Hidrólise	Produtos de couro
<i>Papel</i>	Hidrólise	Papel de melhor qualidade
<i>Produtos de limpeza</i>	Hidrólise	Remoção de gorduras

Fonte: TREVISAN (2004)

2.1.2. Reações catalisadas por lipases

Como as lipases são capazes de catalisar tanto a hidrólise quanto a reação inversa - síntese de ésteres (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996), os dois processos básicos podem ser combinados numa sequência lógica para resultar em reações de transesterificação (acidólise, alcoólise e interesterificação), dependendo dos materiais de partida empregados (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995). Assim, as seguintes reações são possíveis (CASTRO et al, 2004):

- 1) Interesterificação, na qual dois grupos acilas são trocados com dois acilgliceróis.

2) Acidólise, na qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um ácido carboxílico.

3) Alcoólise, no qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um álcool.

Todas essas reações são mostradas na Figura 2.1, juntamente com a participação de água no equilíbrio dessas reações, tendo em vista que o teor de água é considerado o fator crítico do processo, podendo afetar diretamente a velocidade de reação, extensão de reações paralelas de hidrólise, rendimentos do produto, atividade da enzima e seletividade da reação.

Entre as reações catalisadas por lipases, a interesterificação é o processo mais usado para obtenção de óleos e gorduras com funções desejáveis na manufatura de produtos específicos. Esse processo constitui-se em um rearranjo na molécula de glicerol possibilitando modificações das propriedades dos óleos e gorduras, por meio de um catalisador, que em sua forma ativa, promove a modificação do perfil de ácidos graxos das cadeias iniciais (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

HIDRÓLISE

ESTERIFICAÇÃO

TRANSESTERIFICAÇÃO

Acidólise (reação de éster com ácido)

Alcoólise (reação de éster com álcool)

Interesterificação (reação de éster com éster)

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases

2.1.3. Interesterificação catalisada por lipase

Interesterificação é a troca controlada de ácidos graxos entre as distintas moléculas de éster, visando à obtenção de produtos com novas propriedades físicas e químicas. É o processo básico de processos como a elaboração das “gorduras feitas sob medida” (MORETTO; FETT, 1998; RODRIGUES; GIOIELLI, 2003), os denominados *Lipídeos Estruturados*. Estes compostos podem ser obtidos por via química ou através da catálise enzimática utilizando lipases como biocatalisadores (SAHIN; AKOH; KARAALI, 2005). O processo enzimático empregando lipases é um conceito relativamente novo da modificação de lipídeos (LOPEZ-HERNANDEZ; GARCIA; HILL, 2005), mas apresenta a vantagem de minimizar a formação de produtos secundários devido à especificidade dessas enzimas (LAMBOURSAIN et al., 1996).

A interesterificação de óleos e gorduras é considerada um caso especial de transferência de grupos acila, pois envolve reações seqüenciais de hidrólise e esterificação (re-síntese) dos triglicerídeos (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995; GRAILLE, 1999; MARANGONI, 2002). Quando catalisada por lipases, esta reação segue um mecanismo de acilação e desacilação no interior do sítio ativo das lipases, conforme mostrado na Figura 2.2 (MARANGONI, 2002). Durante a acilação, um complexo acil-enzima, de natureza covalente, é formado pelo ataque nucleofílico da Serina à carbonila do substrato. A Serina é o agente nucleofílico, cujo poder de atuação é potencializado pela presença dos resíduos de Histidina e Ácido aspártico. Durante a reação, grupamentos acilglicerol associam-se à tríade catalítica do sítio ativo através de ligações covalentes (MARANGONI, 2002).

Além de parâmetros como temperatura, quantidade de enzima e proporção de reagentes, a quantidade de água é fundamental nas reações de interesterificação. Se houver excesso de água, a interesterificação será desfavorecida em benefício da hidrólise. No entanto, sabe-se que a presença de água no meio é necessária para hidratação da proteína, a fim de que sua conformação e, conseqüentemente sua atividade, sejam mantidas (LAMBOURSAIN et al., 1996).

Outro fator de extrema importância nesse processo é a especificidade das lipases, que apresentam diferentes comportamentos de reações na interesterificação de óleos e gorduras. Por exemplo, a síntese de lipídeos estruturados substitutos da manteiga de cacau empregam

lipases 1,3-seletivas, enquanto a síntese de lipídeos estruturados enriquecidos com ácido oléico requer o uso de lipases ácido graxo específicas (GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003).

Figura 2.2. Reações envolvidas no sítio catalítico das lipases: mecanismo de interesterificação

Por último, a definição da variável empregada para acompanhamento do avanço da reação é outro fator importante no estudo destes processos. Lamboursain et al. (1996), na reação de tripalmitina com trioleína catalisada por LipozymeTM, avaliaram a interesterificação através da taxa de interesterificação e do grau de hidrólise. Nesse caso, a reação foi acompanhada pela medição direta da alteração na composição em triglicerídeos da mistura (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995). No entanto, medidas indiretas, relacionadas à alterações nas propriedades físicas do meio reacional, como alteração na cor, ponto de fusão e conteúdo de gordura sólida (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995; GIOIELLI, 1998) também podem ser utilizadas para a avaliação da reação.

2.1.4. Exemplos de lipases microbianas disponíveis comercialmente

As lipases podem ser obtidas de diferentes fontes: animal, vegetal ou microbiana (GUPTA; RATHI; BRADDOO, 2003). Entretanto, as lipases de origem microbiana são as mais utilizadas devido à grande variedade de atividade catalítica disponível, à disponibilidade regular no mercado e por possuírem maior estabilidade do que as correspondentes de origem animal ou vegetal (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, do ponto de vista econômico e industrial, lipases oriundas de microrganismos são preferíveis às de fontes animais e vegetais, devido ao alto custo do isolamento destas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Algumas características das lipases que serão empregadas no presente trabalho (Lipase A, Lipase M, Piccantase A, Piccantase R8000, L034P, L036P e L338P), são descritas a seguir. Deve-se destacar que todas estas lipases são de grau alimentício.

Aspergillus niger (Lipase A)

Esta se trata de uma espécie muito conhecida do gênero *Aspergillus* (SARIYAR; HEPERKAN, 2003). É uma enzima capaz de hidrolisar ácidos graxos de cadeia média e longa, nas posições 1 e 3 da molécula de triacilglicerol, podendo ser aplicada em reações de interesterificação. Lipase de *Aspergillus niger* não somente é capaz de hidrolisar ésteres de ácido oléico, como trioleína, mas exibe também uma ampla especificidade ao substrato (SARIYAR; HEPERKAN, 2003).

Mucor javanicus (Lipase M) e *Rhizomucor miehei* (Piccantase A)

Lipases destas espécies têm sido usadas mais recentemente como biocatalisadores em diversos processos. Com relação à necessidade estérica do substrato, elas se parecem com as lipases de *Pseudomonas sp.*, e são similares a *Candida sp.* e a *Pseudomonas sp.*, quanto a sua especificidade hidrolítica. Apresentam massa molar de 33 KDa e a preparação comercial contém cerca de 25-57% de proteína (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Lipase de *Mucor javanicus* tem sido aplicada na modificação da gordura do leite visando a produção de manteiga com alto teor de ácido oléico e baixo teor de ácidos graxos saturados de média e longa cadeia, devido à sua capacidade de quebrar estes ácidos (BALCÃO; MALCATA, 1998).

A lipase de *Rhizomucor miehei* é uma enzima com elevada seletividade na produção de monoésteres opticamente puros (FABER, 1997; ALCANTARA; FUENTES; SINISTERRA, 1998). Além disso, outros estudos relataram sua aplicação na produção de lipídeos estruturados com ácidos graxos essenciais localizados na posição 2 (SOUMANOU et al.; 1997). A Piccantase® A hidrolisa, preferencialmente, ácidos graxos de cadeia longa. A Figura 2.2 compara a composição da manteiga em relação aos ácidos graxos presentes na matéria-prima e no hidrolisado obtido na reação catalisada por esta lipase.

Figura 2.3. Porcentagem de ácido graxo obtido na hidrólise da manteiga catalisada por Piccantase A ¹

¹ Piccantase ® and Piccantase ® R8000: Fungal esterase-lipase enzymes. Publicação interna disponibilizada pela empresa DSM Food Specialties.

***Rhizopus oryzae* (L036P e Piccantase R8000)**

Lipases de *Rhizopus oryzae*, microrganismo também denominado *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. niveus*, *R. delemar* e *R. rhizopodiformis* (UHLIG, 1998), possuem peso molar de 28-67 kDa e são compostas por diferentes isoformas com pontos isoelétricos distintos. Lipases deste microrganismo mostram identidades com a lipase de *Rhizomucor miehei* (UYTTENBROECK et al., 1993; SAXENA et al., 2003). Tipicamente usada como suplemento alimentar, as lipases de *Rhizopus oryzae* apresentam boa estabilidade entre valores de pH de 3 à 8. As lipases da espécie *Rhizopus* possuem aplicações biotecnológicas em setores industriais, tais como: processamento de óleos, produção de surfactantes e produção de fármacos enantomericamente puros (ODA et al., 2003). A Piccantase® R8000 hidrolisa, preferencialmente, ácidos graxos de cadeia curta. A Figura 2.3 compara a composição da manteiga em relação aos ácidos graxos presentes na matéria-prima e no hidrolisado obtido na reação catalisada por esta lipase.

Figura 2.4. Porcentagem de ácido graxo obtido na hidrólise da manteiga catalisada por Piccantase R8000²

² Piccantase ® and Piccantase ® R8000: Fungal esterase-lipase enzymes. Publicação interna disponibilizada pela empresa DSM Food Specialties.

***Candida rugosa* (L034P)**

Amostras comerciais de lipases de *Candida rugosa* (anteriormente denominada *Candida rugosa*) contêm cerca de 2-11% de proteína (WEBER; STECHER; FABER, 1995) e o restante compreende açúcares e cargas inertes. Eletroforese em gel mostra uma proteína isolada com peso molar de 63 kDa quando analisada por *Comassie blue*, no entanto, análises mais sensíveis revelam uma pequena quantidade de outras proteínas. A biologia molecular tem produzido cinco diferentes isoformas de lipase de *Candida rugosa*, todas elas possuindo massas molares semelhantes (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). A lipase de *Candida rugosa* é classificada como inespecífica, tendo a habilidade de liberar ácidos graxos independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 1997).

***Penicillium roqueforti* (L338P)**

Lipases de *Penicillium roqueforti*, hidrolisam preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta localizados nas posições 1-3 da molécula de triglicerídeo. Estas enzimas hidrolisam, em ordem decrescente, tributirina, tricaprilina, tricaprina, trimiristina e trioleína (UHGLI, 1998). Atualmente têm sido utilizadas em reações de esterificação (CHOWDARY; PRAPULLA, 2002) e para conferir sabores específicos em queijos (BALCÃO; MALCATA, 1997).

2.2. Imobilização das Lipases**2.2.1. Vantagens**

A utilização de lipases tem sido limitada por alguns fatores como baixa estabilidade sob condições de operação, alto custo de obtenção da enzima, desde seu isolamento até sua purificação, e dificuldade de recuperação e reutilização do biocatalisador. Estes fatores restringem o uso de enzimas solúveis (ZANIN; MORAES, 2004). Portanto, o desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por propiciar a reutilização destas enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004), além de alterar as propriedades catalíticas e físico-químicas da enzima em relação à sua forma solúvel,

conferindo, por exemplo, maior estabilidade ao pH e à temperatura (ZANIN; MORAES, 2004).

Enzimas imobilizadas são enzimas fisicamente confinadas numa certa região do espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usadas repetida e continuamente, enquanto o sistema enzimático se mantiver ativo (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000; ZANIN; MORAES, 2004). Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais danosas à atividade catalítica, bem como modificações no sítio ativo (GANDHI, 1997).

2.2.2. Técnicas de Imobilização

Os principais métodos de imobilização são apresentados na Figura 2.5 e as principais características, vantagens e desvantagens de cada um deles são apresentados na Tabela 2.3. A seleção de um procedimento de imobilização envolve a escolha do suporte e da ligação da enzima-suporte (MALCATA et al., 1992; BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996). Apesar da grande diversidade de métodos de imobilização existentes, não há um método aplicável para todas as enzimas. Isto porque existem diferenças relacionadas às características e composição química das enzimas, diferentes propriedades de substrato e produto e à finalidade de aplicação do produto obtido (ZANIN; MORAIS, 2004).

Nesse trabalho, optou-se pela utilização do método de **Ligação Covalente**, baseado numa forte interação entre a enzima e o suporte (ZANIN; MORAES, 2004). De acordo com Cao (2006), ligação covalente foi o segundo método desenvolvido para imobilização de enzimas, sendo precedido apenas pela adsorção. Esta técnica tem sido desenvolvida desde 1950, e tornou-se o método mais difundido e pesquisado. Por tratar-se de uma ligação forte, o derivado imobilizado obtido é estável, não permitindo que a enzima se desprenda do suporte em presença do substrato ou de soluções de alta concentração iônica (ZANIN; MORAES, 2004; CAO, 2006). O procedimento de imobilização é realizado por meio da ligação covalente entre os grupos funcionais não ativos da enzima (grupos não essenciais para sua atividade catalítica) e os grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, entre outros) presentes na superfície sólida do suporte (ZANIN; MORAES, 2004).

Figura 2.5. Principais métodos de imobilização de enzimas

Tabela 2.3. Características, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas

Método	Características	Vantagens	Desvantagens
<i>Adsorção Física</i>	A enzima é imobilizada sobre um suporte sólido por ligações fracas: Forças físicas (Van der Waals) ou por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligação iônica ; Parâmetros: tamanho da proteína a ser adsorvida, área específica do suporte, natureza da superfície (porosidade e tamanho dos poros).	Simplicidade; Pouca mudança na conformação do catalisador;	Fragilidade da ligação; Dessorção do catalisador por flutuações de pH, forças iônicas, temperatura;
<i>Ligação Covalente</i>	Ligação covalente entre a enzima e o suporte com a utilização de um agente de ativação.	Ligação estável entre a enzima e o suporte, evitando o fenômeno de dessorção;	Preparação mais difícil e de maior custo;
<i>Ligação Cruzada</i>	Ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais.	Enzimas fortemente ligadas ao suporte: difícil perda	Perda de atividade enzimática durante a preparação; Não é possível a regeneração do suporte;
<i>Confinamento: Matriz ou Microcápsula</i>	Inclusão da enzima em matrizes poliméricas ou em micro-cápsulas	Enzima não interage quimicamente com o suporte, evitando desnaturação.	Instabilidade em presença de íons com cargas opostas

Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI (2004); ZANIN; MORAES (2004); CAO (2006).

2.2.3. Suportes para imobilização

Os principais componentes de um sistema imobilizado são a enzima, o suporte e o método de imobilização. Destes, com exceção da enzima, a maior contribuição para o bom desempenho da biocatalisador é dada pelo suporte.

Na seleção de um suporte para determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. Um suporte sólido ideal deve possuir as seguintes propriedades: (i) contribuições da superfície do suporte como: pH, carga de superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, possibilidade de adsorver outras substâncias além das enzimas; (ii) morfologia; (iii) composição e (iiii) resistência ao ataque microbiológico (ZANIN; MORAES, 2004).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido investigado para efetuar imobilização de lipases (BALCÃO; PAIVA; MALCATA, 1996; VILLENEUVE et al., 2000). Alguns materiais citados na literatura como suportes para a imobilização de lipases são: polímeros polares como metacrilato de metila (BASRI et al., 1996), polímeros sintéticos anfifílicos como polietilenoglicol (HERNÁIZ; SÁNCHEZ-MONTERO; SINISTERRA, 1999) ou hidrofóbicos como o Accurel (AL-DURI; YONG, 1997) e suportes inorgânicos, como sílica de porosidade controlada (SOARES et al., 1999).

2.2.4. Imobilização em polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)

Uma das principais rotas de obtenção de materiais híbridos orgânico-inorgânicos é o processo sol-gel (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995). Este processo permite a síntese de uma rede inorgânica e amorfa, por uma reação química em solução, sob baixa temperatura. Segundo Gill e Ballesteros (2000), consiste na hidrólise de um precursor, um alcóxido, por exemplo, seguida de polimerização e separação de fase para formar um óxido hidrogel hidratado. A secagem ou extração de água leva à remoção da fase líquida, produzindo um óxido xerogel poroso e seco. As reações de hidrólise e condensação são mostradas na Figura 2.4, na qual a etapa (1) corresponde à hidrólise e a (2) corresponde à policondensação do silano.

As vantagens desta técnica são a homogeneidade e pureza dos géis formados e temperatura de síntese relativamente baixa. A técnica sol-gel também é um excelente método

para preparação de materiais híbridos. A baixa temperatura da síntese possibilita que espécies orgânicas ou inorgânicas sejam incorporadas em uma matriz rígida de óxido de silício sem que ocorra degradação. O composto resultante combina as propriedades físicas e químicas do material “hóspede” com uma excelente estabilidade óptica, térmica e química da matriz “hospedeira” de óxido de silício (LIMA-BARROS et al., 2002).

Figura 2.6. Reações de hidrólise e policondensação do silano (COELHO et al., 2003).

No Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) testou-se com sucesso uma nova matriz híbrida (polissiloxano-álcool polivinílico, POS-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase: *Mucor miehei* (BRUNO et al., 2005), *Candida rugosa* (BRAGA, 2005), *Candida antartica* (FREITAS, 2006) e Pancreática (PAULA et al., 2007).

Essa matriz combina os atributos físico-químicos de materiais inorgânicos e orgânicos, permitindo a manipulação da hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, capacidade tamponante, condutividade elétrica, carga iônica, porosidade e propriedades mecânicas em geral (GILL; BALLESTEROS, 1998), bem como elevada atividade e estabilidade.

Considerando esses resultados promissores, neste trabalho, utilizou-se como suporte o composto POS-PVA para imobilização das lipases. Metaperiodato de sódio foi utilizado como agente de ativação do suporte para garantir uma ligação covalente com a enzima. Neste caso, o emprego do agente de ativação resulta na oxidação de grupos “OH” livres na matriz do POS-PVA, resultando em grupos aldeído, conforme proposto por Carneiro-da-Cunha et al. (1999). Os grupos aldeído formados podem assim se ligar a grupos -NH₂ livres da enzima.

2.3. Óleos e gorduras

2.3.1. Aspectos gerais

Os óleos e as gorduras representam um grupo diversificado de matérias-primas, usado na produção de alimentos e com amplo leque de aplicações industriais. São substâncias de origem animal ou vegetal, cujos principais componentes são os triglicerídeos (TAG), ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos. A Figura 2.7 representa a reação entre uma molécula de glicerol e três ácidos graxos para a formação de uma molécula de triglicerídeo.

Figura 2.7. Representação esquemática da reação entre uma molécula de glicerol e três ácidos graxos para a formação do triglicerídeo. As letras R_1 , R_2 e R_3 representam a cadeia carbônica dos ácidos graxos ligados ao glicerol.

A diferenciação entre óleos e gorduras baseia-se no estado físico destes compostos à temperatura ambiente (BALCÃO; MALCATA, 2002). Os óleos caracterizam-se por sua forma líquida, ao passo que as gorduras se apresentam sólidas (LAWSON, 1995). As propriedades dos óleos e das gorduras dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos (GHOTRA; DYAL; NARINE, 2002; SAMBANTHAMURTI; SHAHRUL; PARVEEZ, 2005), principais componentes dos triglicerídeos.

Podem-se distinguir dois tipos principais de ácidos graxos: os saturados, que contêm uma única ligação entre os átomos de carbono, e os insaturados, que contêm dupla ligação entre carbonos (MORRETO; FETT, 1998). A diferença na estrutura dos ácidos graxos saturados e insaturados pode ser melhor observada na Figura 2.8.

Figura 2.8. Estrutura de um ácido graxo saturado (a) e insaturado (b)

Quando um ácido graxo contém uma dupla ligação, é chamado monoinsaturado, assim como, os que apresentam mais de uma dupla ligação entre carbonos se denominam ácidos graxos poliinsaturados. Quando dois ácidos graxos são semelhantes, com exceção apenas da posição da dupla ligação entre carbonos, são chamados de isômeros posicionais. Embora as ligações duplas normalmente ocorram em uma posição não conjugada (Figura 2.9.a), podem também acontecer em uma posição conjugada, ou seja, alternada apenas por uma ligação simples (Figura 2.9.b).

Figura 2.9. Ácidos graxos com ligação não conjugada (a) e ligação conjugada (b).

Sabe-se que o conteúdo de gordura ingerido pelo homem através dos alimentos é muito importante, uma vez que o aumento da incidência de doenças do coração e das vias circulatórias relaciona-se ao modo de alimentação (MORETTO; FETT, 1998).

As gorduras têm duas funções importantes na alimentação humana: fornecer energia (função mais conhecida) e transportar agentes químicos orgânicos solúveis em óleos: os *ácidos graxos essenciais*, as vitaminas e os hormônios óleo-solúveis (SAMBANTHAMURTI; SHAHRUL; PARVEEZ, 2005). Além disso, é sabido que o valor nutricional dos óleos e gorduras depende de sua composição em ácidos graxos (SAMBANTHAMURTI; SHAHRUL; PARVEEZ, 2005). A Tabela 2.4 (MORETTO; FETT, 1998), apresenta a composição em ácidos graxos do óleo de soja e da manteiga, em relação ao total de ácidos graxos.

Tabela 2.4. Composição de ácidos graxos: manteiga e óleo de soja.

	Ácidos graxos saturados	Ácidos graxos mono-insaturados	Ácidos graxos di-insaturados	Ácidos graxos poli-insaturados
<i>Gordura do leite</i>	56-70	20-30	2-4	0
<i>Óleo de soja</i>	12-14	22-25	50-55	7

2.3.2. Ácidos graxos essenciais

A importância destes ácidos na dieta humana foi assunto de grande interesse nas últimas décadas (CARVALHO et al., 2003). Ácidos graxos essenciais são aqueles cujo organismo humano é incapaz de produzir, tornando-se necessária sua ingestão através da alimentação (MORETTO; FETT, 1998; SANT'ANA, 2004). São importantes no crescimento, manutenção e funcionamento de processos fisiológicos, podendo ser encontrados nos óleos vegetais convencionais (FREITAS et al, 2006b).

Existem dois ácidos graxos essenciais: ácido linoléico (ômega-6, C18:2) e ácido linolênico (ômega-3, C18:3). Estes ácidos contêm duas ou mais insaturações e são chamados poliinsaturados. Após a ingestão, os ácidos graxos, uma vez absorvidos por células e tecidos, transformam-se em outros ácidos poliinsaturados de cadeia longa (FREITAS et al, 2006b). As reações de modificação dos ácidos linoléico e α -linolênico ocorrem nos animais e, vagarosamente, nos homens originando diversos metabólitos, como representado no esquema 2.1 (CARVALHO et al., 2003).

Esquema 2.1. Metabolismos dos ácidos graxos essenciais

Família ω 6	Enzimas envolvidas	Família ω 3
Linoléico (18:2)		α - Linolênico (18:3)
↓	Δ -6 dessaturase	↓
γ - Linoléico (18:3)		Octadecatetraenóico (18:4)
↓	alongase	↓
Dihomo- γ - Linolenico (20:3)		Eicosatetraenóico (20:4)
↓	Δ -5 dessaturase	↓
Araquidônico (20:4)		Eicosapentaenóico (20:5)
↓	alongase	↓
Adrenico (22:4)		Docosapentaenóico (22:5)
↓	Δ -4 dessaturase	↓
Docosapentaenóico (22:5)		Docosaheptaenóico (22:6)

O ácido linoléico está presente em grande quantidade nos óleos de milho e soja, enquanto o linolênico pode ser encontrado em vegetais de folhas verdes, no óleo de linhaça e nos óleos de peixes marinhos (FIRESTONE, 2006).

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega atuam em processos fisiológicos normais, sendo responsáveis pela geração e estocagem de energia; manutenção da estrutura, integridade e funcionamento das membranas plasmáticas. A ingestão de níveis adequados destes ácidos graxos também tem um importante papel na prevenção e modulação de várias doenças como: doenças coronarianas, câncer de mama, próstata e colon e artrite reumatóide (FAGUNDES, 2002; SANT'ANA, 2004).

Considerando os efeitos benéficos na saúde, as recomendações da razão entre $\omega 6/\omega 3$ que deve ser observada na dieta causam controvérsias. Alguns órgãos acreditam ser mais eficiente estabelecer níveis de Ingestão Adequada (IA) para os ácidos graxos individualmente. A “International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids” (ISSFAL), por exemplo, é uma sociedade de cientistas, profissionais da saúde, administradores e educadores que têm discutido e estabelecido padrões de ingestão dos ácidos graxos. Esta sociedade estabeleceu uma IA para o ácido linoléico de 4,44 g/dia (ou 2% do total de energia ingerida), e de 2,22 g/dia (ou 1% do total de energia ingerida) para o ácido linolênico (SANT'ANA, 2004).

2.3.3. Óleos e gorduras como alimentos funcionais

Alimentos funcionais, também denominados nutracêuticos, são alimentos (ou ingredientes de alimentos) que podem proporcionar, além das necessidades nutricionais básicas, efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, como a prevenção e o tratamento de doenças (HASLER, 1998).

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada aos efeitos negativos associados à ingestão excessiva de certos óleos e gorduras. Recentemente, verificou-se que o consumo de determinados óleos e gorduras causa efeito positivo à saúde por conterem compostos essenciais ao crescimento, manutenção da saúde e prevenção de doenças (WILLIS; MARANGONI, 1999).

Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos relacionados ao comprimento de cadeia e da insaturação, o interesse no uso de óleos e gorduras para o tratamento e prevenção de doenças aumentou. Por isso, atualmente, muito tem se falado na

síntese dos *lipídeos estruturados*, definidos como lipídeos que foram modificados quimicamente ou enzimaticamente (AKOH, 2005), com o objetivo de conferir características específicas aos triglicerídeos. A síntese de *lipídeos estruturados* empregando lipases permite não somente modificar ou melhorar as características físicas (ponto de fusão, viscosidade, consistência) ou químicas (estabilidade oxidativa) dos óleos e gorduras, mas também conferir uma ou mais propriedades nutricionais (presença ou ausência de ácidos graxos saturados ou insaturados específicos) aos triglicerídeos (AKOH, 2005; IWASAKI; YAMANE, 2000; LEE; AKOH, 1998).

A relação entre a ingestão de determinados tipos de ácidos graxos, através do consumo de óleos e gorduras, os níveis de colesterol e o risco de doenças cardiovasculares, promovem efeitos significativos à saúde (AKOH, 2005). Além disso, nos últimos 15 anos, estudos metabólicos confirmam que ácidos graxos do tipo *trans* são prejudiciais (AKOH, 2005). A seguir, são apresentados os principais aspectos relacionados ao consumo destes ácidos graxos.

2.3.4. Consumo de gordura TRANS

Os ácidos graxos insaturados também podem ser classificados quanto à isomeria geométrica, em *cis* ou *trans*, dependendo da configuração dos átomos de hidrogênio anexados às duplas ligações de carbono. Quando os hidrogênios da dupla ligação se encontram do mesmo lado do plano, são chamados isômeros *cis*. Nesse caso, a cadeia carbônica, na região da dupla ligação, é uma estrutura rígida em forma de arco constituída ao longo do ácido graxo. Ao contrário, quando os hidrogênios estão em lados opostos em relação à cadeia de hidrocarbonetos, a região da dupla ligação é denominada *trans* e o ácido graxo apresenta-se praticamente como uma cadeia linear (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). A Figura 2.5 (WINTER, 2006) representa a configuração dos dois isômeros.

Figura 2.10. Representação dos isômeros *cis* e *trans* de ácidos graxos

As ligações *trans* são praticamente inexistentes em óleos e gorduras de origem vegetal não-refinados. No entanto, pequenas porções de isômeros *trans* podem ser formadas durante reações químicas, como a oxidação que ocorre durante a extração, refinação e armazenamento dos óleos vegetais. Podem ser encontrados isômeros *trans* em teores relativamente maiores em óleos e gorduras de origem animal e em grandes quantidades nas gorduras modificadas pelo processo de hidrogenação parcial de óleos vegetais ou marinhos (CHIARA et al.; 2002).

A hidrogenação dos óleos é um processo no qual um hidrogênio é adicionado à dupla ligação carbono – carbono dos ácidos graxos, ocorrendo modificação da gordura vegetal hidrogenada do estado líquido para o estado sólido ou semi-sólido. Esse processo permite o aumento da estabilidade oxidativa, prolongando o tempo de prateleira do produto (TORRES, 2002).

Além disso, durante os últimos anos, o processo de hidrogenação foi base para a obtenção de margarinas visando à substituição da manteiga. As margarinas são fontes convencionais dos dois ácidos graxos essenciais (AKOH, 2005). No entanto, as margarinas comuns obtidas por hidrogenação são ricas em ácidos graxos *trans*, fazendo com que as vantagens do uso da margarina sobre a manteiga sejam diminuídas (AKOH, 2005; KATAN, 2000). Além da margarina, as principais fontes de gordura *trans* são bolachas, sorvetes, pipoca de microondas, salgadinhos de pacotes, refeições fast-food, batata frita, as massas prontas para o consumo e os lanches fritos. A margarina em tablete é normalmente usada em recheios de bolachas, em salgadinhos, tortas e bolos (NEIVA, 2005).

Embora a gordura vegetal hidrogenada apresente maior estabilidade química, sua utilização se caracteriza como uma desvantagem nutricional, devido aos seus elevados índices de ácidos graxos saturados e de ácidos graxos *trans* em sua composição (CAPRILES; ARÊAS, 2005). Por ser de origem vegetal, a gordura hidrogenada foi tida como uma opção mais saudável à gordura saturada. Entretanto, pesquisas científicas demonstraram que a gordura *trans* é mais nociva do que gorduras saturadas e insaturadas do tipo *cis* (AKHO, 2005). Isso porque, durante a solidificação dos óleos vegetais, as moléculas de gordura passam por um rearranjo estrutural que faz com que elas, ao serem ingeridas, facilitem o depósito de LDL nas paredes das artérias coronárias (NEIVA, 2005). De fato, sabe-se que o colesterol, uma lipoproteína que representa um dos compostos mais importantes para o bom funcionamento do organismo, pode ser de dois tipos: *LDL* (Low Density Lipoprotein) ou *HDL* (High Density Lipoprotein). O primeiro, denominado colesterol ruim, acumula-se nas

artérias quando em excesso. O segundo, denominado colesterol bom, auxilia na remoção das gorduras encontradas nas paredes das artérias (HORNSTRA, 1999; HUI, 1993). A gordura *trans*, além de resultar em aumento no teor de LDL no organismo, reduz as quantidades de uma proteína essencial à produção do bom colesterol, o HDL, e facilita o depósito de tecido adiposo no abdômen (NEIVA, 2006).

A Figura 2.6 (BARRERA-ARELLANO, 2006) faz uma comparação entre a razão LDL/HDL do colesterol no sangue, a partir da ingestão de diferentes tipos de gordura. Pode-se observar que o consumo de gordura *trans* resulta em maior razão LDL/HDL em comparação com as gorduras saturadas e monoinsaturadas, o que significa que sua ingestão é mais prejudicial à saúde (AKHO, 2005).

Figura 2.11. Razão LDL/HDL do colesterol, a partir da ingestão de diferentes tipos de gorduras

Muitos países têm mostrado significativa preocupação com respeito às informações nutricionais nas rotulagens de alimentos embalados, com a criação de legislações que evidenciem essa inquietude com a saúde futura. Uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) obrigou todos os fabricantes de alimentos industrializados à informarem no rótulo de seus produtos a quantidade de gordura *trans* neles contida (NEIVA, 2006). A Figura 2.7 apresenta uma classificação de algumas gorduras, relacionando as principais fontes onde podem ser encontradas e alguns riscos relacionados à saúde.

Figura 2.12. Classificação dos principais tipos de gorduras com relação à recomendação de sua ingestão baseada no risco a saúde humana

2.4. Interesterificação da gordura do leite com óleo de soja

Segundo Balcão e Malcata (2002), o leite tem sido descrito como um dos alimentos naturais mais próximos da perfeição, devido particularmente ao seu elevado teor de nutrientes, incluindo proteínas, gorduras, açúcares, minerais e vitaminas. Com relação especificamente à gordura do leite, adicionalmente ao fato de ser uma importante fonte de lipídeos na dieta, a mesma confere excelente aroma e sabor, além de qualidade superior nas diversas impressões sensoriais do alimento na boca.

A gordura do leite é uma mistura de mais de 100000 tipos diferentes de triacilgliceróis que contêm cerca de 400 diferentes ácidos graxos, entre eles uma grande porcentagem de ácidos graxos hipercolesterolêmicos (saturados de cadeia média) localizados predominantemente na posição *sn*-2 do triacilglicerol (BALCÃO; MALCATA, 2002). Essa sua composição tão variada é responsável pelo sabor e propriedades físicas únicas (BALCÃO et al., 1998; ROUSSEAU et al., 1996). A Tabela 2.5 apresenta a composição típica da manteiga em ácidos graxos.

Tabela 2.5. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) da gordura do leite

Ácido Graxo	Gordura do Leite (manteiga)
Ácido butírico C4:0	2,8-4,0
Capróico C 6:0	1,4-3,0
Caprílico C 8:0	0,5-1,7
Cáprico C 10:0	1,7-3,2
Láurico C:12	2,2-4,5
Mirístico C 14:0	5,4-14,6
Miristoléico C 14:1	0,6-1,6
Palmítico C 16:0	25,0-41,0
Palmitoléico C16:1	2-6
Esteárico C 18:0	6-11
Oléico C18:1	18,7-33,4
Linoléico C18:2	0,9-3,7
Linolênico C18:3	0,5

Fonte: FIRESTONE (2006)

De acordo com German e Dillard (1998), a gordura do leite é plástica, pois à temperatura ambiente é sólida. Essa plasticidade é um elemento muito importante na utilização da gordura do leite como ingrediente, já que os óleos vegetais precisam ser hidrogenados para produzir a plasticidade necessária aos “spreads”, ou substitutos da

manteiga. A manteiga é completamente líquida acima de 40°C e completamente sólida abaixo de -40°C. Entre esta faixa, é uma mistura de gordura e óleo. Assim, a gordura do leite possui uma ampla faixa de fusão e o fato de gordura e óleo coexistirem e se fundirem gradualmente nessa faixa de temperatura oferece atributos sensoriais e textura desejáveis (GERMAN; DILLARD, 1998).

A portaria n.º 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) afirma que a gordura do leite deve ser a única gordura presente manteiga, que é uma emulsão de água em óleo. A gordura é que determina as principais características físicas da manteiga, correspondendo à cerca de 85% de sua composição. O restante é formado pelo soro e sólidos não gordurosos do leite.

Sob temperatura de refrigeração, a espalhabilidade doméstica da manteiga é baixa (ROUSSEAU et al., 1996; BALCÃO et al., 1998). A espalhabilidade é significativamente influenciada pela firmeza da manteiga e em partes pelo teor de gordura sólida e conteúdo de ácidos graxos. Quanto maior o teor de gordura sólida e o teor de ácidos graxos saturados da gordura do leite, maior será sua firmeza e conseqüentemente, menor a espalhabilidade (KAWANARI, 1996).

A gordura do leite possui alguns inconvenientes para a saúde, como a riqueza em gorduras saturadas (Tabela 2.5). Além disso, apesar de seu sabor apreciado por grande parte dos consumidores, a manteiga é considerada um produto caro e o fato do consumo excessivo deste tipo de gordura estar associado ao surgimento de doenças cardiovasculares (BALCÃO et al., 1998; RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003) tem levado o consumidor a preferir um produto refrigerado mais espalhável e saudável.

A substituição da manteiga pelas margarinas ou cremes vegetais tem levado a indústria a buscar a modificação da gordura do leite, visando o aumento das alternativas para uso desta matéria-prima (BALCÃO et al., 1998). Entre os processos considerados, a interesterificação da gordura do leite com óleos vegetais têm o potencial de resultar em produtos que combinem características nutricionais e organolépticas desejáveis com baixos custos de produção (MARANGONI; ROUSSEAU, 1998; RODRIGUES; GIOIELLI; ANTON, 2003).

A interesterificação química ou enzimática permite a alteração das propriedades de espalhabilidade, devido à modificação nas propriedades físicas da manteiga introduzida pela redistribuição dos ácidos graxos entre os triacilgliceróis (ROZENAAL, 1992; JIMÉNEZ-

FLORES, 1997; GIOIELLI, 1998). A interesterificação química promove uma redistribuição aleatória dos ácidos graxos e exige etapas adicionais de branqueamento e desodorização do produto final. Estas etapas podem ter efeitos nutricionais prejudiciais, além de extinguirem o sabor da manteiga tão apreciado pelos consumidores (BALCÃO; MALCATA, 2002). A interesterificação catalisada por lipases não gera os inconvenientes da via química, e tem sido muito empregada na modificação da gordura do leite. A tabela 2.6 apresenta alguns exemplos de estudos realizados nesta área.

Tabela 2.6. Exemplos de estudos realizados visando à interesterificação enzimática de gordura do leite

Fonte de lipase	Matérias-primas	Referência
<i>Mucor javanicus</i> imobilizada por adsorção em fibras de polipropileno	Gordura do leite anidra	BALCÃO et al., 1998
<i>Rhizopus arrhizus</i> imobilizada por adsorção em polipropileno	Mistura de Gordura do leite anidra e Óleo de Canola	ROUSSEAU; MARANGONI, 1998a e b
<i>Rhizopus arrhizus</i> imobilizada por adsorção em polipropileno	Mistura de Gordura do leite anidra e óleo de Canola	MARANGONI; ROUSSEAU, 1999
<i>Rhizopus arrhizus</i> imobilizada por adsorção em polipropileno	Mistura de Gordura do leite anidra e Estearina de Palma	LAI et al., 2000
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL IM) <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em Accurel EP100 <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM- IM) <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) <i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS-C-I) <i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS-D-I)	Mistura de Gordura do leite anidra e Óleo de colza	RONNE et al., 2005
<i>Candida antarctica</i> (Novozym 435)	Mistura de Gordura do leite anidra e Óleo de girassol	BRYs et al., 2006 BRYs ; WIRKOWSKA; KOWALSKI, 2006

Entre as diversas possibilidades de óleos para interesterificação com gordura do leite, o óleo de soja apresenta potencial para aumento na quantidade de gorduras insaturadas, as

quais têm sido associadas com decréscimo no nível de colesterol no risco de doenças coronárias, bem como à diminuição na probabilidade de desenvolvimento de tumores (McGRADY, 1994). A composição típica em ácidos graxos do óleo de soja é mostrada na Tabelas 2.7, sendo que na Tabela 2.8 pode-se verificar sua composição em triglicerídeos (FIRESTONE, 2006). Verifica-se que o óleo de soja é rico em ácidos graxos insaturados, especialmente os essenciais linoléico e linolênico. Cabe comentar ainda que este óleo é bastante abundante no Brasil, em função do cultivo disseminado da soja. De acordo com projeções realizadas, o Brasil deverá produzir cerca de 57 milhões de toneladas de soja em 2010 (A SOJA, 2007).

Tabela 2.7. Composição típica em ácidos graxos (% em massa) do óleo de soja.

Ácido Graxo	Óleo de Soja
Laurico C:12	0-0,1
Mirístico C 14:0	0-0,2
Palmítico C 16:0	9,7-13,3
Palmitoléico C16:1	0-0,2
Esteárico C 18:0	3-5,4
Oléico C18:1	17,7-28,5
Linoléico C18:2	49,8-57,1
Linolênico C18:3	5,5-9,5
Araquídico C20:0	0,1-0,6
Gadoléico C20:1	0-0,3
Eicosadienóico C20:2	0-0,1
Behênico C22:0	0,3-0,7
Erúcico C22:1	0-0,3
Lignocérico C24:0	0-0,4

Fonte: FIRESTONE (2006)

No óleo de soja, o ácido linoléico (ω -6) é o mais abundante. Com relação ao ácido linolênico (ω -3), entretanto, trata-se de um ácido graxo essencial encontrado em folhas verdes e em sementes oleaginosas, como as de linhaça e soja (FREITAS et al., 2006b). Estes dois ácidos possuem funções indispensáveis ao organismo humano, conforme discutido anteriormente. Desta forma, em função da disponibilidade e do elevado teor de ácidos graxos essenciais, justifica-se a escolha do óleo de soja para a interesterificação com a gordura do leite.

Tabela 2.8. Composição do óleo de soja em triglicerídeos

Triglicerídeo*	Número de carbonos**	Composição (%)
PSO	52	0,5 - 0,7
SOS	54	0,2
PPO	50	0,5 - 0,8
POO	52	2,1 - 3,4
SOO	54	1,0 - 1,2
PPL	50	0,9 - 3,1
PSL	52	2,3 - 3,1
SSL	54	0,7 - 1,1
OOO	54	1,4 - 3,3
POL	52	6,4 - 9,4
SOL	54	1,8 - 4,2
OOL	54	6,3 - 11,8
PLL	52	0,8 - 10,23
SLL	54	2,6 - 6,4
OLL	54	16 - 25,9
LLL	54	17,6 - 20,6
LnLO	54	3,7 - 4,8
LnOP	52	0,3
LnOO	54	0,6
LnLL	54	7,9 - 8,1
LnLP	52	2,4 - 3,7
LnLS	54	2,3
LnLnL	54	1,3 - 3,1
LnLnP	52	0,1
LnLnS	54	0,1
LnLnO	54	0,4

*P: ácido palmítico; S: ácido esteárico; O: ácido oléico;
L: ácido linoleico; Ln: ácido linolênico

** n° de carbonos dos resíduos de ácidos graxos

Deve-se destacar que, em função da alta complexidade das matérias-primas “gordura do leite e óleo de soja”, optou-se pela seleção inicial da enzima baseada em um sistema reacional modelo de interesterificação. Como reagentes de partida, foram escolhidos tripalmitina e trioleína, uma vez que, de acordo com as Tabelas 2.5 e 2.6, os ácidos graxos palmítico e oléico estão presentes em grande quantidade nos triglicerídeos que compõem as matérias-primas de interesse, justificando-se assim a escolha.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Enzimas

Neste trabalho foram utilizadas lipases microbianas das seguintes fontes: *Aspergillus niger* (Lipase A, Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão), *Mucor javanicus* (Lipase M, Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japão), *Rhizopus oryzae* (Lipase L036P, Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra; Piccantase® R8000, DSM Food Specialties, Delft, Holanda), *Candida rugosa* (Lipomod™ 34P, Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra), *Penicillium roqueforti* (Lipomod™ 338P, Biocatalysts, Cardiff, Inglaterra) e *Rhizomucor miehei* (Piccantase® A, DSM Food Specialties, Delft, Holanda). A Tabela 3.1 apresenta os valores ou faixa de valores de pH e temperatura ótima, bem como as atividades declaradas pelo fabricante para cada lipase testada. Com exceção da Piccantase A, cuja atividade hidrolítica é expressa em BGE/g, as atividades das outras lipases são referentes à hidrólise do azeite de oliva. De acordo com o fornecedor, BGE representa a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de ácido graxo por minuto, a partir da tributirina, sob condições adequadas (pH 7,5; 40 °C).

Tabela 3.1. Valores de atividade, temperatura e pH ótimo das Lipases utilizadas neste trabalho (dados fornecidos pelos fabricantes).

Nome Comercial	Fonte microbiana	Condições ótimas		Atividade Declarada (U/g)
		pH	T (°C)	
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>	6,5	45	> 12000
Lipase M	<i>Mucor javanicus</i>	7 a 8	35 a 40	10000
Lipomod L034P	<i>Candida rugosa</i>	5 a 8	40 a 55	115000
Lipase L036P	<i>Rhizopus oryzae</i>	6,5 a 7,5	40	35000
Lipomod L338P	<i>Penicillium roqueforti</i>	5 a 7	40 a 50	4500
Piccantase A	<i>Rhizomucor miehei</i>	8,5	45 e 50	> 2200*
Piccantase R 8000	<i>Rhizopus oryzae</i>	7,0	37 a 60	> 8000

*BGE/g

3.1.2. Substratos

O azeite de oliva comercial (baixa acidez, grau comercial) foi utilizado para determinação da atividade hidrolítica, enquanto *n*-butanol (99%) e ácido butírico, ambos adquiridos da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) foram usados como substratos para

determinação da atividade de esterificação. Trioleína e tripalmitina, ambos adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA), foram empregados como substratos nas reações de interesterificação.

3.1.3. Matérias-primas

Como matérias primas, foram utilizados gordura do leite e óleo de soja. A gordura do leite foi obtida a partir de fusão completa de manteiga comercial (Paulista Extra sem sal, adquirida em um mercado local) sob temperatura de 50-65°C em forno de microondas para desfazer a emulsão, seguida de centrifugação e separação da fase aquosa. O óleo de soja comercial (óleo de soja Liza Tipo 1 Extra filtrado 5 vezes, adquirido em um mercado local) foi utilizado sem tratamento adicional.

3.1.4. Outros materiais e reagentes

O suporte foi preparado pela técnica sol-gel, empregando como precursor Tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Aldrich (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). Os outros reagentes utilizados foram: Heptano p.a. e Hexano p.a. (Reagen Chemical Co, São Paulo, Brasil); Acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha); Etanol comercial 95%; peneira molecular 0,32cm de diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD adquirida da Sigma-Aldrich Chemical; goma arábica em pó, pura e Polietilenoglicol – PEG-1.500 ambos da marca Synth (adquiridos da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) e metaperiodato de sódio p.a. (Nuclear, Casa da Química, Diadema/SP, Brasil). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.2. Principais equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: espectrofotômetro UV-Visível modelo Modelo Cary 50 Conc. Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) para dosagem de proteínas; balança analítica ID 50 Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil) para a determinação dos teores de umidade; para as dosagens de atividade enzimática foram utilizados um banho termostaticado com agitação, Modelo 145 Marconi (MARCONI, Piracicaba, SP, Brasil) e um Titulador

automático Modelo 794 BASIC TITRINO Metrohm (Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica Ltda, São Paulo, SP, Brasil); para a eletroforese das lipases livres foi empregado um aparelho electrophoresis constant-power supply (ECPS 3000/150, Pharmacia Fine Chemicals, AB, Uppsala, Sweden); incubadora MOD. 430 Nova Ética (Nova Ética Produtos e Equipamentos Científicos Ltda., Vargem Grande Paulista, S, Brasil) para imobilização das lipases e reações de interesterificação; cromatógrafo a gás modelo Modelo GC-3800 VARIAN (Varian Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, EUA) para as dosagens dos componentes reacionais; centrífuga Modelo Centra CL2, Thermo IEC (Thermo IEC, Waltham/MA, EUA) para separação da gordura do leite e um Analisador de textura Modelo QTS-25 Brookfield (Brookfield Engineering Laboratories, Inc, Middleboro, MA, USA) para determinação das propriedades texturais.

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Obtenção do suporte

O composto híbrido de polissiloxano-álcool polivinílico foi sintetizado conforme metodologia descrita por Paula et al. (2008), pela mistura de 5mL de tetraetil ortosilicato (TEOS), 5mL de etanol e 6mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (p/v). Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição de três gotas de HCl concentrado. Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25°C por 48 h até a completa solidificação (formação da rede interpenetrada de polissiloxano e álcool polivinílico, POS-PVA). O composto foi então triturado até que passasse completamente por uma peneira padrão série Tyler (adquirida da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil) de 42 MESH e ficasse retido em peneira de 60 MESH.

3.3.2. Ativação do suporte

Foi adotada a metodologia descrita por Carneiro da Cunha et al. (1999), conforme segue: o suporte foi suspenso numa solução aquosa 0,5M de metaperiodato de sódio, na proporção de 1 g de suporte: 10 mL NaIO₄. A mistura foi mantida sob agitação durante 90 min em temperatura ambiente na ausência de luz. Em seguida, o suporte foi filtrado sob vácuo e lavado em abundância com água destilada e tampão fosfato pH 8,0. Após a lavagem, o

sólido foi levado à estufa (60 °C) por 24 h, para então ser utilizado no procedimento de imobilização.

3.3.3. Imobilização das lipases comerciais

O suporte ativado foi embebido em hexano (1 g:10 mL), sendo mantido sob agitação em temperatura ambiente durante 2h. Após este período, o sólido foi decantado e o excesso de hexano foi removido. Ao suporte, adicionou-se uma solução aquosa de PEG 1500 (5mg /mL) e lipase na proporção de 250 mg de enzima: 1g suporte: 100 µL de solução de PEG. O sistema foi mantido em geladeira (4 °C, 24h). A lipase imobilizada foi recuperada por filtração a vácuo, com posterior lavagem com hexano. Foram quantificados os teores de umidade e atividade enzimática em todos os derivados imobilizados obtidos.

3.3.4. Reações de interesterificação em sistema modelo com tripalmitina e trioleína

As reações de interesterificação foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL, mantidos sob agitação (170 rpm) em um banho termostatizado à 40 °C, por um período de 72h. O meio reacional foi composto por 50 mL de tripalmitina e trioleína, em concentrações de 40 - 60 mM, empregando-se hexano como solvente e 5% m/v de sistema imobilizado.

3.3.5. Condições reacionais da interesterificação da gordura do leite com óleo de soja

A interesterificação da gordura do leite com o óleo de soja foi realizada em reatores fechados (100 mL), carregados com 50 g de meio reacional, composto por uma mistura de gordura do leite e óleo de soja na proporção mássica gordura:óleo 4:1. Ao meio, foi adicionado sistema imobilizado na proporção de 10% em relação à massa total de mistura reacional. Os reatores foram mantidos sob agitação (170 rpm) em um banho termostatizado à 45 °C. Foram avaliadas algumas características e propriedades específicas do produto obtido, tais como: teor de ácidos graxos livres, composição em triglicerídeos e consistência.

3.4. Métodos de Análise

3.4.1. Caracterização bioquímica, cinética e de estabilidade das enzimas livres e dos derivados imobilizados

3.4.1.1. Teor de proteína

O conteúdo de proteína das lipases livres foi determinado pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se o reagente brilhante de Comassie Blue e Albumina bovina cristalina (ABS) como padrão.

3.4.1.2. Eletroforese

A análise de eletroforese das lipases livres (L036P e Piccantase R8000, ambas de *Rhizopus oryzae* e L034P de *Candida rugosa*) foi efetuada de acordo com metodologia estabelecida por Alfenas et al. (1991). O gel separador foi preparado na concentração de 12,5%, enquanto a concentração do gel concentrador foi de 4,5% (acrilamida: bisacrilamida).

3.4.1.3. Atividade hidrolítica

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite : água) e 4 mL de pH tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, à 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática (0,5 mg/mL, preparada em solução tampão pH 7,0) ou 0,1 g do derivado imobilizado, mantendo-se o sistema reacional sob agitação, a 37 °C, por 5 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1: 1) e 10 mL de uma solução de KOH (0,05N). O excesso de KOH foi titulado com HCl (0,05N) utilizando-se um titulador automático, sendo o ponto de equivalência determinado empregando-se o modo “titulação dinâmica” do aparelho (DET, “Dynamic Equivalence point Titration”). A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 3.1:

$$A(U / g) = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 10^6}{t \times m} \quad (3.1)$$

Em que: V_b = volume do branco (L); V_a = volume da amostra (L); M = molaridade da solução de HCl (mol/L); t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

3.4.1.4. Rendimento de imobilização (η)

O rendimento de imobilização foi calculado usando a equação 3.2:

$$n(\%) = \frac{U \times 100}{U_0} \quad (3.2)$$

Em que: U_0 = unidades de atividade hidrolítica oferecidas para imobilização; U = unidades de atividade hidrolítica total presente no suporte.

3.4.1.5. Cinética de hidrólise

Para o cálculo da constante de Michaelis-Menten foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variáveis obtidos a partir de emulsões preparadas em diferentes proporções de azeite de oliva e solução aquosa de goma arábica (7% m/v). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pelas preparações de lipase livre foram determinadas de acordo com item 3.4.1.3. As constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$ foram determinadas pelo Programa Enzyme fitter (Leatherbarrow, R. J., 1987, Elsevier, Biosoft, Amsterdam, The Netherlands).

3.4.1.6. Atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi determinada pela formação do butirato de butila na reação de n-butanol (0,10 M) com ácido butírico (0,11 M) em heptano sob 37 °C empregando 0,1 g de enzima livre ou 0,5 g de preparação experimental de lipase imobilizada. A reação foi iniciada pela adição da lipase ao meio reacional (20 mL) em frasco fechado de 100 mL sob agitação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas do meio reacional em intervalos pré-determinados para quantificação das substâncias presentes. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 μ mol de butirato de butila por minuto nas condições do ensaio. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente angular da parte linear da curva de concentração de produto em função do tempo.

3.4.1.7. Dosagem de ácido butírico

A concentração de ácido foi determinada por titulação de alíquotas dissolvidas em 10 mL de etanol 96° GL neutralizado, usando-se como titulante solução de KOH 0,02 M e indicador fenolftaleína.

3.4.1.8. Dosagem de butanol e butirato de butila

As concentrações de butanol e butirato de butila foram determinadas por cromatografia de fase gasosa (Cromatógrafo Varian, Modelo CG 3800), utilizando uma coluna empacotada (6ft S# DEGS WHP 80/100 mesh, HP) e as seguintes condições: nitrogênio como gás de arraste (30 mL/min); volume de injeção de 1 µL; detector de ionização de chama; temperatura da coluna 65°C; padrão interno hexanol.

3.4.1.9. Estabilidade à estocagem

O derivado imobilizado selecionado foi estocado (seco) na ausência de qualquer componente numa temperatura de 4°C, para avaliação da estabilidade à estocagem. Em intervalos determinados verificou-se a atividade hidrolítica residual do biocatalisador, conforme metodologia descrita no item 3.4.1.3.

3.4.2. Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização, das enzimas livres e sistema imobilizado

3.4.2.1. Determinação da área, tamanho e volume de poros do suporte

A área específica do suporte de imobilização (POS-PVA) foi determinada pela aplicação do método Brunauer, Emmet e Teller (BET) com a fisissorção de N₂, sendo que o tamanho médio e o volume dos poros foi obtido pela aplicação do método Bennet, Joiner e Halenda (BJH) de dessorção de N₂. As análises foram efetuadas em equipamento de volumetria gasosa de marca Quantachrome modelo NOVA 1000 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, Florida, USA), operando em regime estático.

3.4.2.2. Determinação da resistência mecânica do suporte

A resistência mecânica do suporte de imobilização (POS-PVA) foi avaliada por análise de microdureza Vickers em microdurômetro Micromet 2004 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA), empregando-se uma carga de 50 gf por 30s. Foram feitas 10 medições em pontos diferentes de cada amostra.

3.4.2.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras do suporte POS PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio, da lipase livre e do derivado imobilizado selecionado foram preparadas com pastilhas de KBr e submetidas à análise no infravermelho, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , empregando-se espectrofotometro Spectrum One, Perkin Elmer (Waltham, USA).

3.4.2.4. Difratometria de Raios X

As amostras do suporte POS PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio, da lipase livre e do derivado imobilizado selecionado, foram submetidas à análise de difratometria de raios-X. As amostras foram colocadas sobre suporte de alumínio e as análises foram efetuadas em intervalo angular de 10 a 80 graus e tempo de contagem de 1 segundo, utilizando o difratômetro XRD 6000, Shimadzu (Shimadzu do Brasil, São Paulo, Brasil).

3.4.2.5. Microscopia e análise elemental superficial

As amostras do suporte POS PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio foram micrografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP (Schott Zeiss do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), e analisadas com relação à composição elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X utilizando um sistema EDS Oxford Inca Energy.

3.4.2.6. Análise granulométrica

A distribuição granulométrica do derivado imobilizado selecionado foi analisada empregando-se um conjunto de peneiras padrão série Tyler (42 à 170 MESH), montadas em um agitador de peneiras Sppencer Scientific (adquirido da Hipperquímica, Santo André/SP, Brasil).

3.4.3. Acompanhamento das reações de interesterificação

3.4.3.1. Teor de ácidos graxos livres

O teor de ácidos graxos livres das reações de interesterificação foi determinado de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.4.3.2. Quantificação dos triglicerídeos das reações de interesterificação entre tripalmitina e trioleína

Para quantificação dos triglicerídeos formados e consumidos nas reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína nas diferentes concentrações, foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa (Varian - Modelo 3800), adaptado com uma coluna capilar CP Sil 5CB, operando nas seguintes condições: temperaturas do detector e injetor de 300 °C, hidrogênio como gás de arraste, split de 1:20, atenuação = 1, temperatura da coluna de 80 °C no momento da injeção, sendo que após um minuto a temperatura foi aumentada numa taxa de 25 °C/min até 320 °C, mantendo-se esta constante até um tempo total de 40 min de análise.

3.4.3.3. Rendimento de interesterificação (I, %) para as reações em sistema modelo

O rendimento de interesterificação das reações entre tripalmitina e trioleína foi calculado de acordo com a equação 3.3:

$$I(\%) = \frac{(C_{C_{50}} + C_{C_{52}})_t}{(C_{C_{48}} + C_{C_{54}})_0} \cdot 100 \quad (3.3)$$

Em que: $C_{C_{50}}$ e $C_{C_{52}}$ = concentração (mM) dos triglicerídeos com 50 e 52 átomos de carbono nos resíduos de ácidos graxos, respectivamente; $C_{C_{48}}$ e $C_{C_{54}}$ = concentração (mM) da

tripalmitina e da trioleína, respectivamente; os índices representam as concentrações nos tempos “t” e inicial (0) de reação.

3.4.3.4. Quantificação dos triglicerídeos das reações de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja

Para a análise de triglicerídeos obtidos nas reações de interesterificação, empregou-se um método de análise baseado na metodologia da comunidade européia (PRECHT; MOLKENTIN, 1997). A adaptação feita na metodologia foi especialmente relacionada à rampa de temperatura, modificada para introdução de um padrão interno. A Tabela 3.2 apresenta as condições empregadas no presente trabalho.

Tabela 3.2. Condições operacionais para dosagem de triglicerídeos por Cromatografia Gasosa

Padrão interno (PI)	Tetradecano
Características da coluna	Empacotada 3% OV-1 SILPT-WBM, 100/120 MESH 0,5 m x 1/8” OD x 2,0 mm ID em Silco Var marca Restek (adquirido da Frankel Comércio de Instrumentos Analíticos Ltda., São Paulo, SP).
Condições de aquecimento da coluna	Rampa de aquecimento 80 °C por 1min até 210°C numa taxa de 50°C/ min, mantendo-se constante por 1 min, em seguida eleva-se a temperatura a 340°C numa taxa de 6°C/ min, mantendo-se constante por 7 min.
Injetor	370°C
Detector	350°C
Gás de arraste	Nitrogênio, utilizado em fluxo constante 40 mL/min.

3.4.3.5. Grau de hidrólise (H, %)

O grau de hidrólise das reações de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja foi calculada de acordo com a equação 3.4:

$$H(\%) = \frac{AG_f}{AG_t} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Em que: AG_f = concentração total de ácidos graxos formados na reação (mM); AG_t = concentração total de ácidos graxos que poderiam ser liberados, considerando-se hidrólise total dos triglicerídeos presentes no meio reacional (mM).

3.4.3.6. *Rendimento de interesterificação (I, %) nas reações com gordura de leite e óleo de soja*

O rendimento de interesterificação das reações entre gordura do leite e óleo de soja foi calculado de acordo com a equação 3.5:

$$I(\%) = \frac{\sum (TAG_I)_t - \sum (TAG_I)_0}{\sum (TAG_D)_0} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Em que: TAG_I = concentração (mM) dos triglicerídeos cuja concentração aumentou durante a reação; TAG_D = concentração (mM) dos triglicerídeos cuja concentração diminuiu durante a reação. Os índices “t” e (0) representam as concentrações de TAG em um tempo qualquer de reação e na mistura reacional inicial, respectivamente.

3.4.3.7. *Análise de consistência*

A consistência das amostras foi determinada utilizando texturômetro (QTS-25 Brookfield), controlado pelo programa Texture Pro. As amostras foram aquecidas em forno microondas (55 – 62 °C) para fusão completa dos cristais, e condicionadas em formas cúbicas de silicone (aresta de 25mm). O condicionamento foi efetuado por 48h em estufa a temperatura controlada (10°C) para recristalização da gordura. Foi utilizada a sonda TA15, correspondente a um cone acrílico com ponta não truncada e ângulo de 45°. Os testes foram conduzidos nas seguintes condições: retorno ao início, distância: 10mm, velocidade: 120mm/min, tempo: 5s, determinação da força em compressão (gf), duplicata. As amostras foram analisadas quanto ao “yield value” que foi calculado pela Equação 6, proposta por Haighton (1959):

$$C = K \cdot \frac{W}{p^{1.6}} \quad (3.6)$$

Em que: C = “yield value” (gf/cm²), K = fator dependente do ângulo do cone (para 45°, 4700), W = força máxima em compressão (gf), para tempo de 5s, p = profundidade de penetração (0,1mm).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propriedades das lipases em estudo na sua forma livre

4.1.1. Atividade hidrolítica das lipases comerciais

O primeiro passo para realização desse trabalho foi selecionar os biocatalisadores que seriam testados na reação modelo de interesterificação. Por se tratar de uma aplicação para uso em alimentos, todas as lipases comerciais selecionadas foram em grau alimentício. Cada enzima em estudo foi caracterizada quanto à atividade hidrolítica, teor de umidade e proteína, e os resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Atividade hidrolítica, atividade específica e teores de umidade e proteína das lipases selecionadas.

Fonte da lipase	Nome Comercial	Umidade (%)	Atividade hidrolítica* (U/g)	Proteína* (mg/g)	Atividade específica* (U/mg de proteína)
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	4,97	19677	96,10	204,76
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	4,94	12946	120,86	107,12
<i>Candida rugosa</i>	Lipomod TM 34P	6,56	82731	59,65	1386,96
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase L036P	4,29	58918	93,19	632,24
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipomod TM 338P	5,56	10817	80,28	134,75
<i>Rhizomucor miehei</i>	Piccantase A	5,30	3062	120,62	25,39
<i>Rhizopus oryzae</i>	Piccantase R 8000	5,53	10791	133,63	80,76

* valores em matéria seca.

Conforme pode ser observado, todas as preparações de lipase livre apresentaram teor de umidade inferior a 7%. Com relação às atividades hidrolíticas, as lipases selecionadas apresentaram uma ampla faixa de variação, entre 3063-82732 U/g.

Os teores de proteína foram quantificados pelo Método de Bradford (item 3.4.1.1), cuja curva de calibração encontra-se no Apêndice 1. Este método, apesar de desenvolvido há algumas décadas (BRADFORD, 1976), é um dos mais comumente utilizados nos laboratórios bioquímicos modernos (KNIGHT; CHAMBERS, 2003). Sabe-se que preparações comerciais

de lipase não contêm apenas proteínas. Portanto, uma forma adequada de expressar o poder catalítico das enzimas é por meio da atividade específica (U/mg de proteína) dos biocatalisadores. Neste caso, como mostrado na Tabela 4.1, a preparação comercial L034P, apesar de possuir o menor teor protéico (60 mg/g), apresentou a atividade específica mais elevada (cerca de 1400 U/mg), o que indica que se trata de uma preparação com alto teor de pureza entre as proteínas presentes, apresentando atividade de hidrólise de azeite de oliva bastante elevada. De fato, a análise desta preparação enzimática por eletroforese em gel mostrou apenas uma banda protéica (Apêndice 2) intensa correspondendo a 64,7 kDa, massa molar apresentada na literatura como típica de lipase de *Candida rugosa* (SAXENA et al., 2003; VAKHLU; KOUR, 2006).

4.1.2. Cinética da hidrólise de azeite de oliva catalisada pelas lipases em estudo

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram determinados para cada lipase em estudo por meio da avaliação do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de reação hidrolítica das lipases. Para isto, variou-se a porcentagem do azeite de oliva na emulsão na faixa de 5 a 50%, exceção feita a algumas enzimas para as quais esta faixa precisou ser ampliada para possibilitar uma adequada determinação dos parâmetros cinéticos.

Os ensaios foram conduzidos em pH 7,0, à temperatura de 37 °C. Nas Figuras 4.1 (a-g) são apresentadas as atividades enzimáticas em função da concentração do substrato (em equivalentes em ácido graxo) preparado nas proporções apresentadas no Apêndice 3. Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir desses resultados, considerando-se cinética de Michaelis-Menten e empregando-se o Programa Enzyme fitter para ajuste dos dados experimentais. Os resultados obtidos sugerem que a atividade das enzimas livres em função da concentração do substrato segue a cinética do tipo Michaelis-Menten, indicando que na faixa de concentração estudada não se detectou uma possível inibição pelo produto formado.

Figura 4.1. Atividade das lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) em função da concentração do substrato (pH 7 a 37 °C). ▼ dados experimentais, linha sólida (dados ajustados pelo Programa Enzyme fitter).

A partir das curvas da atividade hidrolítica em função da concentração de substrato, foram obtidos os parâmetros cinéticos K_m (mM) e V_{max} (U/g) para cada uma das lipases em estudo. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Valores de K_m (mM) e V_{max} (U/g) obtidos para as diferentes preparações de lipase em estudo.

Microorganismo	Nome comercial	K_m (mM)	V_{max} (U/g)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Piccantase R8000	11	8807
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	109	15258
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipomod L338P	239	17402
<i>Rhizomucor miehei</i>	Piccantase A	329	7807
<i>Candida rugosa</i>	Lipomod L034P	871	144380
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase L036P	1241	123641
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	1403	28489

Verifica-se que as lipases A, L036P e L034P apresentaram as menores afinidades pelo substrato, conforme observado pelos valores de K_m da Tabela 4.2. Por outro lado, a Piccantase R8000 foi a que forneceu o menor valor de K_m , significando que dentre as enzimas em estudo, esta mostrou maior afinidade pelo substrato em questão. Com relação ao parâmetro V_{max} (U/g), as lipases L034P e L036P atingiram os maiores valores.

Deve-se destacar que as lipases Piccantase R8000 e L036P, embora oriundas da mesma espécie microbiana, forneceram diferentes valores de afinidades pelo substrato, conforme evidenciado pelos valores de K_m de suas formas livres (Tabela 4.2). Este comportamento pode ser explicado pela origem comercial distinta destas lipases, sendo que cada fabricante pode empregar diversos procedimentos de purificação com diferentes eficiências, ou ainda pelo uso de diferentes linhagens de *Rhizopus oryzae* no processo produtivo. De fato, diferentes propriedades bioquímicas têm sido relatadas para lipases obtidas a partir deste microrganismo, anteriormente conhecido por outros nomes como *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus javanicus* (BENZONANA, 1974; LABOUREUR; LABROUSSE, 1966; SEMERIVA; BENZONANA; DESNUELLE, 1967; UYTENBROECK et al., 1993).

Além disso, mesmo a lipase produzida por uma mesma espécie microbiana pode apresentar diferentes isoformas, as quais podem diferir com relação às propriedades bioquímicas. Estas isoformas podem ser produzidas simultaneamente pelo microrganismo durante o processo de produção ou ainda surgir após a purificação. Sayari et al. (2005), por

exemplo, estudaram o processo de extração da lipase de *Rhizopus oryzae* e obtiveram somente uma enzima com massa molar de 32 kDa, a qual denominaram ROL32. No entanto, estes autores observaram o surgimento de uma segunda forma desta lipase, caso a estocagem da ROL32 fosse feita à 0 °C por vários meses ou à 6 °C por alguns dias. Esta segunda forma, denominada ROL29, apresentou massa molar de 29 kDa e teve origem devido à clivagem da sequência N-terminal dos aminoácidos da ROL32, apresentando propriedades diferentes da lipase que lhe deu origem. Com relação à atividade específica, a ROL29 apresentou valor 50% inferior em comparação à atividade medida para a ROL32, utilizando-se trioleína ou tributirina como substrato.

De fato, no caso das lipases Piccantase R8000 e L036P, as diferenças obtidas podem ser atribuídas às distintas enzimas presentes em cada preparação comercial. Isto pôde ser confirmado por meio da eletroforese realizada para estas enzimas, conforme mostrado na Figura 4.2. A partir da análise de eletroforese, foram obtidas as massas molares para estas lipases. Os resultados mostraram que a Piccantase R8000 apresentou uma única banda correspondente a uma massa molar de 54 kDa, e a lipase L036P mostrou uma única banda correspondente à massa molar de 40 kDa. Cada isoenzima mostra diferentes propriedades biocatalíticas (MARIA et al., 2006).

Figura 4.2. Eletroforese em gel das lipases de *Rhizopus oryzae* obtidas de diferentes fornecedores.

4.1.3. Aplicação das lipases em estudo em meio orgânico

Segundo Klibanov (2001), enquanto o uso de enzimas estiver restrito ao seu meio reacional natural, ou seja, meio aquoso, o uso industrial mais difundido de bioconversões, principalmente para a produção de especialidades químicas e polímeros, será necessariamente limitado por uma variedade de considerações. A maioria destes produtos é insolúvel em água e o meio aquoso freqüentemente propicia reações secundárias indesejadas e degradação de muitos reagentes orgânicos. Além disso, o equilíbrio termodinâmico de muitos processos é desfavorável em água e a recuperação de produtos é, algumas vezes, difícil neste meio. Ainda segundo este autor, em princípio, a maioria destes problemas poderia ser contornado substituindo-se água por solventes orgânicos como meio reacional.

Considerando-se que a interesterificação tem sido relatada como uma reação que ocorre como uma sequência de hidrólises e reesterificações da molécula de triglicerídeo (GHAZALI; HAMIDAH; CHE-MAN, 1995; GRAILLE, 1999), julgou-se adequado avaliar o potencial catalítico das lipases selecionadas em meio orgânico. Como modelo, escolheu-se a reação de esterificação do *n*-butanol com ácido butírico em solvente heptano.

A atividade de esterificação foi avaliada por unidade de massa de biocatalisador, sendo que os dados referentes às reações catalisadas por lipases na forma livre são apresentados nas Figuras 4.3 (a-g). Os dados experimentais correspondentes são apresentados no Apêndice 4.

As curvas da Figura 4.3 mostram que as lipases A (Figura 4.3a), L0338P (Figura 4.3 g), Piccantases A (Figura 4.3c) e Picantase R8000 (Figura 4.3d) não foram efetivas na catálise da reação de esterificação, uma vez que a concentração de butirato de butila após 24 h não ultrapassou o valor de 30 mM. Por outro lado, deve-se destacar que o desempenho da L034P foi muito superior às demais lipases, visto que esta enzima alcançou conversão máxima em 4h de reação. Este resultado pode estar relacionado à especificidade desta enzima por ácidos graxos de cadeia curta, particularmente com quatro átomos de carbono, conforme indicado pelo fabricante. Embora as lipases M e L036P tenham formado uma quantidade razoável de butirato de butila (acima de 50 mM), isto só ocorreu após 24 h de reação.

Figura 4.3. Consumo de butanol (○) e ácido butírico (■) na formação de butirato de butila (▲) em reações de esterificação de catalisadas pela Lipase A (a), Lipase M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P(g), na forma livre.

A partir da concentração de éster formado no meio reacional, foram calculados os valores de atividade de esterificação (U/g). Para tanto, plotaram-se gráficos da concentração de éster formado em função do tempo, calculando-se o coeficiente angular da reta que melhor se ajustou aos dados experimentais. Os valores de atividade relativa das lipases livres mostrados na Figura 4.4 foram calculados considerando 100% a atividade exibida pela lipase L034P (191,9 U/g).

Verifica-se que as lipases L036P e M, forneceram valores similares de atividade relativa, ou seja, cerca de 10%. As demais lipases resultaram em atividade relativa inferior a 4%. Destaca-se a superioridade da L034P na forma livre quanto à capacidade de catalisar a reação frente às demais lipases em estudo, com atividade de esterificação pelo menos 10 vezes mais elevada.

Figura 4.4. Atividade relativa de esterificação (%) das lipases em estudo na forma livre

4.2. Caracterização física e morfológica do suporte de imobilização polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)

Considerando que o composto polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) foi selecionado como matriz de imobilização das diferentes lipases comerciais, julgou-se adequada a determinação das propriedades físicas, químicas e morfológicas do mesmo. As análises efetuadas incluíram porosimetria, microdureza, espectroscopia no infra-vermelho e difratometria de raios X, além de microscopia eletrônica e análise elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X. Estas análises possibilitaram a aquisição de informações importantes sobre o suporte de imobilização e servirão de base a estudos futuros.

4.2.1. Porosidade e resistência mecânica

Foram determinados os valores de área superficial específica, tamanho e volume de poros do suporte antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Área superficial específica, volume de poros e tamanho médio de poros e do suporte POS-PVA antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio

Propriedade	POS PVA não ativado	POS PVA ativado
Área superficial específica (m ² /g)	461,00	127,70
Volume de poro (cm ³ /g)	0,275	0,155
Tamanho médio dos poros (Å)	22,91	48,72

Analisando-se a Tabela 4.3, verifica-se que a ativação promoveu uma redução aproximada de 72% e 43 % da área superficial específica e do volume de poro, respectivamente. O tamanho médio dos poros, por outro lado, praticamente dobrou após a ativação. Estas mudanças podem estar relacionadas à metodologia de ativação do suporte. Para melhor compreensão do mecanismo envolvido na ativação do suporte, a estrutura reticulada do POS-PVA é apresentada na Figura 4.5. Esta estrutura foi baseada em trabalhos da literatura (SANTOS et al., 2008; MANSUR; ORÉFICE; MANSUR, 2004; PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 2000).

Figura 4.5. Estrutura química do suporte POS-PVA

Quando o metaperiodato de sódio é empregado na ativação desta matriz, os grupos hidroxila da superfície do POS-PVA são oxidados, resultando em grupos aldeído que podem se ligar à molécula protéica durante a imobilização (SANTOS et al., 2008), conforme mostrado na Figura 4.6.

Figura 4.6. Esquema da reação de ativação do suporte POS-PVA com metaperiodato de sódio e da imobilização da enzima

Como a ativação é baseada em uma reação de oxidação, há a possibilidade de quebra de algumas ligações da estrutura reticulada do suporte durante a ativação, o que pode explicar a mudança nas características estruturais. Esta quebra no reticulado explicaria o aumento no tamanho dos poros e a conseqüente redução na área superficial, além de promover um rearranjo da estrutura global das partículas da matriz, resultando em menor volume total de poros.

A transferência de processos enzimáticos da escala de bancada para produção industrial exige estudos visando-se à condução destes processos em reatores adequados. Neste caso, quando se empregam enzimas imobilizadas, é importante que o sistema biocatalítico apresente algumas propriedades específicas, como resistência mecânica e facilidade de produção. Assim, a resistência mecânica do suporte selecionado para imobilizar as lipases foi avaliada por análise de microdureza Vickers, empregando-se uma carga de 50 gf por 30s. O suporte ativado forneceu microdureza de $45,88 \pm 2,26$ 50 HV. Este resultado poderá ser útil em estudos posteriores relacionados à melhoria das propriedades mecânicas do suporte.

4.2.2. Análise por espectroscopia no infravermelho e difratometria de Raios X

A Figura 4.7 compara os espectros no infravermelho para o suporte antes e após a ativação com metaperiodato de sódio. A análise dos resultados revela que o espectro do suporte POS-PVA não ativado apresentou bandas na faixa de $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, correspondente à ligação Si-O-R. Outras bandas características foram também observadas em 950 cm^{-1} , 810 cm^{-1} e 600 cm^{-1} referentes à ligação Si-O-Si (STUART; GEORGE; McINTYRE, 1996). A análise da Figura 4.7 revela ainda que a etapa de ativação do suporte parece não ter alterado significativamente o perfil dos espectros.

Figura 4.7. Espectros no infra-vermelho do suporte POS-PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio.

Os dados de difração de Raio-X fornecem informações importantes sobre a estrutura de qualquer material. Trata-se de uma técnica não destrutiva, que apresenta, entre outras vantagens: realização de determinações multielementares simultâneas, possibilidade de análise qualitativa e quantitativa e que permite analisar amostras sólidas e líquidas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Os difratogramas de raios X do suporte puro e ativado são apresentados na Figura 4.8. A análise dos resultados revela que o suporte POS-PVA apresenta estrutura amorfa devido à presença de picos alargados e indefinidos. Além disso, é interessante observar que o processo de ativação do suporte não resultou em modificação da cristalinidade do material.

Figura 4.8. Difratometria de Raios X do suporte POS-PVA puro e ativado com metaperiodato de sódio.

4.2.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e análise elemental superficial

A Figura 4.9 apresenta as micrografias da matriz POS-PVA antes e após a etapa de ativação com metaperiodato de sódio, enquanto a Tabela 4.4 apresenta a composição elemental superficial do suporte puro e ativado com metaperiodato de sódio.

Figura 4.9. Micrografias do suporte POS-PVA não ativado (a) e ativado com metaperiodato de sódio (b) (aumento de 2000X).

Conforme pode ser verificado, a matriz híbrida POS-PVA trata-se de um suporte bastante poroso e de superfície irregular (Figura 4.9a). Além disso, em sua composição superficial (Tabela 4.4) foram encontrados, conforme esperado, os elementos carbono, silício e oxigênio. Após a ativação do suporte, ocorreu aumento tanto da quantidade de carbono quanto do silício superficial, bem como a diminuição do teor de oxigênio. A observação da Figura 4.9 (b) permite inferir ainda que a metodologia de tratamento do suporte com o agente de ativação empregado, além das mudanças químicas, resultou também em alterações físicas na superfície do suporte puro, já que o suporte ativado parece apresentar uma superfície menos irregular.

Tabela 4.4. Composição elemental superficial da matriz híbrida POS-PVA pura e ativada com metaperiodato de sódio (NaIO₄)

Elemento	Suporte POS-PVA puro	Suporte POS-PVA ativado com NaIO ₄
Carbono	6,72	7,48
Oxigênio	54,88	47,09
Silício	38,40	45,43

4.3. Imobilização das lipases em polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA)

4.3.1. Rendimento de imobilização

A Tabela 4.5 apresenta os dados relativos aos teores de umidade, atividade hidrolítica e rendimento de imobilização dos derivados imobilizados em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio. Foram obtidos rendimentos de imobilização entre 29 e 54%. Com exceção da lipase de *R. oryzae* (Piccantase R8000), todas as lipases resultaram em rendimentos de imobilização inferiores a 40%. Os distintos valores de rendimentos obtidos podem ser relacionados às diferentes fontes de cada uma das lipases avaliadas. Neste caso, as diferenças estruturais entre as moléculas protéicas de cada enzima resultaram em diferentes interações enzima-suporte.

Geralmente, o emprego de técnicas de imobilização resulta em perda de atividade de parte das moléculas enzimáticas, o que está diretamente relacionado à interação enzima-suporte. Segundo Georgio e Hubbell (1993), três formas de interação podem ser distinguidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a

função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e, (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas, afetam o modo de ação da enzima.

No procedimento de imobilização adotado, conforme discutido no item 4.2.1, o agente de ativação promove a oxidação de grupos -OH livres na matriz do POS-PVA, resultando em grupos aldeído. Estes podem se ligar aos grupos -NH₂ da enzima, a qual ficaria junto à superfície do POS-PVA, estando assim sujeita à sua influência.

Tabela 4.5. Teores de umidade e atividade hidrolítica dos derivados imobilizados em suporte POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio.

Microorganismo	Derivados imobilizado em POS-PVA	Umidade (%)	Atividade (U/g)*	Rendimento de Imobilização (%)
<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	17,74	1443	31,91
<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	16,83	1896	32,04
<i>Candida rugosa</i>	Lipomod L034P	11,97	5945	33,84
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase L036P	17,30	3752	29,26
<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipomod L338P	18,10	1072	32,98
<i>Rhizomucor miehei</i>	Piccantase A	17,14	235	37,39
<i>Rhizopus oryzae</i>	PiccantaseR 8000	8,53	1472	53,34

* valores em matéria seca

Na Tabela 4.5, é possível observar ainda que os valores máximo (53,34%) e mínimo (29,26%) obtidos para o rendimento de imobilização corresponderam às lipases Piccantase R8000 e L036P, respectivamente, oriundas da mesma espécie microbiana. Estas enzimas, no entanto, conforme previamente demonstrado, podem ter interagido de forma distinta com o suporte, uma vez que correspondem a moléculas de lipase diferentes.

4.3.2. Atividade de esterificação dos derivados imobilizados

A avaliação do desempenho catalítico das lipases imobilizadas em POS-PVA foi efetuada na catálise da reação de esterificação do *n*-butanol com ácido butírico em solvente heptano, e a atividade de esterificação foi avaliada por unidade de massa de biocatalisador. As Figuras 4.10 (a-g) apresentam os resultados obtidos nas reações de esterificação catalisadas

pelas lipases imobilizadas no suporte POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio. Os dados experimentais correspondentes são apresentados no Apêndice 5.

Embora todas as enzimas em estudo tenham sido capazes de catalisar a reação de esterificação, as lipases L034P, L036P e L338P forneceram os resultados mais satisfatórios, uma vez que promoveram um consumo apreciável dos materiais de partida. Conforme pode ser observado na Figura 4.10, a maior formação de butirato de butila ocorreu na reação catalisada L034P (74 mM). Nas reações catalisadas por L036P e L338P foram produzidos, respectivamente, 68 e 55 mM de butirato de butila. Com relação às demais enzimas, a concentração de produto obtida foi inferior a 15 mM.

A partir da concentração de éster formado no meio reacional, foram calculados os valores de atividade de esterificação (U/g) das lipases imobilizadas. Foram plotados gráficos de concentração de éster formado em função do tempo e calculados os valores dos coeficientes angulares da reta que melhor se ajustou aos dados experimentais. Os valores de atividade relativa das lipases imobilizadas são apresentados na Figura 4.11, considerando com 100% a atividade da L034P (4,81 U/g). Após a imobilização, as lipases L036P e L338P forneceram 72% e 32% de atividade relativa em comparação à Lipase L034, valores bastante superiores aos observados quando estas enzimas foram empregadas na forma livre. Estes resultados podem estar relacionados as diferentes interações enzima-suporte para cada lipase estudada. O processo de imobilização pode ter modificado a estrutura tridimensional das lipases L036P e L338P, protegendo-as de influências deletérias do meio reacional orgânico e permitindo uma maior atividade catalítica de esterificação para estas lipases.

Figura 4.10. Consumo de butanol (○) e ácido butírico (■) na formação de butirato de butila (▲) em reações de esterificação de catalisadas por Lipase A (a), Lipase M (b) Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio.

Figura 4.11. Atividade relativa de esterificação (%) das lipases imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio

4.4. Aplicação das lipases imobilizadas em reações de interesterificação da tripalmitina e trioleína empregando hexano como solvente

A manteiga, composta por mais de 100000 tipos diferentes de triglicerídeos (BALCÃO; MALCATA, 2002), apresenta-se como um substrato bastante complexo. Esta complexidade pode gerar dificuldades na avaliação dos resultados das reações. Assim, a fim de facilitar a seleção do biocatalisador a ser empregado na reação de interesterificação de interesse (gordura do leite e óleo de soja), empregou-se, como sistema modelo, um meio reacional composto por tripalmitina e trioleína em hexano. Isso porque os ácidos graxos palmítico e oléico estão presentes em grande quantidade nos triglicerídeos que compõem as matérias-primas de interesse (FIRESTONE, 2006).

4.4.1. Seleção do biocatalisador

Nessa etapa do trabalho, o substrato reacional foi composto por tripalmitina (PPP) e trioleína (OOO) nas concentrações de 60 mM e 40 mM, respectivamente. Na Figura 4.12 (a) à (g), são apresentados os perfis das concentrações triglicerídeos formados nas reações de

interesterificação da tripalmitina com trioleína (média de experimentos em duplicata), catalisadas por cada uma das diferentes lipases comerciais, imobilizadas em POS-PVA.

Deve-se salientar que a determinação da concentração dos produtos formados foi efetuada pela detecção de todos os triglicerídeos presentes no meio reacional cuja soma total de átomos de carbono nos resíduos de ácidos graxos resultasse em 50 e 52. De maneira geral, verifica-se na Figura 4.12 que, com exceção da reação catalisada pela lipase L036P (Figura 4.12f), a formação dos produtos (C_{50} e C_{52}) não ultrapassou 10 mM. No caso das lipases M (Figura 4.12b) e L0338P (Figura 4.12g), por exemplo, não foi observada a formação de triglicerídeo C_{50} .

A lipase L036P (Figura 4.12f) parece ter sido mais efetiva na catálise da reação em questão, uma vez que levou a maior formação dos produtos de interesse (C_{50} e C_{52}). Na reação catalisada por esta enzima (Figura 4.12f), observou-se que a concentração de C_{50} e C_{52} manteve-se praticamente constante nas primeiras 48 horas. Um aumento na concentração destes triglicerídeos pôde ser observado apenas após este período.

É importante observar que, independente da formação dos triglicerídeos C_{50} e C_{52} , verificou-se o consumo dos reagentes de partida em todas as reações (Figura 4.12). Este fato pode ser compreendido considerando-se a influência da água no processo. Embora a presença de água seja necessária para manutenção da atividade enzimática, se em excesso, pode favorecer a hidrólise dos triglicerídeos em detrimento de sua re-síntese, levando ao acúmulo de produtos secundários (monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres) no meio reacional. Assim, parte dos substratos foi consumida para formação destes compostos, não resultando no acúmulo dos triglicerídeos C_{50} e C_{52} . De fato, a reação de interesterificação pode ser considerada como um caso especial de transferência de ácidos graxos, que envolve, em nível molecular, reações sequenciais de hidrólise e síntese (MARANGONI, 2002). Neste processo, o teor de água é um parâmetro fundamental, sendo responsável pelo equilíbrio entre as duas reações que o compõem (MARANGONI, 2002).

A fim de se avaliar o grau de hidrólise alcançado nessas reações, o teor de ácidos graxos totais (mM) presentes no meio reacional foi quantificado de acordo com o item 3.4.3.1. Para cada uma das reações catalisadas pelas diferentes lipases em estudo, foram comparados os valores do teor de ácidos graxos totais e rendimento de interesterificação (%), calculado de acordo com o item 3.4.3.3. Os resultados são apresentados na Figura 4.13.

Figura 4.12: Perfil da concentração de triglicerídeos formados (—●— C50; —▲— C52) e consumidos (—■— C48; —▼— C54) nas reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína, catalisadas por lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g), imobilizadas em POS-PVA. Os Triglicerídeos foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes.

Figura 4.13. Rendimento de interesterificação (barras) e teor de ácidos graxos (●) na reação de interesterificação da tripalmitina com trioléina catalisada por lipases A (a), M (b), Piccantase A (c), Piccantase R8000 (d), L034P (e), L036P (f) e L338P (g) imobilizadas em POS-PVA.

As lipases M (Figura 4.13b) e L338P (Figura 4.13g) forneceram rendimentos de interesterificação semelhantes (em torno de 5%). Após 24 h, a lipase M parece ter efetuado apenas a hidrólise dos triglicerídeos presentes, uma vez que se observou somente aumento no teor de ácidos graxos. As lipases A (Figura 4.13a), Piccantase A (Figura 4.13c), Piccantase R8000 (Figura 4.13d) e L034 (Figura 4.13e) também forneceram taxas de interesterificação semelhantes (em torno de 10%), em diferentes tempos de reação. Na reação catalisada pela enzima L034P, observa-se que a hidrólise ocorreu predominantemente nas primeiras 24 h, com liberação de cerca de 30 mM de ácidos graxos. Após este período, apenas mais 6 mM de ácidos graxos foram liberados. Para as demais lipases (A, Piccantase A e Piccantase R8000), a quantidade total de ácidos graxos não ultrapassou 20 mM.

O rendimento de interesterificação mais elevado foi obtido empregando-se lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P). Na reação catalisada por esta enzima, obteve-se um rendimento aproximado de 31%, em 72h de processo (Figura 4.13f). É interessante observar ainda na Figura 4.13 (f) que a interesterificação ocorreu de forma mais significativa após o acúmulo de cerca de 20 mM de ácidos graxos no meio reacional (após 48h).

Na reação catalisada por L036P (Figura 4.13f), a taxa de interesterificação aumentou progressivamente até atingir o valor máximo ao final do processo. Porém, em algumas reações, o valor da taxa de interesterificação apresentou oscilações (Figura 4.13). A variação na taxa de interesterificação ao longo do processo pode estar relacionada aos fatores que influenciam esta reação, incluindo a reversibilidade sob determinadas condições.

Conforme mostrado na Figura 4.13, a lipase A resultou em cerca de 10% de rendimento apenas após 72h de reação, enquanto que a enzima Piccantase R8000 apresentou reversibilidade da reação após 24h de processo.

Para continuidade deste trabalho, selecionou-se a lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), que forneceu o rendimento de interesterificação mais elevado. Antes, porém, da aplicação desta enzima na mistura gordura do leite-óleo de soja, foram efetuados testes adicionais para verificar a influência da razão entre trioleína e tripalmitina no rendimento da reação. Neste caso, foi possível a ampliação dos conhecimentos sobre o comportamento biocatalítico do sistema selecionado na reação de interesterificação avaliada. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

4.4.2. Aplicação da lipase selecionada em reações de interesterificação com variação da concentração de substrato

Nesta etapa do trabalho, a lipase selecionada foi empregada na catálise de reações de interesterificação da tripalmitina (PPP) com trioleína (OOO), em diferentes concentrações de PPP:OOO (40:40, 40:60 e 60:60 mM, comparando-se com os resultados apresentados na seção anterior, quando foram empregadas concentrações de PPP:OOO de 60:40 mM). Os perfis de triglicerídeos e os valores do teor de ácidos graxos totais comparados ao rendimento de interesterificação (%) são apresentados, respectivamente, nas Figuras 4.14 e 4.15, para as reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína (média de experimentos em duplicata), nas referidas concentrações, catalisadas por lipase de *R. oryzae* (L036P) imobilizada em POS-PVA.

A observação das Figuras 4.14 e 4.12 f, mostra que a máxima formação de produtos (C_{50} e C_{52}) não ocorreu antes de 24 horas de reação. Pode-se notar ainda nestas Figuras que o uso de quantidades equimolares de substrato resultou em uma formação mais rápida de produtos, embora a máxima concentração de cada um deles tenha sido semelhante em quase todos os casos (10-15 mM e 30 mM, respectivamente, para os compostos C_{50} e C_{52}). Esta última afirmação só não é válida para o sistema no qual o substrato com 60 mM de PPP e 40 mM de OOO foi empregado pois, neste caso, ambos produtos atingiram cerca de 15-20 mM (Figura 4.12f). Também neste experimento foi observado menor consumo de substratos (cerca de 60% de consumo de PPP e OOO) em comparação às demais concentrações avaliadas, para as quais o consumo foi de cerca de 80-90% para PPP e 70% para OOO. Cabe comentar que o consumo de tripalmitina foi sempre superior em comparação ao da trioleína, em todos os casos.

Conforme mostrado na Figura 4.15, independente da concentração de substrato empregada, observou-se que o total de ácidos graxos liberados foi praticamente o mesmo para as reações catalisadas por L036P (cerca de 35 mM), valor diferente do obtido anteriormente empregando-se 60 mM de PPP e 40 mM de OOO (cerca de 65mM, Fig. 4.13f). Pode-se observar ainda que os maiores rendimentos de interesterificação foram alcançados empregando-se quantidades equimolares dos substratos (cerca de 45%), sendo que o valor obtido com excesso de trioleína foi um pouco menor (cerca de 40%), e atingido apenas em 72h de reação. O menor rendimento (31%) foi observado quando a tripalmitina foi empregada em excesso (Figura 4.13f).

Figura 4.14: Perfil da concentração de triglicerídeos formados (—●— C50; —▲— C52) e consumidos (—■— C48; —▼— C54) nas reações de interesterificação da tripalmitina com trioleína, catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em POS-PVA, empregando diferentes concentrações de substratos (PPP:OOO): 40:40 (a), 40:60 (b), 60:60 (c). Os TAGs foram relatados de acordo com a soma do número de carbonos dos resíduos de ácidos graxos presentes.

Figura 4.15. Rendimento de interesterificação (barras) e teor de ácidos graxos (●) na reação de interesterificação da tripalmitina com trioleína catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em POS-PVA, empregando diferentes concentrações de substratos (PPP:OOO): 40:40 (a), 40:60 (b), 60:60 (c).

O uso de excesso de um dos substratos pode resultar em acúmulo do ácido graxo correspondente no meio reacional, em função da hidrólise parcial dos triglicerídeos. No caso da reação catalisada por lipase L036, o acúmulo de ácido palmítico, oriundo da tripalmitina, pode ter sido o responsável pelo menor rendimento observado. Realmente, a presença de altos níveis de ácidos graxos pode resultar em níveis elevados de grupos carboxílicos ionizados, que acidificam a fase micro-aquosa ao redor da lipase, podendo causar desorção da água da interface e, conseqüentemente, levar à perda da atividade enzimática (MARANGONI, 2002).

De acordo com a literatura, a interesterificação de dois triglicerídeos compostos por três resíduos de ácidos graxos idênticos, como tripalmitina e trioleína, resulta em uma mistura de seis possíveis configurações de triglicerídeos (ROZENDAAL; MACRAE, 1997). Se quantidades equimolares de PPP e OOO forem interesterificadas, a mistura final será constituída de 12,5% de cada um dos triglicerídeos de partida (PPP e OOO) e 75% dos demais triglicerídeos, oriundos da troca de grupos acila. Este fato pode ser melhor compreendido através da observação da Figura 4.16 (ROZENDAAL; MACRAE, 1997), que representa a composição de equilíbrio (%) resultante da interesterificação de uma mistura equimolar binária de tripalmitina e trioleína.

Figura 4.16. Composição de equilíbrio (%) resultante da interesterificação de uma mistura equimolar binária de tripalmitina e trioleína.

Logo, a partir da análise da Figura 4.16, conclui-se que nas reações empregando-se concentrações equimolares de PPP e OOO catalisada pela lipase de *R. oryzae* (L036), pôde-se obter um rendimento de interesterificação de cerca de 60% do máximo teórico, sendo este percentual calculado como a relação entre o rendimento obtido (45%) e o máximo possível

(75%, correspondente à soma dos percentuais teóricos possível para todos os produtos, conforme mostrado na Figura 4.16).

Como o derivado imobilizado selecionado será empregado na catálise da reação de interesse (gordura do leite e óleo de soja), julgou-se adequada a determinação das propriedades físicas, químicas e de estabilidade do mesmo.

4.5. Caracterização do derivado imobilizado selecionado

As análises efetuadas nesta etapa incluíram espectroscopia de infravermelho e difratometria de raios X, além da distribuição granulométrica e estabilidade à estocagem.

4.5.1. Análise por espectroscopia no infravermelho e difratometria de raios X

A fim proceder-se à avaliação das modificações químicas provocadas pelo procedimento de imobilização, para a lipase selecionada foram feitos gráficos com os espectros de infravermelho do suporte POS-PVA ativado, da enzima livre e do derivado imobilizado obtido. Estes resultados são apresentados na Figura 4.17.

A lipase livre apresentou espectro típico de proteínas com bandas de absorção associadas ao grupo amida (CONH) característico, como a situada na faixa de comprimento de onda situada entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (STUART; GEORGE; MCINTYRE, 1996). De fato, os aminoácidos exibem bandas características em comprimentos de onda situados em $3390\text{-}3260\text{ cm}^{-1}$ (NH), $1724\text{-}1695\text{ cm}^{-1}$ (ácido C=O), $1621\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (amida C=O), e $1565\text{-}1508\text{ cm}^{-1}$ (CNH) (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990). Além disso, a literatura relata que o grupo amida C=O situadas em ou abaixo de 1620 cm^{-1} são características de α -aminoácidos (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990). Todas estas bandas podem ser visualizadas nos espectros da lipase L036P livre (Figura 4.17). Outras bandas observadas nos espectros da Figura 4.17 correspondem à região entre $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ referente ao grupo -OH da cadeia polimérica do suporte e entre $3000\text{-}2780\text{ cm}^{-1}$ referente à ligação C-H. Por fim, no espectro da lipase livre, observando-se a região entre $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, verificou-se o desaparecimento da banda característica de grupo amino, que possivelmente tenha ocorrido em função da etapa de imobilização.

Com relação ao derivado imobilizado, verificou-se que nenhuma banda adicional foi

observada no espectro da lipase L036 imobilizada, sugerindo que a ligação entre enzima e suporte é da mesma natureza que bandas típicas de proteínas ou do próprio suporte.

Figura 4.17. Espectros no infravermelho do suporte ativado, das enzimas livres e do derivado imobilizado selecionado: lipase de *R. oryzae* (L036P).

Da mesma forma que na análise dos resultados de infravermelho, foram plotados em um mesmo gráfico os difratogramas do suporte POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio, da enzima livre e do derivado imobilizado obtido. Os resultados são apresentados na Figura 4.18.

A análise dos resultados revela que a lipase *R. oryzae*, embora na forma livre tenha apresentado alguns picos estreitos (próximos a 20 e 65 graus), característicos de proteínas, também apresentou um difratograma típico de material amorfo, pela presença de regiões largas e indefinidas, semelhantes às observadas no suporte POS-PVA ativado. Isto está relacionado a substâncias não protéicas presentes na forma comercial desta lipase. Além disso, no difratograma da lipase L036 imobilizada (Figura 4.18), os picos estreitos da lipase livre não podem ser visualizados, provavelmente por terem sido encobertos pelos picos presentes no difratograma do suporte POS-PVA.

Figura 4.18. Difratometria de Raios X do suporte ativado, da enzima livre e do derivado imobilizado selecionado: lipase de *R. oryzae* (L036P).

4.5.2. Análise granulométrica do derivado imobilizado selecionado

O tamanho das partículas de um sistema imobilizado influencia diretamente seu desempenho no meio reacional. Partículas finas facilitam o contato entre a enzima e o substrato, por possuírem maior área superficial. Por outro lado, partículas muito finas não são adequadas para aplicações em reatores contínuos, pois geram queda de pressão e baixas vazões (ZANIN; MORAES, 2004).

Conforme descrito no item 3.2, o suporte POS-PVA ativado foi mantido sob agitação durante 2h antes do contato com a enzima no procedimento de imobilização. Assim, procedeu-se a avaliação da distribuição granulométrica do derivado imobilizado obtido. A granulometria desejada, escolhida com base em sistemas imobilizados disponíveis comercialmente, foi de -42/+60 MESH (diâmetro médio de 0,308 mm).

A granulometria da lipase L036P imobilizada em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio é apresentada na Figura 4.19. Conforme pode ser observado, o tamanho das partículas do biocatalisador selecionado foi bastante satisfatório uma vez que pelo menos 70% da massa total de partículas apresentaram o diâmetro médio de 0,308 mm.

Figura 4.19. Distribuição Granulométrica da lipase de *R. oryzae* imobilizada em suporte POS-PVA, ativado com metaperiodato de sódio.

4.5.3. Estabilidade à estocagem

A lipase L036P imobilizada em POS-PVA foi mantida numa temperatura de 4°C em refrigerador. A atividade residual foi dosada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, de acordo com o item 3.4.1.3. Os dados experimentais podem ser visualizados no Apêndice 6.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois evidenciaram que a lipase selecionada apresentou boa estabilidade à estocagem. Observou-se que, após 120 dias de estocagem não foi verificada qualquer diminuição importante na atividade hidrolítica dosada inicialmente. Estes resultados foram bastante satisfatórios.

Segundo Zanin e Moraes (2004), embora a estabilidade à estocagem das enzimas imobilizadas em solução ou secas, geralmente seja superior àquela da enzima livre, ela é dependente do método de imobilização, do suporte e da solução em que está estocada.

4.6. Aplicação da lipase imobilizada selecionada em reações de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja

Nesta etapa do trabalho, a lipase L036P imobilizada em POS-PVA foi empregada na interesterificação da gordura do leite com óleo de soja. As reações foram conduzidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.5. Foram realizadas análises da composição de

triglicerídeos, teor de ácidos graxos e consistência da gordura do leite, mistura reacional e produto interesterificado. Os resultados obtidos são mostrados na sequência.

4.6.1. Composição em triglicerídeos das reações catalisadas por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036)

A Figura 4.20 permite a comparação da composição em triglicerídeos da gordura do leite e da mistura reacional (80% de gordura do leite e 20% de óleo de soja). Observa-se que a mistura reacional apresentou um perfil de triglicerídeos diferente da gordura do leite pura. Os dados da Figura 4.20 revelam que, após a adição do óleo de soja, ocorreu uma diminuição na concentração dos triglicerídeos de C₂₄ a C₅₀ e um aumento na dos triglicerídeos C₅₂ e C₅₄. Esta variação pode ser facilmente explicada, considerando-se a composição do óleo de soja em triglicerídeos, apresentada na Tabela 2.8 (FIRESTONE, 2006). Este óleo possui em sua composição, predominantemente, triacilgliceróis com 52 e 54 átomos de carbono. De acordo com a Tabela 2.8, é possível que este óleo apresente até 31% e 95% da sua composição com triglicerídeos C₅₂ e C₅₄, respectivamente. É importante ressaltar também que o óleo de soja pode apresentar até 20,6 % de trilinoleína, um triglicerídeo composto por um dos ácidos graxos essenciais.

Figura 4.20. Composição em triglicerídeos da gordura do leite pura e da mistura reacional (80% gordura do leite / 20% óleo de soja) não interesterificada.

Após o início da reação, foram coletadas amostras ao longo do processo para análise da composição em triglicerídeos do meio reacional. A fim de facilitar a comparação das modificações observadas durante a reação, foram plotados, em um mesmo gráfico, os valores de concentração dos triglicerídeos da mistura reacional inicial e da reação catalisada pela lipase L036P imobilizada em POS-PVA, em 72 h. Estes resultados são apresentados na Figura 4.21e representam a média de experimento em duplicata. A lipase selecionada foi capaz de efetuar alterações na composição dos triglicerídeos analisados em comparação à concentração destes na mistura reacional inicial, mostrando-se efetiva para a catálise da reação em questão.

Figura 4.21. Perfil de concentração dos triglicerídeos da mistura reacional inicial e do produto interesterificado da reação catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), em 72 horas de reação.

De maneira geral, a L036P promoveu o aumento na concentração dos triglicerídeos C₂₆-C₃₄ e C₄₆-C₅₀, e diminuição na dos triglicerídeos C₃₈, C₄₄ e C₅₄. Quase nenhuma alteração foi observada nos triglicerídeos C₄₀-C₄₂ e C₅₂, com o emprego deste enzima.

A maior alteração verificada durante a reação foi na concentração do triglicerídeo C₅₄, a qual apresentou uma redução de aproximadamente 17% em relação à mistura reacional inicial. Rousseau e Marangoni (1998a), na interesterificação da manteiga com óleo de canola catalisada por esta mesma fonte de lipase, também verificaram maior diminuição na concentração deste triglicerídeo.

A partir da concentração em triglicerídeos em cada tempo reacional, foi possível calcular o grau de interesterificação (%) da reação. Além disso, a dosagem do teor de ácidos graxos permitiu também o cálculo do grau de hidrólise (%) promovido por lipase de *R. oryzae*. Os resultados são apresentados na Figura 4.22. Com relação ao grau de hidrólise (Figura 4.22), atingiu-se resultado inferior a 5%.

É importante ressaltar ainda que os produtos da hidrólise podem resultar em picos cromatográficos sobrepostos aos correspondentes triglicerídeos de menor tamanho de cadeia (C_{26} – C_{32}). Assim, parte substancial do previamente mencionado “aumento” no teor de triglicerídeos de menor tamanho de cadeia (Figura 4.21), na verdade pode estar relacionado à formação de ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, oriundos da hidrólise.

Figura 4.22. Rendimento de interesterificação (barra vazada) e grau de hidrólise (●) da reação de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P).

No que diz respeito ao grau de interesterificação, foi obtido 12% na reação catalisada por lipase de *R. oryzae*. É importante lembrar que o objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações provocadas na gordura do leite, pelo processo de interesterificação com óleo de soja. Assim, a Figura 4.23 permite a comparação do perfil de triglicerídeos da gordura do leite pura e do produto interesterificado.

Figura 4.23. Perfil de concentração dos triglicerídeos da gordura do leite e do produto interesterificado na reação catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), em 72 horas de processo.

A comparação das Figuras 4.20 e 4.23 permite observar que o processo de interesterificação resultou em mudança no perfil de triglicerídeos da gordura de leite, sendo esta modificação composicional diferente da obtida com a simples mistura física. Esta mudança, oriunda da troca dos resíduos de ácidos graxos entre as moléculas presentes, tem sido relatada como fonte de alterações em propriedades texturais do produto (RODRÍGUEZ et. al, 2001; ROUSSEAU; HILL; MARANGONI, 1996; SILVA; GIOELLI, 2006). Assim, a fim de se avaliar as alterações nas propriedades físicas da gordura do leite, fez-se a análise da consistência do produto interesterificado.

4.6.2. Consistência do produto interesterificado

A consistência é um aspecto funcional importante das gorduras plásticas, que são misturas de cristais de gordura sólida e óleo líquido. A relação entre as duas fases e o caráter cristalino da fase sólida determina a consistência e a firmeza das amostras (SIMÕES; GIOIELLI; OLIVEIRA, 1998). A Figura 4.24 mostra a consistência dos produtos interesterificados comparada à da gordura do leite e da mistura das matérias-primas não interesterificadas, calculadas como “yield value”, à temperatura de 10°C.

Figura 4.24. Consistência da gordura do leite, da mistura das matérias-primas não interesterificada e do produto interesterificado da reação catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), em 72 h de reação.

Os resultados mostram que apenas a adição de óleo de soja à gordura do leite provocou uma diminuição de mais de 50% em sua consistência. Rodrigues, Gioielli e Anton (2003) também observaram uma redução da consistência da gordura do leite ao misturá-la ao óleo de milho em várias proporções. Estes autores acreditam que isso seja devido ao fato de que a adição de um óleo líquido à gordura do leite cause uma diluição de sua rede cristalina e conseqüentemente a formação de uma rede estruturalmente mais frágil.

Além disso, a lipase L036P promoveu uma redução de aproximadamente 24% na consistência da mistura reacional. Esta diminuição pode ser explicada pela incorporação dos ácidos graxos insaturados do óleo de soja nos triglicerídeos presentes na gordura do leite, ou ainda pela presença de pequenas quantidades de produtos de hidrólise parcial, como mono e di-glicerídeos, os quais podem atuar como emulsificantes e modificar a textura do material (KAEWTHONG; SIRISANSANEEYAKUL; PRASERTSAN, 2005). Os resultados promissores obtidos comprovam o potencial desta reação para a melhora da espalhabilidade da gordura do leite à temperatura de refrigeração, uma vez que a consistência do produto pode ser modulada pela interesterificação enzimática.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar lipases comerciais para o emprego na interesterificação da gordura do leite com óleo de soja. Este óleo foi escolhido com base em sua composição química, rica em ácidos graxos insaturados, incluindo os essenciais linoléico e linolênico. Em função da alta complexidade das matérias-primas “gordura do leite e óleo de soja”, optou-se pela seleção inicial da enzima baseada em um sistema reacional modelo de interesterificação. Como reagentes de partida, foram escolhidos tripalmitina e trioleína, uma vez que os ácidos graxos palmítico e oléico estão presentes em grande quantidade nos triglicerídeos que compõem as matérias-primas de interesse. Os resultados obtidos foram satisfatórios, e nesse conjunto de dados pôde-se concluir que:

- As atividades das lipases estudadas com relação à hidrólise do azeite de oliva foram fortemente dependentes da fonte de cada enzima. O maior valor de $V_{\text{máx}}$ (144380 U/g) foi obtido empregando-se a lipase de *Candida rugosa* (L034P), cujo valor de K_m correspondeu a 871 mM. A maior afinidade enzima-substrato foi observada com o emprego da lipase de *Rhizopus oryzae* (Piccantase R8000), cujo valor de K_m foi 11,46 mM;
- Para as enzimas imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio, foram obtidos valores de eficiência de imobilização entre 29% e 54%, evidenciando assim que as diferentes enzimas estudadas apresentaram distintas interações enzima-suporte. As diferenças na eficiência de imobilização foram observadas não apenas para enzimas de diferentes microrganismos, mas também para as de mesma fonte microbiana, porém de origem comercial diversa;
- Todas as enzimas avaliadas foram capazes de catalisar a síntese de butirato de butila em meio orgânico, porém com desempenhos bastante distintos. A maior atividade de esterificação foi obtida com o emprego da lipase de *Candida rugosa* (L034P), tanto na forma livre quanto imobilizada. O melhor desempenho desta enzima frente as lipases de *Rhizopus oryzae* (L036P) e *Penicillium roqueforti* (L338P), entretanto, foi minimizado após a imobilização, sendo que a atividade relativa das enzimas L036P e L338P

aumentou para 72% e 32%, respectivamente, na forma imobilizada, comparada a uma atividade relativa de cerca de 9% para ambas na forma livre.

- A determinação das propriedades físicas, químicas e morfológicas do composto polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA), selecionado como matriz de imobilização das diferentes lipases comerciais, foi realizada através de análises de porosimetria, microdureza, espectroscopia no infra-vermelho e difratometria de raios X, além de microscopia eletrônica e análise elemental superficial por espectroscopia de energia dispersiva de raios X. Estas análises possibilitaram a aquisição de informações importantes sobre o suporte de imobilização e poderão servir de base a estudos futuros.
- Todas as lipases comerciais foram imobilizadas no suporte POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio, e posteriormente empregadas na catálise de reações de interesterificação da tripalmitina (60 mM) e trioleína (40 mM), em hexano. O maior rendimento de interesterificação (cerca de 31%) foi obtido com a lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P), sendo esta a lipase selecionada para continuidade do trabalho.
- A razão molar entre os materiais de partida interferiu no rendimento de interesterificação das reações em sistema modelo. O melhor resultado (45%) empregando-se a lipase de *R. oryzae* (L036P) foi alcançado no substrato equimolar de tripalmitina e trioleína (40 mM), em 24 h de reação.
- Como o derivado imobilizado selecionado foi empregado na catálise da reação de interesse (gordura do leite e óleo de soja), julgou-se adequada a determinação de suas propriedades físicas, químicas e de estabilidade do mesmo. As análises efetuadas nesta etapa incluíram espectroscopia de infravermelho e difratometria de raios X, além da distribuição granulométrica e estabilidade à estocagem. A L036P apresentou boa estabilidade à estocagem, mantendo 100% da atividade hidrolítica inicial após 120 dias de armazenamento.
- Os testes de interesterificação da gordura do leite com óleo de soja, catalisados pela lipase de *R. oryzae* foram satisfatórios. De maneira geral, esta lipase promoveu o

aumento na concentração dos triglicerídeos C₂₆-C₃₄ e C₄₆-C₅₀, e diminuição na dos triglicerídeos C₃₈ e C₅₄. Quanto ao grau de interesterificação, o resultado obtido na reação catalisada por lipase de *R. oryzae* foi de aproximadamente 12 %.

- A análise de consistência da mistura reacional (gordura do leite/óleo de soja) e do produto interesterificado comprovaram o potencial desta reação para a melhora da espalhabilidade da gordura do leite à temperatura de refrigeração. Os resultados mostraram que apenas a adição de óleo de soja à gordura do leite provocou uma diminuição de mais de 50% em sua consistência. Além disso, o produto interesterificado apresentou redução na consistência de aproximadamente 24 % em relação à da mistura física das matérias-primas, que pode ser explicada pela incorporação dos ácidos graxos insaturados do óleo de soja nos triglicerídeos presentes na gordura do leite ou ainda pela presença de pequenas quantidades de produtos de hidrólise parcial, como mono e di-glicerídeos.

Desta forma, o trabalho realizado possibilitou a seleção da preparação comercial de lipase L036 (lipase de *Rhizopus oryzae*) imobilizada em POS-PVA para a interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, permitindo assim a obtenção de produto enriquecido com os ácidos graxos essenciais presentes neste óleo. Embora experimentos de otimização de condições reacionais sejam ainda necessários, os resultados promissores obtidos com o uso deste sistema enzimático tanto na reação modelo de interesterificação de tripalmitina com trioleína, quanto nas matérias-primas lipídicas, mostraram ser adequada a seleção do mesmo visando ao seu emprego no bioprocessamento de interesse. Além disso, de acordo com informações do fabricante, esta preparação comercial atende às especificações necessárias para uso em produtos alimentícios, tratando-se inclusive de um material comestível.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O sistema catalítico selecionado foi adequado para a interesterificação da gordura do leite com óleo de soja, estabelecendo-se as bases de conhecimento necessárias para continuidade desta linha de pesquisa. Visando-se à otimização dos resultados obtidos na reação de interesterificação da gordura de leite com óleo de soja, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em matriz polissiloxano-polivinilálcool (POS-PVA), sugere-se:

- Realização de experimentos visando ao estudo da influência de variáveis importantes do processo, como a temperatura e a razão molar gordura: óleo. Com esta finalidade, podem ser empregadas técnicas de planejamento de experimentos;
- Avaliar a possibilidade de emprego de outras configurações de reatores, como reator de tanque agitado e reator de coluna com leito fixo ou fluidizado, bem como estudar as variáveis que influenciam cada sistema avaliado. Este estudo tornará possível a transferência dos conhecimentos relacionados à reação de interesterificação de interesse da escala de laboratório para escala industrial.

REFERÊNCIAS

A SOJA no Brasil Central - Expansão agrícola no Cerrado brasileiro. Available from: http://www.riosvivos.org.br/canal.php?canal=133&mat_id=1188. Access: 22/03/2007.

AKOH, C. C. Structured and Specialty Lipids. In AKOH, C. C; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOSC PRESS, 2005. 762 p. ISBN: 1-893997-51-0.

ALCANTARA, A. R., FUENTES, I. E. and SINISTERRA, J. V. *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: An overview. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998, v. 93, n. 1-2, p. 169-184.

AL-DURI, B. and YONG, Y. P. Characterization of the equilibrium behavior of lipase PS (from *Pseudomonas*) and Lipolase 100 L (from *Humicola*) onto Accurel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997, v.3, p. 177-188.

ALFENAS, A. C., PETERS, I., BRUNE, W. e PASSADOR, G.C. *Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais*. Viçosa: Universidade Federal Viçosa, 1991. 242 p.

BALCÃO, V. M., KEMPPINEM, A., MALCATA, F. X. and KALO, P. J. Modification of butterfat by selective hydrolysis and interesterification by lipase: Process and product characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, v. 75, n. 10, p. 1347-1358.

BALCÃO, V. M. and MALCATA, F. X. Interesterification and acidolysis of butterfat with oleic acid by *Mucor javanicus* lipase: changes in the pool of fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, v. 22, n. 6, p. 511-519.

BALCÃO, V. M. and MALCATA, F. X. Lipase-catalyzed modification of butterfat via acidolysis with oleic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997, v. 3, p. 161-169.

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

BALCÃO, V. M. and MALCATA, X. Enzyme-Mediated Modification of Milkfat. In KUO, T. M; GARDNER, H. W. *Lipid Biotechnology*. United States of America: Marcel Dekker, 2002. 716 p. ISBN: 0-8247-0619-6.

BARRERA-ARELLANO, D. Ácidos Graxos Trans. Available from: http://www.simabesp.org.br/arquivos/Apresenta_UNICAMP.pdf. Access: 09/12/2006.

BASRI, M., YUNUS, W. M. Z. W., YOONG, W. S., AMPON, K., RAZAK, C. N. A. and SALLEH, A. B. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on synthetic polymer beads for use in the synthesis of fatty esters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1996, v. 66, p. 169-173.

BENZONANA, G. Some properties of an exocellular lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Lipids*, 1974, v. 9, n. 3, p. 166-172.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, v. 72, p. 248-254.

BRAGA, L. P. *Estabilização da lipase de Candida rugosa em suportes híbridos de polissiloxano e álcool polivinílico obtidos pela técnica sol-gel.* Lorena: Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005. 64 p. Projeto FAPESP 04/06087-1. Relatório de Atividades de Iniciação Científica.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Disponível em: <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#> Acesso em: 15/03/2007.

BRUNO, L. M., COELHO, J. S., MELO, E. H. M. and LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, v. 21, n. 2, p. 189-192.

BRYN, J., WIRKOWSKA, M. and KOWALSKI, B. Interesterification of milkfat and sunflower oil mixtures in the presence of Novozym 435. *Zywnosc*, 2006, v.13, n. 2 (Supl.), p. 28-35.

BRYN, J., WIRKOWSKA, M., RATUSZ, K. and KOWALSKI, B. Use of a nonspecific enzyme for modification of properties of mixtures of milk fat with sunflower oil. *Tłuszcze Jadalne*, 2006, v. 41, n.1/2, p. 123-130.

CAO, L. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2006. Cap. 3: Covalent Enzyme Immobilization. ISBN: 3527312323.

CAPRILES, V. D. and ARÊAS, J. A. G. Desenvolvimento de salgadinhos com teores reduzidos de gordura saturada e de ácidos graxos trans. *Ciência e tecnologia de alimentos*, 2005, v. 25, n. 2, p. 363-369.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., ROCHA, J. M. S., GARCIA, F. A. P. and GIL, M. H. Lipase immobilisation on to polymeric membranes. *Biotechnology Techniques*, 1999, v. 13, n. 6, p. 403-409.

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

CASTRO, H. F. and ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, 1995, v. 18, n. 6, p. 544-554.

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

CHARTON, E. and MACRAE, A. R. Specificities of immobilized *Geotrichum candidum* CMICC 335426 lipases A and B in hydrolysis and ester synthesis reactions in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, v. 15, n. 6, p. 489-93.

CHIARA, V. L., SILVA, R., JORGE, R. and BRASIL, A. P. Trans fatty acids: cardiovascular diseases and mother-child health. *Revista de nutrição*, 2002, v. 15, n. 3, p. 341-349.

CHOWDARY, G. V. and PRAPULLA, S. G.; The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochemistry*, 2002, v. 38, n. 3, p. 393-397.

COELHO, R. A. L., YAMASAKI, H., PEREZ, E. and CARVALHO, L. B. Jr. The use of polysiloxane / polyvinyl alcohol beads as solid phase in IgG anti-*Toxocara canis* detection using a recombinant antigen. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, v. 98, n. 3, p. 391-393.

COLTHUP, N. B., DALY, L. H. and WIBERLEY, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. United States of America: Academic Press, 1990. 544 p. ISBN: 0-12-182554-X.

DALLA-VECCHIA, R., NASCIMENTO, M. G. and SOLDI, V. Synthetic applications of lipases immobilized on polymers. *Química Nova*, 2004, v. 27, n. 4, p. 623-630.

FABER, K. *Biotransformation in Organic Chemistry: A Textbook*. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 1997. Cap. 1, 2 e 3.

FAGUNDES, L. A. *Ômega-3 & Ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças*. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, 2002. 111 p. ISBN: 8574971162.

FIRESTONE, D. *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes*. 2nd ed. Washington: AOCS PRESS, 2006. 237 p. ISBN: 978-1-893997-99-8.

FREITAS, L., BUENO, T., PÉREZ, V. H., SANTOS, J. C. e CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 2: Importantes aspectos da alternativa biotecnológica. *Ciência e Cultura*, 2006a, v. 1, n. 1, p. 50- 60.

FREITAS, L., BUENO, T., PÉREZ, V. H., SANTOS, J. C. e CASTRO, H. F. Produção de ácidos graxos poliinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo. Parte 1: Aspectos nutracêuticos e características da tecnologia atual de hidrólise. *Ciência e Cultura*, 2006b, v. 1, n. 1, p. 43- 49.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, v. 74, p. 621.

GEORGIO, G. and HUBBELL, J. A. Protein Engineering. In: MCKETTA, J. J. (ed.) *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. New York: Marcel Dekker, 1993. p.142-176.

GERMAN, J. B. and DILLARD, C. J. Fractionated milk fat: Composition, structure, and functional properties. *Food Technology*, 1998, v. 52, n. 2, p. 33-38.

GHAZALI, H. M., HAMIDAH, S. and CHE-MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995, v. 72, p. 633-639.

GHOTRA, B. S., DYAL, S. D. and NARINE, S. S. Lipid shortenings: a review. *Food Research International*, 2002, v. 35, p. 1015–1048.

GILL, I. and BALLESTEROS, A. A bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): Sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology*, 2000, v. 14, n. 11, p. 442-442.

GILL, I. and BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol-gel polymers: An efficient and generic approach. *Journal of the American Chemical's Society*, 1998, v. 120, n. 34, p. 8587-8598.

GIOIELLI, L. A. Interesterificação de óleos e gorduras. *Revista Engenharia de Alimentos*, 1998, v. 4, p. 22-24.

GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by processes. *Lipids*, 1999, v. 6, p. 365-372.

GUPTA, R., RATHI, P. and BRADDOO, S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003, v. 43, n. 6, p. 635-644.

HAIGHTON, A. J. The measurement of the hardness of margarine and fats with cone penetrometers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1959, v. 36, n. 8, p. 345-348.

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

HASLER, C.M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology*, 1998, v. 52, n. 11, p. 63-70.

HERNÁIZ, M. J., SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. and SINISTERRA, J. V. Modification of purified lipases from *Candida rugosa* with polyethylene glycol: a systematic study. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, v. 24, p. 181-190.

HIRATSUKA, R. S., SANTILLI, C. V. and PULCINELLI, S. H. Sol-gel process – physicochemical aspects. *Química Nova*, 1995, v. 18, n. 2, p. 171-180.

HORNSTRA, G. Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Fett/Lipid*, 1999, v. 101, n. 12, p. 456-466.

HUI, Y. H. *Bailey's industrial oil and fat products*. 5th ed. New York: Wiley, 1996. v. 2: p. 125-158; v. 3: p. 1-63.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo, 1985. 3a. ed., 533 p.

IWASAKI, Y. and YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, n. 10, p. 129-140.

JAEGER, K. E. and EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, v. 13, n. 4, p. 390-397.

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

JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids*, 1983, v. 18, p. 650-657.

JIMÉNEZ-FLORES, R. Trends in research for alternate uses of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 1997, v. 80, p. 2644 – 2650.

KAEWTHONG, W., SIRISANSANEEYAKUL, S. and PRASERTSAN, P. Continuous production of monoacylglycerols of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry*, 2005, v. 40, n.5, p.1525-1530.

KATAN, M. B. Trans fatty acids and plasma lipoproteins. *Nutrition reviews*, 2000, v. 58, n. 6, p. 188-191.

KAWANARI, M. Butter's characteristics: Effect of processing. *INFORM*, 1996, v. 7, n. 10, p. 1104-1110.

KAZLAUSKAS, R. J. and BORNSCHEUER, U. T. Biotransformation with lipases. In REHM, H.J., PIHLER G., STADLER, A. and KELLY, P. J.W. A Multi-Volume Comprehensive *Treatise in Biotechnology*. New York: Wiley VCH Verlag, 1998. p. 37-192.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature Insight*, 2001, v. 409, n. 6817, p.241-246.

KNIGHT, M. I. and CHAMBERS, P. J. Problems associated with determining protein concentration: A comparison of techniques for protein estimations. *Molecular Biotechnology*, 2003, v. 23, n. 1, p. 19-28.

LABOUREUR, P. and LABROUSSE, M. *Rhizopus arrhizus* lipase. Extraction, purification, and properties of the lipase from *Rhizopus arrhizus* var *delemar*. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, 1966, v. 48, n. 6, p. 747-70.

LAI, O. M., GHAZALI, H. M., CHO, F. and CHONG, C. L. Physical properties of lipase-catalyzed transesterified blends of palm stearin and anhydrous milk fat. *Food Chemistry*, 2000, v. 70, n. 2, p. 215-219.

LAMBOURSAIN, L., MARTY, A., KERMASHA, S., CONDORET, J. S. and COMBES, D. Enzymic transesterification of a triacylglycerol mixture : application to butterfat modification. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1996, p. 678-682.

LAWSON, H. *Food Oils and Fats: technology, utilization, and nutrition*. London: Chapman & Hall, 1995. 339 p. ISBN: 0-412-98841-0.

LEE, K. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids: Synthesis and applications. *Food Reviews International*, 1998, v. 14, n. 1, p. 17-34.

LIMA-BARROS, A., ALMEIDA, A. M. P., CARVALHO Jr., L. B. and AZEVEDO, W. M. Polysiloxane/PVA-glutaraldehyde hybrid composite as solid phase for immunodetections by ELISA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002, v. 35, p. 459-463.

LOPEZ-HERNANDEZ, A., GARCIA, H. S. and HILL, Jr. C. G. Lipase - catalyzed transesterification of medium - chain triacylglycerols and a fully hydrogenated soybean oil. *Journal of Food Science*, 2005, v. 70, n. 6, p. 365-372.

MALCATA, F. X., GARCIA, H. S., HILL, Jr. C.G. and AMUNDSON, C. H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: part I. Lipase adsorption studies. *Biotechnology and Bioengineering*, 1992, v. 39, n. 6, p. 647-57.

MANSUR, H. S., OREFICE, R. L. and MANSUR, A. A. P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*, 2004, v. 45, n. 21, p. 7193-7202.

MARANGONI, A. G. and ROUSSEAU, D. Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Research International*, 1999, v. 31, n. 8, p. 595-599.

MARANGONI, A. G. and ROUSSEAU, D. The influence of chemical interesterification on physicochemical properties of complex fat systems. 1. Melting and crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, v. 75, p. 1265-1271.

MARANGONI, A. J. Lipases: Structure, Function, and Properties. In KUO, T. M; GARDNER, H. W. *Lipid Biotechnology*. United States of America: Marcel Dekker, 2002. 716 p. ISBN: 0-8247-0619-6.

MARANGONI, A.G. and ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends in Food Science and Technology*, 1995, v. 6, p. 329-335.

MARIA, P. D., SANCHEZ-MONTERO, J. M., SINISTERRA, J. V. and ALCANTARA, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances*, 2006, v. 24, n. 2, p. 180-196.

McGRADY, J. More-healthy fats and oils. *Food Technology*, 1994, p. 148.

MORETTO, E. and FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

NAGATA, N., BUENO, M. I. M. S. and PERALTA-ZAMORA, P. G. Mathematical methods to correct spectral interferences and interelemental effects in x-ray fluorescence quantitative analysis. *Química Nova*, 2001, v. 24, n. 4, p. 531-539.

NEIVA, P. Alerta contra a gorduras trans: Ganha força o movimento para banir da alimentação a mais perigosa das gorduras. *Revista Veja*, 23 fevereiro 2005.

NEIVA, P. Está no rótulo: a tabela nutricional deve informar a quantidade de gordura trans nos alimentos. *Revista Veja*, 9 agosto 2006. p. 86.

ODA Y., YAJIMA, Y., KINOSHITA, M. and OHNISHI, M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiology*, 2003, v. 20, p. 371-375.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M. and MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, v. 27, p. 187-204.

PAULA, A. V., MOREIRA, A. B. R., BRAGA, L. P., BRUNO, L. M. and CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. *Química Nova*, 2008, v. 31, n. 1, p. 35-40.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2007, v. 82, n. 3, p. 281-288.

PEREIRA, A. P. V., VASCONCELOS, W. L. and OREFICE, R. L. Novel multicomponent silicate-poly(vinyl alcohol) hybrids with controlled reactivity. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2000, v. 273, n. 1-3, p. 180-185.

PRECHT, D; MOLKENTIN, J. *The certification of the triglyceride contents of an anhydrous butter fat reference material with additional value for free cholesterol CRM 519*. Brussels, Luxembourg: COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, ECSC-EC-EAEC, 1997.

QUEIROZ, N. *Síntese Enantiosseletiva de Amidas e Ésteres Catalisada por Lipases*. Florianópolis: Centro de Ciências Físicas e Matemáticas; Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. 152 p. Tese de Doutorado em Química Orgânica.

RODRIGUES, J. N. and GIOIELLI, L. A. Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Research International* , 2003, v. 36, p. 149–159.

RODRIGUES, J. N., GIOIELLI, L. A. and ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2003, v. 23, p. 226-233.

RODRIGUES, J. N., GIOIELLI, L. A. and ANTON, C. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos de misturas de gordura do leite e óleo de milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2003, v. 23, p. 226-233.

RODRÍGUEZ, A., CASTRO, E., SALINAS, M. C., LÓPEZ, R. and MIRANDA, M. Interesterification of tallow and sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, v. 78, n. 4, 431– 436.

RONNE, T. H., YANG, T., MU, H., JACOBSEN, C. and XU, X. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, v. 53, p. 5617-5624.

ROUSSEAU, D., FORESTIERE, K., HILL, A. R. and MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, v. 73, p. 963-972.

ROUSSEAU, D., HILL, A. R. and MARANGONI, A. G. Restructuring butterfat through blending and chemical interesterification. 3. Rheology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, v.73, n. 8, 983–989.

ROUSSEAU, D. and MARANGONI, A. G. Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 1. Compositional modifications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998a, v. 46, n. 6, p. 2368-2374.

ROUSSEAU, D. and MARANGONI, A. G. Tailoring the Textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 2. Modifications of physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998b, v. 46, n. 6, p. 2368-2374.

ROZENDAAL, A. Interesterification of oils and fats. *INFORM*, 1992, v. 3, p. 1232-1237.

ROZENDAAL, A and MACRAE, A. R. Interesterification of Oils and Fats. In: GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B.. *Lipid Technologies and Applications*. United States of America: Marcel Dekker, 1997. 834 p. ISBN: 0-8247-9338-4.

SAHIN, N., AKOH, C. C. and KARAALI, A. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 2005, v. 53, p. 5779-5783.

SAMBANTHAMURTI, R., SHAHRUL, S. and PARVEEZ, G. K. A. Safety, Regulatory Aspects, and Public Acceptance of Genetically Modified Lipids. In AKOH, C. C; LAI, O. M. *Healthful Lipids*. United States of America: AOSC PRESS, 2005. 762 p. ISBN: 1-893997-51-0.

SANT'ANA, L. S. Biochemical mechanisms involved in the Omega fatty acids digestion, absorption and metabolism. *Brazilian Journal in Health Promotion*, 2004, v. 17, n. 4, p. 211-216.

SANTOS, J. C., PAULA, A.V., NUNES, G. F. M. and CASTRO, H. F. *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 2008, v. 61, 229-236.

SARIYAR, L. and HEPERKAN, D. The role of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* in the hydrolysis of hazelnut fat. *International Journal of Food Science and Technology*, 2003, v. 38, n. 4, p. 487-492.

SAXENA, R. K., SHEORAN, A., GIRI, B. and DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, v. 52, p. 1 – 18.

SAYARI, A., FRIKHA, F., MILED, N., MTIBAA, H., ALI, Y. B., VERGER, R. and GARGOURI, Y. N - terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. *FEBS Letters*, 2005, v. 579, n. 5, p. 976-982.

SEMERIVA, M., BENZONANA, G. and DESNUELLE, P. Purification of a lipase from *Rhizopus arrhizus*. Identification of two active forms of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 1967, v. 144, n. 3, p. 703-712.

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

SILVA, R. C. and GIOIELLI, L. A. Propriedades físicas de lipídios estruturados obtidos a partir de banha e óleo de soja. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2006, v. 42, n. 2, p. 223 – 235.

SIMÕES, I. S., GIOIELLI, L. A. and OLIVEIRA, M. N. Consistência de mistura de gorduras hidrogenadas e óleo de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 1998, v. 18, n. 3, p. 325-330.

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

SOLOMONS, T. W. G. e FRYHLE, C. *Química Orgânica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v. 1: p. 766. ISBN: 85-2161449-7.

SOUMANOU, M. M., BORNSCHEUER, U. T., MENGE, U. and SCHMID, R. D. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, v. 74, n. 4, p. 427-433.

STUART, B., GEORGE, W. O. and McINTYRE, P. S. *Modern Infrared Spectroscopy: Analytical Chemistry by Open Learning*. In: ANDO, D. J. John Wiley & Sons, 1996. 180 p.

TORRES, E. A. F. S. *Alimentos do milênio: a importância dos transgênicos, funcionais e fitoterápicos para a saúde*. São Paulo: Signus, 2002, p. 94.

TREVISAN, H. C. Lipases. In SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (ed.) *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 7. p.115-135.

UHLIG, H. *Industrial Enzymes and Their Applications*. Traduzido por E. M. Linsmaier-Bednar. United States of America: Jhon Wiley & Sons, 1998. 454 p. ISBN: 0-471-19660-6.

UYTTENBROECK, W., HENDRIKS, D., VRIEND, G., DE BAERE, I., MOENS, L. and SCHARPE, S. Molecular characterization of an extracellular acid - resistant lipase produced by *Rhizopus javanicus*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 1993, v. 374, n.4, p. 245-54.

VAKHLU, J. and KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2006, v. 9, n. 1, p. 69-85.

VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J. M. and HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, v. 9, n. 4-6, p. 113-148.

WEBER, H. K., STECHER, H. and FABER, K. Some properties of commercially available crude lipase preparations. In ROBERTS, S. M. (ed.). *Preparative Biotransformations*. 1995, p. 5-21.

WILLIS, W. M. and MARANGONI, A. G. Assessment of lipase - and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, v. 76, n. 4, p. 443-450.

WINTER, C. M. G. *Avaliação dos teores de ácidos graxos trans em batata palha comercializada na cidade de Curitiba-PR*. Curitiba: Tecnologia de Alimentos; Universidade Federal do Paraná, 2006. 84 p. Dissertação de Mestrado.

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

APÊNDICES

Apêndice 1. Curva padrão para dosagem de proteína pelo Método Bradford

Figura 8.1. Curva padrão para dosagem de proteína pelo Método de Bradford

Apêndice 2. Eletroforese em gel da lipase de *Candida rugosa* (L034P)

Figura 8.2. Eletroforese em gel da lipase de *Candida rugosa* (L034P)

Apêndice 3. Atividade hidrolítica das lipases comerciais (livres) em diferentes concentrações de azeite de oliva para determinação dos parâmetros cinéticos (37°C, pH 7,0).

Equivalente em ácidos graxos (mM)	Azeite de oliva (v/v) (%)	Atividade (U/g)						
		L034P	L036P	L0338P	Lipase A	Lipase M	Piccantase A	Piccantase R-8000
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,72	0,1	-	-	-	-	-	-	3289,06
18,60	0,5	-	-	-	-	4424,80	-	4202,08
27,90	0,75	-	-	-	-	-	-	5896,11
37,2	1	-	-	-	-	-	479,93	7524,14
93	2,5	-	-	-	-	6221,00	-	-
186	5	31075,03	10040,17	7223,07	2015,89	9243,88	2879,55	8129,15
372	10	47754,84	31071,80	10096,02	5445,10	11450,09	4504,76	9207,17
744	20	55261,34	46922,88	14574,09	9071,51	14145,00	4853,79	-
1116	30	79121,27	61776,83	14795,08	14397,62	13548,20	6075,41	-
1488	40	97992,42	64378,56	15620,91	-	-	6784,41	8569,15
1860	50	97607,77	74315,57	13294,64	17407,24	14601,79	6457,18	8569,16
2604	70	-	-	-	17113,16	-	-	-

Apêndice 4. Concentração de butanol, ácido butírico e butirato de butila na reação de esterificação catalisada por diferentes lipases na forma livre

L034P Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	31,24	44,39	80,35
4	22,72	29,55	103,61
8	11,36	22,67	114,10
24	8,52	19,16	114,44

L036P Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	102,24	89,31	7,64
4	110,76	100,92	0,69
8	88,04	96,47	13,06
24	54,44	62,87	55,00

L338P Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	105,08	104,70	0,63
4	110,76	98,49	0,76
8	102,24	89,85	4,86
24	93,72	81,35	22,64

Lipase A Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	102,24	100,24	0,21
4	102,24	101,73	0,21
8	102,24	100,78	2,36
24	99,40	89,85	10,69

Lipase M Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	96,56	88,63	3,68
4	96,56	91,34	3,47
8	90,88	90,93	12,36
24	48,28	48,17	77,01

Piccantase A Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	99,40	107,80	0,00
4	110,76	100,92	0,00
8	110,76	103,75	0,28
24	110,76	96,06	0,35

Piccantase R8000 Concentração (mM)			
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	99,40	106,99	0,00
4	110,76	105,23	0,00
8	110,76	104,96	0,35
24	96,56	66,78	19,10

Apêndice 5. Concentração de butanol, ácido butírico e butirato de butila na reação de esterificação catalisada por diferentes lipases imobilizadas em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio.

L034P	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	85,18	79,06	9,86
4	68,61	77,04	26,94
8	28,14	58,01	61,18
24	13,49	48,30	73,96

L036P	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	100,22	98,62	3,13
4	75,93	84,19	14,24
8	32,38	53,97	46,53
24	14,65	29,82	68,75

L338P	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	94,43	97,27	3,89
4	87,11	91,61	7,36
8	75,16	89,04	16,94
24	31,61	52,35	55,14

Lipase A	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	102,53	98,62	0,69
4	95,59	97,95	0,63
8	98,29	97,54	1,88
24	84,80	77,85	8,19

Lipase M	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	105,23	99,57	0,63
4	101,76	105,91	0,83
8	99,83	93,77	1,81
24	87,50	69,48	14,38

Piccantase A	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	112,17	90,12	0,00
4	98,29	105,37	0,35
8	92,51	95,12	0,97
24	89,42	70,83	9,10

Piccantase R8000	Concentração (mM)		
Tempo	ÁCIDO	BUTANOL	BUTIRATO
2	105,61	91,61	0,83
4	110,24	104,83	0,76
8	94,82	94,85	1,94
24	90,58	82,16	6,39

Apêndice 6. Estabilidade á estocagem: Atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) imobilizada em POS-PVA ativado com metaperiodato de sódio

Data	Data	Atividade (U/mg)
6/11/2007	23/12/2007	4000,43
7/02/2008	23/01/2008	3872,19
7/03/2008	23/02/2008	5007,38