# UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES - URI - CAMPUS DE ERECHIM

# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIRIAN CRISTINA FEITEN

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA EM
BANHO DE ULTRASSOM

ERECHIM, RS - BRASIL

**FEVEREIRO DE 2013** 

#### MIRIAN CRISTINA FEITEN

# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA EM BANHO DE ULTRASSOM

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos: Área de Concentração - Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

Orientadores: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Profa. Dra. Débora de Oliveira

Profa. Dra. Clarissa Dalla Rosa

ERECHIM, RS - BRASIL

**FEVEREIRO DE 2013** 

#### MIRIAN CRISTINA FEITEN

# HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE SOJA EM BANHO DE ULTRASSOM

Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:



Erechim, 20 de fevereiro de 2013.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Alceu e Ana, e aos meus irmãos, Anderson, Alessandro e Luan.

"Família é o porto seguro. Família é um presente de Deus. Onde o amor se faz presente cada instante, mesmo com as diferenças. Não importa se é de sangue ou afetivo. O importante é que essa união é movida por afagos e cuidados. Feliz daquele que tem uma família."

#### **AGRADECIMENTOS**

À Deus e à vida, pelas oportunidades profissionais, pelas pessoas que me cercam e por ter sempre guiado o meu caminho.

Aos meus orientadores Débora de Oliveira, José Vladimir de Oliveira e Clarissa Dalla Rosa, por toda a ajuda e disposição durante a realização deste trabalho, pela confiança depositada, por compartilharem de seus conhecimentos, por toda a paciência e amizade. Vocês são incríveis!

Aos meus pais, Alceu e Ana, por todo apoio e amor que sempre foram a mim dedicados. A fé que vocês têm em mim é meu combustível. Agradeço a vocês por tudo.

Aos meus irmãos Anderson, Alessandro e Luan, que sempre me apoiam, me ajudam, me incentivam e me aguentam. Amo muito vocês!

Ao meu esposo, Marcio, que está sempre caminhando ao meu lado, me apoiando. Obrigada pelo seu amor e por acreditar sempre em mim!

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI, por todo o conhecimento repassado no decorrer destes 2 anos.

Aos amigos Cristina e Maurício que, mais que amigos, são irmãos pra mim. Obrigada por terem estendido sua mão no momento que eu mais precisei!

À minha colega de mestrado e amiga Cindy, por todas as conversas, pelos ensinamentos, por sempre ter as palavras certas a dizer, pelos churrascos, enfim, por ser minha amiga apesar de todas as diferenças. Aqui você terá sempre uma amiga de verdade.

À minha colega de mestrado e amiga Simone, por me aguentar diariamente no laboratório, pelas conversas e risadas, pelos ensinamentos e, sobretudo, por ter me ajudado em momentos de dificuldade no início do mestrado. Levarei você para sempre comigo.

Aos meus queridos amigos Lindomar, Mara, Daiane e em especial a Dani Remonatto, por toda a ajuda e acolhimento quando das minhas viagens à Florianópolis. Vocês são demais!

Aos bolsistas de IC Angélica, Juliana, Mariana, Katarine e Vinícius por toda a ajuda desprendida durante a realização dos experimentos, trabalho muitas vezes cansativo, mas que no final valeu muito a pena.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Termodinâmica, Sandy, Cláudia, Jonas, Robinho e tantos outros que gostaria de citar, pela amizade, auxílio, companheirismo, conversas e risadas no decorrer de nossa convivência diária.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Biotecnologia de Alimentos pela amizade e auxílio.

À URI - Campus de Erechim, que permitiu a realização deste trabalho e ofereceu condições e estrutura para alcançar estes resultados.

À Capes pelo financiamento à pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

#### **RESUMO**

A hidrólise de triacilgliceróis é a principal reação para produção de ácidos graxos livres (AGL) que podem, então, ser esterificados, transesterificados ou convertidos em álcoois graxos de alto valor. A hidrólise enzimática é uma alternativa aos métodos convencionais e vem sendo empregada com sucesso em sistemas livres de solvente, evitando assim custos energéticos indesejáveis na etapa de separação, resíduos nos produtos finais e minimizando o impacto ambiental. A hidrólise enzimática ocorre na interface entre as fases aquosa e oleosa, implicando na existência desta interface para que o biocatalisador atue de forma satisfatória. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é propor uma nova tecnologia para a produção enzimática de ácidos graxos livres a partir de óleo de soja, empregando as lipases comerciais de pâncreas suíno e Lipozyme TL IM, e utilizando ultrassom como gerador de emulsões de água em óleo. Estudos cinéticos foram realizados na razão molar óleo:água de 1:9, 100% da potência do ultrassom (132 W), temperatura de 65°C e agitação mecânica de 600 rpm; sendo uma emulsão prévia obtida nestas condições num tempo mínimo de 90 minutos e, a partir daí, deu-se início à reação pela adição de 10% de enzima sobre a massa dos substratos. Todo este procedimento foi realizado para as duas enzimas estudadas. Também foram avaliadas as cinéticas sem influência do ultrassom durante a reação de hidrólise, onde o mesmo foi empregado apenas na etapa prévia de formação de emulsão. A acidez das amostras foi quantificada através de titulação com KOH 0,1M e expressa em percentual mássico de ácidos graxos livres. Para ambas as enzimas estudadas, a conversão máxima obtida nestas condições foi de 25% em até 24 horas de reação. Através de análises de Karl Fisher, foram identificadas altas taxas de evaporação de água e, então, os ensaios foram repetidos sem a formação de emulsão prévia. Nestas condições, foram obtidos 89% de ácidos graxos livres, em 2 horas de reação, empregando a lipase comercial Lipozyme TL IM, não sendo observada elevada influência do ultrassom na reação de hidrólise. Testes empregando a enzima Lipozyme TL IM na hidrólise de óleo de soja em reator contínuo, com razão molar óleo:água de 1:9, agitação de 600 rpm, a 65°C e vazão de entrada contínua de 0,5 mL/min, conduziram a conversões de até 94% após o primeiro tempo de residência (27 minutos), e o sistema de ultrassom também não apresentou grande influência na produção de AGL. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam contribuição imediata à literatura especializada, uma vez que altas conversões de AGL foram obtidas em baixos tempos de reação, mostrando ser, a tecnologia testada, além de limpa, bastante promissora do ponto de vista técnico.

Palavras-chave: hidrólise, óleo de soja, lipase, emulsão, ultrassom.

#### **ABSTRACT**

The hydrolysis of triacylglycerols comprises the main first reaction towards the production of free fatty acids (FFA), that can then be interesterified, transesterified, or converted into high-value fatty-based products. Enzymatic hydrolysis is an alternative to conventional methods and has been successfully employed in solvent-free systems, hence avoiding undesirable separation energy costs, residues in the final products and minimizing environmental concerns. It is known that hydrolysis takes place at the interface between the aqueous and oil phases, where the enzyme preferably acts as an efficient surface-contact catalyst as a first step reaction. In this context, this work reports the use of a new technology for enzymatic production of free fatty acids from soybean oil in ultrasound-assisted system, employing commercial lipases from porcine pancreas and Lipozyme TL IM. Kinetic studies were carried at the molar ratio oil:water 1:9, 100% ultrasound power rate (132 W), temperature of 65°C and mechanically stirring rate of 600 rpm. An emulsion was previously obtained under these conditions under 90 minutes and then the reaction was started by the addition of 10 wt% of enzyme (by weight of whole substrates). This entire procedure was performed for the two enzymes studied. The same kinetic evaluation was also conducted without the use of ultrasound during the hydrolysis reaction, where it was used only in emulsion formation step. The acidity of the samples was quantified by titration with KOH 0.1M and it was expressed in mass percentage of free fatty acids. For both enzymes studied. the maximum conversion obtained was 25% in 24 hours reaction. However, taking into account high evaporation rates, experiments were repeated without previous emulsion formation step to prevent water losses. Accordingly, conversions as high as 89% were obtained in 2 hours reaction employing lipase Lipozyme TL IM, and there wasn't significant influence of ultrasound on the hydrolysis reaction. Tests using Lipozyme TL IM in the hydrolysis of soybean oil at the continuous reactor, with a molar ratio oil: water 1:9, temperature of 65°C, mechanically stirring rate of 600 rpm and continuous input flow of 0,5 mL/min, reached 94% conversion after the first residence time (27 minutes), and also no significant influence of the ultrasound system on the production of free fatty acids was observed. The results of this work consist in a contribution to the specialized literature since high conversion at low reaction times was obtained, thus indicating a very promising clean technology.

Keywords: hydrolysis, lipase, vegetable oils, ultrasound.

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Estrutura básica dos acilgliceróis6
Figura 2: Diagrama esquemático contendo as etapas gerais do processo de
hidro-esterificação10
Figura 3: Esquema geral das reações de esterificação e hidrólise19
Figura 4: Reações catalisadas por lipases20
Figura 5: Mecanismo catalítico proposto para lipase. O número dos
aminoácidos refere-se à lipase oriunda do Rhizopus oryzae24
Figura 6: Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por
lipases
Figura 7: Esquema genérico de um banho de ultrassom29
Figura 8: Esquema genérico de um aparelho de ultrassom de sonda 29
Figura 9: Esquema genérico de emulsões O/A e A/O35
Figura 10: Esquema das reações de hidrólise em banho de ultrassom 46
Figura 11: Aparato experimental das reações de hidrólise enzimática 47
Figura 12: Aparato experimental utilizado para a hidrólise enzimática de óleo
de soja em modo contínuo em banho de ultrassom49
Figura 13: Microemulsão obtida nas seguintes condições: razão molar
óleo:água 1:9, 100% de potência do ultrassom, 65 °C, agitação de 600 rpm,
durante 90 minutos
Figura 14: Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de
ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:3, 1% de enzima, 600 rpm,
40% de potência, 55 °C <b>54</b>
Figura 15: Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de
ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm,
100% de potência, 65 °C. Velocidade inicial de reação, r (h <sup>-1</sup> ) de 15,55 <b>55</b>
Figura 16: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de pâncreas suíno,
com emprego de ultrassom na formação da emulsão e durante a reação e
apenas empregando ultrassom na formação da emulsão. Velocidades iniciais
de reação, r (h <sup>-1</sup> ) de 15,55 e 20,37, respectivamente <b>56</b>
Figura 17: Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de
ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm,
100% de potência, 65 °C. Velocidade inicial de reação, r (h <sup>-1</sup> ) de 30,74 <b>57</b>

Figura 18: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com
emprego de ultrassom e apenas empregando ultrassom na formação da
emulsão, sem empregá-lo durante a etapa reacional. Condições experimentais:
razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, 100% de potência, 65 °C.
Velocidades iniciais de reação, r (h <sup>-1</sup> ) de 30,74 e 10,71, respectivamente <b>58</b>
Figura 19: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de pâncreas suíno,
com emprego de ultrassom, sem formação de emulsão prévia, por (a) batelada
e (b) batelada alimentada (0,068 mL/min). Condições experimentais: razão
molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%, 65 °C <b>61</b>
Figura 20: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com
emprego de ultrassom, sem formação de emulsão prévia, por (a) batelada e (b)
batelada alimentada (0,068 mL/min). Condições experimentais: razão molar
1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%, 65 °C. Velocidades iniciais de
reação, r (min <sup>-1</sup> ) de 1,07 <b>(a)</b> e 0,72 <b>(b)62</b>
Figura 21: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, sem
formação de emulsão prévia, com e sem emprego de ultrassom, por <b>(a)</b>
batelada (velocidades iniciais de reação, r (min <sup>-1</sup> ) de 1,07 e 0,56,
respectivamente) e (b) batelada alimentada (0,068 mL/min) (velocidades
iniciais de reação, r (min <sup>-1</sup> ) de 0,72 e 0,63, respectivamente). Condições
experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%,
65 °C <b>64</b>
Figura 22: Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com e
sem emprego de ultrassom, em reator contínuo. Cada tempo de residência
equivale a 27 minutos. Condições experimentais: razão molar óleo:água de 1:9,
temperatura de 65 °C 100% da potência do ultrassom

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais ácidos graxos conhecidos na natureza   8
Tabela 2: Conteúdo de acilgliceróis em óleos comestíveis de várias origens . 11
Tabela 3: Composição de ácidos graxos no óleo de soja segundo a RDC 482
da ANVISA11
Tabela 4: Consumo mundial de óleos vegetais segundo os usos (industrial e
alimentar, em mil toneladas, para a safra 2006/2007) 12
Tabela 5: Consumo total de óleos vegetais no Brasil e segundo o uso
(alimentar e industrial) em 2006/07 (mil toneladas)13
Tabela 6: Aparência da emulsão como função do tamanho da partícula da fase
dispersa
Tabela 7: Atividade hidrolítica das lipases comerciais, medida a 37 e 65 °C a
150 rpm
Tabela 8: Condições encontradas para formação de emulsão transparente,
num tempo de 90 minutos e agitação fixa em 600 rpm53
Tabela 9: Teor de água das amostras emulsionadas em ultrassom (65 °C, 600
rpm, 100% potência) quantificado por titulação de Karl Fisher. Média de 5
repetições por amostra
Tabela 10: Resumo dos trabalhos de hidrólise enzimática de óleos vegetais
presentes na literatura67

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral	3
1.1.1 Objetivos específicos	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Óleos e gorduras	4
2.2 Ácidos graxos livres	6
<b>2.3</b> Óleo de Soja	10
<b>2.4</b> Enzimas	
2.5 Lipases	
2.5.1 Mecanismo de catálise das lipases	
2.6 Reações de hidrólise catalisadas por lipases	
2.7 Ultrassom	
<b>2.8</b> Emulsões	
2.9 Considerações Finais	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
<b>3.1</b> Materiais	
3.1.1 Reagentes	
3.1.2 Enzimas	
3.2 Metodologias	
3.2.1 Determinação da atividade de hidrólise	
3.2.2 Quantificação da Acidez	
3.2.3 Quantificação do teor de água	
3.3 Cálculo da taxa inicial de reação	45
3.4 Procedimento Experimental	45
3.4.1 Hidrólise enzimática em modo batelada e batelada alimentada	
3.4.2 Hidrólise enzimática em modo contínuo	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Seleção das enzimas com potencial hidrolítico	51

4.2 Determinação das condições de formação de emulsão estáve
transparente5
4.3 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom pel
lipase de pâncreas suíno5
4.4 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom pel
enzima Lipozyme TL IM5
4.5 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom ser
formação de emulsão prévia por sistema de batelada e batelada
alimentada6
4.6 Teste de hidrólise de óleo de soja em reator contínuo 6
4.7 Considerações Finais 6
5 CONCLUSÕES 6
5.1 Sugestões para trabalhos futuros6
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS7

#### 1 Introdução

A hidrólise de triacilgliceróis é a principal reação para produção de ácidos graxos livres que podem, então, ser esterificados, transesterificados ou convertidos em álcoois graxos de alto valor, e o óleo de soja surge com grande potencial para esta transformação por ser o óleo de menor custo e maior produtividade no Brasil.

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. As enzimas, além de serem atrativas e versáteis, catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reações, o que as difere dos catalisadores não enzimáticos. A grande vantagem das enzimas é que elas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, devido a sua especificidade. Além disso, os catalisadores químicos em geral necessitam de condições tão severas que produzem óleos de menor qualidade, necessitando de reprocessamento para clareamento e remoção de subprodutos (CASTRO et al., 2004).

A crescente preocupação com o meio ambiente, com a qualidade dos produtos e com o custo energético torna o uso de biocatalisadores atraente a vários setores industriais que buscam tecnologias "limpas", mais sofisticadas e com menores custos. Atualmente, as lipases têm apresentado grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de mono e diacilgliceróis, ácidos graxos, agentes biotensoativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou modificados (TREICHEL et al., 2010).

A hidrólise enzimática é uma alternativa aos métodos convencionais e vem sendo empregada com sucesso em sistemas livres de solvente. Nestes sistemas biocatalisados, as reações ocorrem na interface entre as fases aquosa e oleosa.

Um sistema livre de solvente, que é uma simples mistura de reagentes, pode oferecer mais segurança, aumento das concentrações dos reagentes, redução dos riscos ambientais e permite a recuperação dos produtos sem etapas de purificação mais complexas (HUANG et al., 2010).

O emprego de ultrassom é um método reconhecidamente eficaz para a redução de tamanho de partículas em dispersões e emulsões. Esta técnica pode gerar partículas nanoscópicas em suspensões, dispersões e emulsões e, além disso, acelerar reações químicas e bioquímicas através da maior facilidade da mistura dos reagentes e aumento nas taxas de difusão, entre muitas outras (KULDILOKE, 2002). A energia necessária para produzir uma emulsão por ultrassom é menor do que a necessária nos métodos convencionais; as emulsões geradas por ultrassom podem ser mais estáveis, requerem mínimas quantidades de surfactantes e, em muitos casos, a presença de surfactantes é desnecessária; apresentam um tamanho microscópico e uma distribuição de tamanho extremamente estreita.

A irradiação por ultrassom pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional.

Com base nos aspectos expostos acima e levando-se em consideração a importância do estudo desta nova tecnologia e a investigação do comportamento enzimático sob ação de ultrassom, o objetivo principal deste trabalho é investigar a hidrólise de óleo de soja por lipases comerciais em sistema de ultrassom.

#### 1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar a produção enzimática de ácidos graxos livres, a partir de óleo de soja, em sistema livre de solventes orgânicos, em banho de ultrassom.

#### 1.1.1 Objetivos específicos

Com base no objetivo geral, os objetivos específicos foram assim delineados:

- Realizar um screening de lipases comerciais com atividade de hidrólise visando posterior emprego na reação de hidrólise de óleo de soja;
- Aplicar a(s) enzima(s) que apresentar(em) potencial atividade de hidrólise para a produção de ácidos graxos livres a partir de óleo de soja em sistema livre de solvente;
- Investigar o emprego do ultrassom no processo de formação da emulsão de água em óleo e sua influência nas reações de hidrólise enzimática;
- Avaliar o efeito de parâmetros de processo (razão molar óleo:água, concentração de enzima, temperatura, agitação e potência do ultrassom), na reação de hidrólise utilizando as lipases comerciais selecionadas anteriormente;
- Avaliar a cinética da hidrólise de óleo de soja em sistema de ultrassom com as enzimas selecionadas nas condições mais adequadas de processo, em batelada e batelada alimentada.
- Realizar um estudo, de caráter exploratório, da hidrólise de óleo de soja em sistema contínuo, na melhor condição experimental encontrada para os modos batelada e batelada alimentada.

O presente capítulo tem por objetivo apresentar, de forma sucinta, a fundamentação teórica necessária ao desenvolvimento deste trabalho, incluindo tópicos sobre enzimas, mais especificamente lipases; tecnologias empregadas e produtos resultantes da modificação de óleos e gorduras; hidrólise enzimática de óleos vegetais; emulsões; aplicação da tecnologia de ultrassom. A leitura do estado da arte mostrou a existência de poucos trabalhos na literatura versando sobre o emprego de lipases na hidrólise de óleo de soja em sistema de ultrassom para a produção de ácidos graxos livres.

# 2.1 Óleos e gorduras

O Brasil destaca-se mundialmente por ser um dos maiores produtores de alimentos. Apresenta uma agricultura avançada tecnologicamente, dispondo de vastas faixas de terras agriculturáveis, o que o eleva a uma posição de destaque na produção de grãos, principalmente os oleaginosos. Esta disposição de grãos faz com que grupos de pesquisadores e indústrias invistam em pesquisas, especialmente no que se refere à melhoria genética das sementes, visando produtividade e qualidade do grão obtido, bem como no desenvolvimento de tecnologias para melhoria ou desenvolvimento de novos processos, obtendo produtos de qualidade e maior valor agregado (TRES, 2012).

Cerca de três quartos da produção mundial de óleos e gorduras são destinados ao consumo humano e animal, sendo o restante usado em diversas aplicações industriais. Nos últimos anos tem surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando à utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso

potencial na indústria farmacêutica, de alimentos, oleoquímica, entre outras (CASTRO et al., 2004).

Em geral óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água) que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem vegetal, animal ou microbiana (CARVALHO et al., 2003). Os lipídeos são uma classe abundante na natureza e são constituídos predominantemente por ésteres de ácidos graxos e glicerol (ZILLER, 1996; VOLL, 2011).

O uso do termo "óleo" ou "gordura" é geralmente baseado no estado físico à temperatura ambiente, sendo que, por definição, gorduras são sólidas ou pastosas e os óleos, líquidos (AWADALLAK, 2012). Gorduras animais são saturadas e, em sua maioria, sólidas à temperatura ambiente, como a manteiga, a banha e o sebo. Óleos vegetais, por sua vez, tendem a ser líquidos e predominantemente insaturados, como os óleos de soja, oliva, milho, etc.. Esses óleos podem ter a elevação do ponto de fusão através do processo de hidrogenação (BABICZ, 2009).

Mais de 95% (em massa) dos óleos e gorduras são constituídos de triacilgliceróis. A fração restante é composta por monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres, proteínas, esteróis, vitaminas e tocoferóis (HIDALGO e ZAMORA, 2003).

Os triacilgliceróis (TAG) são acilgliceróis compostos por três moléculas de ácido graxo substituídas na hidroxila de um glicerol através da ligação éster. Eles representam a principal forma de armazenamento de energia em plantas (nas sementes) e nos animais (no tecido adiposo) (KOLAKOWSKA e SIKORSKI, 2002), pois são altamente eficientes no armazenamento de energia metabólica, uma vez que são menos oxidativos que ácidos e proteínas e praticamente não absorvem água (MATOS, 2010).

Os diacilgliceróis (DAG) são ésteres de glicerol que possuem dois grupos hidroxila esterificados por ácidos graxos, podendo existir em duas formas estequiométricas, 1,2(2,3)-DAG e 1,3-DAG (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000). O DAG está naturalmente presente em óleos e gorduras, mas em níveis bem inferiores aos de TAG.

Atualmente, os DAG são amplamente empregados como emulsificante e estabilizante em decorrência de seu caráter anfifílico. Como sua estrutura é semelhante à estrutura dos TAG, suas propriedades em relação ao cozimento de alimentos, ou mesmo no caso de frituras, são similares (WATANABE et al., 2001).

Os monoacilgliceróis (MAG) são compostos por apenas uma molécula de ácido graxo substituída na hidroxila de um glicerol via ligação éster. Os MAG podem ser encontrados em duas formas isoméricas, 1(3)-MAG e 2-MAG (MATOS, 2009). MAG são amplamente empregados nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica como promotores de emulsões (TUTER e AKSOY, 2000).

A Figura 1 esquematiza a estrutura básica dos acilgliceróis.

Figura 1: Estrutura básica dos acilgliceróis.

# 2.2 Ácidos graxos livres

Os ácidos graxos podem ser encontrados na natureza nas formas não associada (conhecidos como ácidos graxos livres) ou associados, formando outras classes de compostos químicos como fosfatídeos e glicerídeos (BABICZ, 2009).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias entre 4 e 36 carbonos (BOBBIO e BOBBIO, 1992). Os ácidos graxos diferem pelo número total de átomos de carbono na cadeia e também pela presença de insaturações (duplas ligações entre os átomos de carbono) em sua cadeia hidrofóbica. Os ácidos graxos que contêm apenas ligação simples entre carbonos são denominados ácidos graxos saturados. Os que possuem dupla ligação entre carbonos são chamados de ácidos graxos insaturados, sendo que os que apresentam mais de uma ligação dupla são conhecidos como poliinsaturados. Ácidos graxos insaturados e poliinsaturados podem diferir entre si pela posição da dupla ligação ao longo da cadeia carbônica. Estas duplas ainda podem gerar isômeros cis ou trans. Cabe destacar que na natureza dificilmente são encontrados ácidos graxos ou seus derivados em isomeria trans. Estes compostos largamente reconhecidos como prejudiciais à saúde são produzidos durante o processamento dos óleos como na hidrogenação de poliinsaturados para a fabricação de margarinas, ou durante o seu aquecimento, como no caso de frituras (KOLAKOWSKA e SIKORSKI, 2002).

Costuma-se nomear os ácidos graxos pelo comprimento da cadeia e o número de duplas ligações separadas por dois pontos. Dessa forma, um ácido graxo saturado com 16 carbonos é abreviado para 16:0; o ácido oleico, com 18 carbonos e uma dupla ligação entre o primeiro e o segundo carbono da cadeia é abreviado para 18:1 (BOBBIO e BOBBIO, 1992). A Tabela 1 apresenta os principais ácidos graxos encontrados na natureza.

Os ácidos graxos livres podem ser convertidos em uma série de produtos de alto valor agregado. A produção industrial de MAG e DAG pode ocorrer através da esterificação parcial do glicerol com ácidos graxos livres (WATANABE et al., 2005; FREGOLENTE et al., 2009; WANG et al., 2011).

Tabela 1: Principais ácidos graxos conhecidos na natureza.

CIDO GRAXO	NOME SISTEMÁTICO	SÍMBOLO	FÓRMULA
Butírico	Butanóico	C4 ou C4:0	$C_4H_8O_2$
Capróico	Hexanóico	C6 ou C6:0	$C_6H_{12}O_2$
Caprílico	Octanóico	C8 ou C8:0	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
Cáprico	Decanóico	C10 ou C10:0	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
Otusílico	cis-4-decenóico	C10:1(n4)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
Caproleico	cis-9-decenóico	C10:2(n9)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>
Láurico	Dodecanóico	C12 ou C12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Lauroleico	cis-5-lauroleico	C12:1(n5)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
Lindérico	cis-4-dodecenóico	C12:1(n4)	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	Tetradecanóico	C14 ou C14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Miristoleico	cis-9-tetradecenóico	C14:1(n9)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Tsuzuico	cis-4-tetradecenóico	C14:1(n4)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	Hexadecanóico	C16 ou C16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Palmitoleico	cis-9-hexadecenóico	C16:1(n9)	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Esteárico	Octadecanóico	C18 ou C18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Petroselínico	cis-6-octadecenóico	C18:1(n6)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Oleico	cis-9-octadecenóico	C18:1(n9)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Eládico	trans-9-octadecenóico	C18:1(tn9)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Vacênico	cis-11-octadecenóico	C18:1(n11)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Linoleico	cis,cis 9- 12- octadecenóico	C18:2(n9,12)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Linolênico	cis,cis,cis 9- 12- 15- octadecenóico	C18:3(n9,12,15)	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
	12-hidroxi- <i>cis</i> -9-	C18:1(n9)	
Ricinoleico	octadecenóico	OH(n12)	$C_{18}H_{34}O_3$
Araquídico	Eicosanóico	C20 ou C20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Gadoleico	cis-9-eicosenóico	C20:1(n9)	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>
Gadóico	cis-11-eicosenóico	C20:1(n11)	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>
Gadoleo	cis,cis,cis,cis 6- 9- 12-15-	020.1(1111)	0201 13802
Araquidônico	eicostetraenóico	C20:4(n6,9,12,15)	$C_{20}H_{32}O_2$
Behênico	Docosanóico	C22 ou C22:0	$C_{22}H_{44}O_2$
Cetoleico	cis-11-docosenóico	C22:1(n11)	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
Erúcico	cis-13-docosenóico	C22:1(n13)	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
Lignocérico	Tetracosanóico	C24 ou C24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
Nervônico	cis-15-tetracosenóico	C24:1(n15)	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>

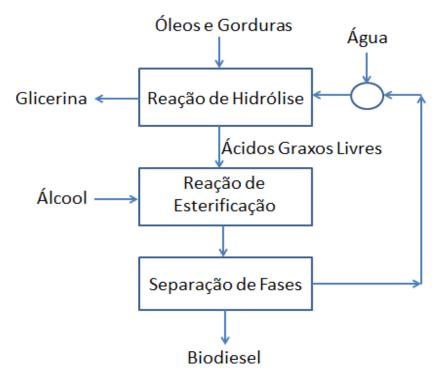
Fonte: Adaptado de BABICZ (2009).

Podem também ser produzidos ésteres de ácidos graxos e açúcares, que apresentam larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além de seu efeito conservante, ésteres de carboidratos e ácidos graxos têm sido associados como agentes anti-tumor e inibidores do crescimento de plantas. O processo é baseado na esterificação de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e sorbitol) com ácidos graxos (esteárico, oleico e linoleico) utilizando lipases de diferentes fontes (CASTRO et al., 2004).

Os ácidos graxos podem ser também, esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o metil ou etil-éster (biodiesel) com elevada pureza (GOMES, 2009).

A hidro-esterificação é uma interessante alternativa para produção de biodiesel e consiste em duas etapas: a primeira é a hidrólise do triglicerídeo, produzindo ácido graxo e glicerina. Já na segunda etapa ocorre a esterificação dos ácidos graxos produzidos na etapa anterior, gerando o biodiesel de elevada pureza e como subproduto a água, que é reutilizada no processo de hidrólise (SILVA et al, 2011). Este processo consiste em uma alternativa aos processos convencionais de produção de biodiesel, pois favorece a utilização de matérias-primas de qualquer teor de ácidos graxos e umidade, uma vez que todos os triglicerídeos presentes no óleo serão transformados por hidrólise (DARIO, 2006). Como cerca de 80% do custo de produção do biodiesel é proveniente do custo da matéria-prima, a hidro-esterificação permite um significativo salto na viabilidade da produção de biodiesel (ARANDA, 2005). Além disso, a glicerina obtida é mais pura que a advinda do processo de transesterificação, pois não apresenta resíduo de catalisador (GOMES, 2009). A esterificação gera, então, o biodiesel e como subproduto a água, que pode ser reutilizada no processo de hidrólise, fechando o ciclo (Figura 2).

Figura 2: Diagrama esquemático contendo as etapas gerais do processo de hidro-esterificação.



# 2.3 Óleo de Soja

O óleo de soja é extraído da semente de soja (*Glycine hispida*) e é utilizado como fonte de alimento e como matéria-prima para a produção de biodiesel. A Tabela 2 mostra a composição (% mássica) de acilgliceróis de diversos óleos. A Tabela 3 apresenta a composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Segundo PIGHINELLI et al. (2008) há três métodos para extração de óleos: prensa hidráulica por batelada, prensa mecânica contínua (expeller) e extração por meio de solventes. Além disso, há a possibilidade de combinação dos métodos. O óleo extraído pode conter diversas impurezas, como gomas, ceras e materiais sólidos, os quais podem prejudicar sua qualidade e estabilidade. A maior parte das matérias primas passa por um processo químico de neutralização chamado de refino alcalino. Este processo é bastante

simples (BATISTA et al., 1999) mas apresenta a desvantagem de gerar perda de uma parte do óleo neutro e de vitaminas (PEIXOTO et al., 2005).

**Tabela 2:** Conteúdo de acilgliceróis (g/100g) em óleos comestíveis de várias origens.

_	DAG					
Óleo	TAG	Total	1,2-DAG	1,3-DAG	MAG	Outros
Soja	97,9	1,0	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	0	1,1
Palma	93,1	5,8	$ND^1$	$ND^1$	$LD^2$	1,1
Algodão	87,0	9,5	$ND^1$	$ND^1$	0,2	3,3
Milho	95,8	2,8	1,5	2,9	$LD^2$	1,4
Açafrão	96,0	2,1	1,2	2,7	$LD^2$	1,9
Oliva	93,3	5,5	$ND^1$	$ND^1$	0,2	2,3
Canola	97,1	2,9	1,0	1,9	$LD^2$	$ND^1$
Gergelim	95,2	4,1	1,2	2,9	0,8	$ND^1$
Arroz	92,4	7,6	2,4	5,2	$LD^2$	$ND^1$
Uva	94,2	5,8	2,1	3,7	$LD^2$	$ND^1$
DAG comercial	17,3	81,4	28,4	53,0	1,2	ND <sup>1</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Não detectado

Fonte: Adaptado de BABICZ (2009).

**Tabela 3:** Composição de ácidos graxos no óleo de soja segundo a RDC 482 da ANVISA.

Ácido graxo	Estrutura	Valor de referência (%)
-	C<14	< 0,1
Ácido Mirístico	C14:0	< 0,5
Ácido Palmítico	C16:0	7,0 - 14,0
Ácido Palmitoleico	C16:1	< 0,5
Ácido Esteárico	C18:0	1,4 - 5,5
Ácido Oleico (Ômega 9)	C18:1	19,0 - 30,0
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C18:2	44,0 - 62,0

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Abaixo do limite de detecção

Ácido Linolênico (Ômega 3)	C18:3	4,0 - 11,0
Ácido Araquídico	C20:0	< 1,0
Ácido Eicosenoico	C20:1	< 1,0
Ácido Behênico	C22:0	< 0,5

Valores de Referência: RDC Nº482, de 23/09/1999, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA.

Um estudo realizado em 2007 pelo Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais - DESER - apresentou um panorama bastante interessante em relação à produção e consumo de óleos vegetais no Brasil e no mundo. Na Tabela 4 é apresentado o consumo mundial de óleos vegetais segundo os usos industrial e alimentar, nos anos de 2006/2007.

**Tabela 4:** Consumo mundial de óleos vegetais segundo os usos (industrial e alimentar, em mil toneladas, para a safra 2006/2007).

Óleo	Alimentar	Industrial	Total
Palma	27 531	8 788	36 319
Soja	33 153	2 488	35 641
Girassol	9 821	512	10 333
Amendoim	4 932	24	4 956
Colza/Canola	12 920	4 917	4 917
Algodão	4 474	208	4 682
Palmiste	1 195	3 015	4 210
Coco	1 791	1 374	3 165
Oliva	2 871	53	2 924
Total	85 768	21 379	107 147

Fonte: USDA (2007). Adaptado de DESER.

No ano-safra 2006/07, de acordo com estimativas do USDA, foram consumidas 107 milhões de toneladas de óleos vegetais, sendo 85,77 milhões de toneladas para fins alimentares e 21,38 milhões para fins industriais. Verifica-se, portanto, que, apesar do aumento do uso industrial, em termos de volumes e do número de processos industriais em que é aplicado, é na alimentação que a maior parte (80%) dos óleos vegetais é consumida. No

entanto, esse quadro poderá ser alterado com o estímulo à diversificação da matriz energética, através da produção de biodiesel, por exemplo.

Na safra 2006/2007 foram produzidas 5,93 milhões de toneladas de óleo no Brasil. O volume produzido vem se elevando ao longo dos anos, puxado principalmente pela soja, cuja produção foi de 5,45 milhões de toneladas nesta safra.

No que se refere aos usos dos óleos vegetais consumidos no Brasil, verificou-se que mais de 84% são utilizados para fins alimentícios e aproximadamente 16% para outros fins industriais. Das 3,92 milhões de toneladas consumidas na safra 2006/2007, 3,32 milhões foram utilizadas para fins alimentares e 598 mil toneladas para fins industriais. O óleo de soja é o mais consumido nos dois tipos de uso, alimentar e industrial, conforme se verifica através da Tabela 5.

**Tabela 5:** Consumo total de óleos vegetais no Brasil e segundo o uso (alimentar e industrial) em 2006/07 (mil toneladas).

Óleo	Alimentar	Industrial	Total
Soja	3 021	270	3 291
Algodão	171	84	255
Palma	39	165	204
Palmiste		79	79
Girassol	52	0	52
Oliva	32	0	32
Amendoim	11	0	11
Total	3 326	598	3 924

Fonte: USDA (2007). Adaptado de DESER.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE, 2012), a produção nacional de óleo de soja entre fevereiro de 2010 e outubro de 2011 foi de 4,5 milhões de toneladas. Do total produzido, 1,2 milhões de toneladas foram exportados e 3,2 milhões foram destinados ao consumo interno.

Ocorreu, nos últimos anos, um significativo deslocamento no consumo mundial de matérias graxas animais em favor dos óleos vegetais, em decorrência de fatores ligados à saúde, custos de produção, desenvolvimento industrial e versatilidade desse tipo de matéria-prima. O óleo de soja, em virtude do menor preço e da alta disponibilidade no mercado interno, é o óleo mais consumido e mais empregado industrialmente no Brasil (NUNES, 2007).

#### 2.4 Enzimas

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas. Pode-se definir a grande maioria das enzimas como sendo proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. São catalisadores biológicos que diminuem a energia de ativação, acelerando termodinamicamente uma reação possível, sem alterar a constante de equilíbrio e a energia livre de reação (ERGINER et al., 2000; GÜRSEL et al., 2003; ISIK et al., 2003).

A aplicação industrial destes biocatalisadores tem sido impulsionada com o aumento da preocupação com as questões ambientais, com a qualidade do produto e com a redução dos gastos em setores industriais (SCHERER, 2010). Os benefícios oferecidos pelas enzimas são a especificidade (controle dos produtos formados e minimização de reações laterais indesejadas), as condições amenas (a planta industrial pode ser operada com menor capital e custos energéticos, sob condições suaves de temperatura e pH) e a menor produção de resíduos (menor custo no tratamento de resíduos e contribuição desprezível da enzima para a DBO) (HASAN et al., 2006).

Cerca de 4000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são utilizadas comercialmente (SHARMA et al., 2001). Desta forma, a pesquisa em catalisadores biológicos tornou possível o uso de enzimas com maiores aplicabilidades e adaptadas às diferentes condições de processo, permitindo seu uso expansivo em diversos setores industriais, entre eles: indústria

farmacêutica, produtos agroquímicos, oleoquímica, indústria de alimentos, detergentes, entre outras. O resultado é a possibilidade de uma indústria altamente diversificada na aplicação destes biocatalisadores, que ainda encontra-se em expansão, tanto em tamanho quanto em complexidade (KIRK et al., 2002).

A maioria das enzimas industriais é de origem microbiana (SHARMA et al., 2001). As enzimas microbianas são normalmente mais úteis que as enzimas derivadas de plantas e animais, devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, aos altos rendimentos possíveis, à facilidade de manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios de baixo custo. As enzimas microbianas são também mais estáveis e sua produção é mais conveniente e segura (HASAN et al., 2006).

As enzimas como proteínas biologicamente ativas são responsáveis pela catálise de diversas reações. Em uma proteína enzimática, existe certo domínio chamado de "sítio ativo" que se liga ao substrato – a molécula reagente – e diminui a energia do estado de transição que leva ao produto desejado. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu "encaixe" com a proteína. Esta relação tem sido chamada de "chavefechadura". Como catalisadores biológicos, as enzimas estão sujeitas às mesmas leis termodinâmicas e cinéticas dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação, porém não a reação final de equilíbrio entre o substrato e o produto (PRIMO et al., 2007).

A conformação e a estabilidade da estrutura molecular das enzimas são asseguradas por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de Van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, entre outros, afetam a estrutura da enzima e, em decorrência, suas propriedades (LIMA et al., 2001).

Segundo Scriban (1985), a atividade das enzimas é função direta da sua estrutura terciária e quaternária. As propriedades da enzima podem ser modificadas por tratamentos (aquecimento, variação de pH e alterações de pressão) que resultam num impedimento ou dificuldade de fixação do substrato na enzima, ou o aumento na sua atividade catalítica. A variação da atividade em função da temperatura é determinada em condições ótimas de operação e resulta de dois efeitos antagônicos: a colisão entre o substrato e a enzima causada pela agitação das moléculas devido ao aumento da temperatura, e a desnaturação da proteína que vai ocasionar uma mudança da estrutura terciária e quaternária da proteína globular, fazendo com que a enzima passe de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. No entanto a desnaturação das enzimas pelo calor só ocorrerá dependendo da duração e da intensidade do tratamento térmico.

É muito comum expressar a carga de enzima no meio reacional em função de sua atividade. Segundo a Enzyme Commission, "uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol de substrato ou a formação de 1 µmol de produto, por minuto, nas condições estabelecidas no ensaio (temperatuta, pH, concentração de substrato)".

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, que podem ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas destes fatores. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000, DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe

uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio da reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio (GIRELLI e MATTEI, 2005).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica. A seleção da técnica e suporte empregados depende da aplicação que o biocatalisador se destina. Apesar de ser objeto de estudo de pesquisas científicas há bastante tempo, a imobilização de enzimas ainda demanda investigações adicionais sobre os efeitos exercidos pelas diferentes técnicas de imobilização sobre a estrutura destas enzimas, e sobre o emprego de novos materiais como suportes (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O uso de enzimas imobilizadas pode contribuir para a viabilidade de processos enzimáticos, pois torna a enzima reaproveitável e proporciona sua separação do meio reacional por processos simples como a filtração, o que acarreta economia significativa no custo global do processo desde que, o procedimento de imobilização não seja dispendioso, haja boa recuperação da atividade enzimática e que a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa (AWADALLAK, 2012).

#### 2.5 Lipases

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores

em processos industriais. Entre os processos de maior interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerer a presença de cofatores; iii) possuir uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibir uma alta enantiosseletividade. O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO et al., 2004).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) pertencem a um grupo especial de esterases, classificadas como hidrolases, e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Atuam sobre substratos pouco solúveis em água, em interfaces de água/lipídio, hidrolisando, principalmente, acilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) (CÔTÉ e SHARECK, 2008).

As lipases têm a capacidade de catalisar tanto reações de hidrólise de acilgliceróis, quanto atuar na síntese de ésteres a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas (VILLENEUVE et al., 2000). O deslocamento do equilíbrio na reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) é controlado pela quantidade de água presente na mistura do meio reacional. Estas reações se processam com alta regio e/ou enantio-seletividade, classificando as lipases como um grupo importante de catalisadores biológicos (OLIVEIRA et al., 2000). Uma combinação destes dois processos básicos em sequências lógicas pode resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação a depender dos reagentes de partida) (CASTRO et al., 2004).

**Figura 3:** Esquema geral das reações de esterificação e hidrólise. Fonte: CASTRO et al. (2004).

As lipases normalmente são encontradas em tecidos de animais (pâncreas, fígado e mucosa gástrica) e vegetais (sementes, polpas e raízes), podendo também ser produzidas por micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras). Do ponto de vista econômico e industrial as lipases produzidas por micro-organismos apresentam vantagens em relação às obtidas a partir de fontes animais e vegetais, devido à sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las. Além disso, lipases de animais e plantas apresentam alto custo de isolamento (CASTRO et al., 1995). Segundo Soares (2000), os micro-organismos mais utilizados para a produção de enzimas lipolíticas são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, e leveduras do gênero *Candida*.

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40 °C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE e HAMMOND, 1985). Apresentam massa molecular entre 20 e 60 kDa (CARVALHO et al., 2003). Usualmente são ativas em uma ampla faixa de pH, apresentando alta atividade na faixa de pH 5 a 9, com um máximo situado entre 6 e 8 e não requerem cofator (GHANEM e ABOUL-ENEIN, 2005).

As lipases também podem apresentar como características a especificidade ou seletividade em relação a um substrato (quimio), à posição (regio) e a isômeros (estéreo). A quimioespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentada por uma mesma lipase em relação a substratos variados. As lipases podem apresentar especificidade por tri, di e monoacilgliceróis e outros ésteres de ácido graxo, formados pela mesma molécula de ácido carboxílico, também podem diferenciar moléculas de ácido graxo de diferentes tamanhos de cadeia, de diferentes níveis e posição

de instauração, entre outros (PINHEIRO, 1992). A regioespecificidade se refere às diferentes atividades enzimáticas apresentadas pela mesma lipase sobre as distintas posições do ácido graxo no triacilglicerol (VILLENEUVE, 2003). Por outro lado, a estereoespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentadas por uma mesma lipase sobre distintos isômeros de uma molécula (PINHEIRO, 1992).

As lipases podem catalisar uma ampla variedade de reações, incluindo hidrólise, interesterificação, alcoólise, acidólise, esterificação e aminólise (DALLA-VECCHIA, 2004). A Figura 4 apresenta um esquema das reações catalisadas por lipases.

**Figura 4:** Reações catalisadas por lipases. Fonte: PAQUES e MACEDO (2006).

Hidrólise

R
OR
$$^1$$
 + H<sub>2</sub>O
R
OH + R<sup>1</sup>OH

Esterificação

OH + R<sup>1</sup>OH

R
OR
 $^1$  + H<sub>2</sub>O

Interesterificação

OR
 $^3$  + R<sup>2</sup>OR
OR
 $^1$  + R<sup>2</sup>OH

Acidólise

OR
 $^1$  + R<sup>2</sup>OH

Acidólise

OR
 $^1$  + R<sup>2</sup>OH

Aminólise

OR
 $^1$  + R<sup>2</sup>NH<sub>2</sub>
OR
 $^1$  + R<sup>1</sup>OH

Devido à sua alta especificidade, as lipases são importantes na área de biotecnologia, principalmente nos setores oleoquímico e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiosseletivos. Estas enzimas são uma categoria que apresentam muitas vantagens em processos de biotransformações, em função de sua grande afinidade por um largo espectro

de substratos, versatilidade quanto às características do meio reacional (aquoso, orgânico ou supercrítico), atividade elevada em meio reacional livre de solventes e disponibilidade comercial (PANDEY et al., 1999). As enzimas lipolíticas estão atualmente atraindo uma grande atenção devido às suas potencialidades biotecnológicas, pois constituem o mais importante grupo de biocatalisadores para aplicações neste campo (HASAN et al., 2006).

A utilização de enzimas lipolíticas pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas, com reatores a temperaturas superiores a 70 °C por longos períodos de tempo (HASAN et al., 2006).

As áreas nas quais a aplicação das lipases vem tendo maior destaque são (LEAL et al., 2002; BARON, 2003; BEVILAQUA, 2005; KADER et al., 2007):

- Farmacêutica: Síntese de intermediários de fármacos (ex.: ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo).
- Alimentos: Síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex.: aspartame).
- Detergentes: Remoção de manchas de gorduras dos tecidos.
- Agroquímica: Síntese de inseticidas e pesticidas.
- Tratamento de efluentes: Redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios.
- Oleoquímica: Hidrólise e interesterificação regiosseletiva de óleos e gorduras.

A aplicação alternativa de lipase para a síntese de produtos puros, modificação de óleos e gorduras e a modificação de carboidratos tem sido bem documentada na literatura (BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 1999).

Atualmente o maior empecilho ao uso de enzimas lipolíticas em processos industriais está relacionado ao alto custo deste catalisador, entretanto os recentes avanços na tecnologia de engenharia genética e de

modificação, e imobilização de enzimas lipolíticas têm grande possibilidade de mudar este quadro num futuro próximo (SAXENA et al., 2003).

#### 2.5.1 Mecanismo de catálise das lipases

Em geral, a maior atividade catalítica de lipases ocorre na interface água/lipídeo, através do fenômeno chamado de ativação interfacial e tanto a qualidade quanto a área interfacial têm papel importante na atividade catalítica dessas enzimas (WAKABAYASHI, 2004 e BALCÃO et al., 1996).

O fenômeno da ativação interfacial foi proposto por Sarda e Desnuelle (1958) após verificar diferença no comportamento das cinéticas entre enzimas. Os autores verificaram que a atividade de esterases era função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis e Menten, no qual a velocidade máxima ocorria antes do limite de solubilidade do substrato ser atingido e da formação de agregados e/ou interfaces. Já a atividade das lipases, se caracterizou por manter-se constante até que a concentração micelar crítica (CMC) do substrato no sistema fosse alcançada, e aumentando a partir desse ponto. A este fenômeno de aumento de atividade enzimática quando há formação de interfaces, denominou-se "ativação interfacial" (DALLA-VECCHIA, 2004).

A resolução da estrutura tridimensional de uma lipase por difração de raios-X revelou a presença de uma estrutura α-helicoidal oligopeptídica na superfície da proteína que protege o centro ativo, denominada "tampa". O lado hidrofóbico da hélice é virado para dentro do sítio ativo, que fica então inacessível às moléculas do substrato. Contudo, quando uma lipase se liga em uma interface lipídica, um rearranjo conformacional ocorre, causando o deslocamento da "tampa", enquanto o sítio ativo da lipase fica totalmente acessível para o substrato. Como resultado, o lado hidrofóbico da tampa fica exposto à fase lipídica, aumentando as interações hidrofóbicas entre a enzima e a superfície lipídica. A mecânica de abertura da tampa pode variar entre enzimas, mas em todos os casos conduz à criação de um sítio ativo aberto,

acessível e hidrofóbico para a ligação lipídica. Outras estruturas tridimensionais foram descritas e a presença da tampa corrobora, mas o número e a posição das α-hélices envolvidas na composição da tampa difere entre as lipases. Estudos de cristalografia mostraram, também, que a maior parte das lipases apresenta o sítio recoberto, sugerindo que o estado inativo provavelmente prevalece em solução (JOSEPH et al., 2008; JAEGER e REETZ, 1998; KADEMI et al., 2004; LOTTI e ALBERGHINA, 2007; BON et al., 2008).

As estruturas tridimensionais das lipases conhecidas até hoje mostram que o grau de mobilidade da "tampa" varia fortemente, encontrando-se desde casos em que parece haver dois estados extremos – aberto e fechado – com níveis de energia significativamente inferiores aos dos estados de transição, até casos com tampas muito móveis, com vários estados intermediários de energia comparáveis (BON et al., 2008).

O mecanismo de catálise das lipases, de maneira geral, é descrito pelo mecanismo cinético "Ping Pong - Bi Bi" (BEVILAQUA, 2005), o qual consiste em duas etapas principais: ataque nucleofílico na ligação éster do substrato pelo oxigênio da hidroxila serínica após a abertura da tampa (resultando na formação do complexo enzimático acilado) onde um álcool é liberado deixando um complexo acil-enzima, e um segundo ataque nucleofílico propiciando hidrólise do complexo enzimático acilado, formando um ácido graxo que é liberado e então a enzima volta à forma original (JAEGER, 1999). A Figura 5 apresenta as duas principais etapas da hidrólise catalisada por lipases e os estágios intermediários formados.

- 1) O lipídeo se liga ao sítio catalítico. O oxigênio da serina é ativado pela vizinha histina e promove um ataque nucleofílico ao átomo de carbono do grupo carbonil do substrato.
- 2) É formado o intermediário transiente tetraédrico, que é estabilizado por dois grupos NH de outros peptídeos. A histina doa um próton ao complexo, que forma um álcool que é então liberado.
- 3) Uma molécula de água do meio se aproxima e é ativada pelo resíduo da histina. O íon hidroxil da água ataca o carbono carbonil do intermediário.

4) O resíduo histina doa um próton para o oxigênio do resíduo serina ativo e então a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada formando o ácido graxo livre, que então é liberado e a enzima retorna a sua forma original.

**Figura 5:** Mecanismo catalítico proposto para lipase. O número dos aminoácidos refere-se à lipase oriunda do *Rhizopus oryzae*. Fonte: JAEGER et al. (1999).

# 2.6 Reações de hidrólise catalisadas por lipases

A palavra hidrólise significa decomposição pela água, mas são raros os casos em que sob condições ambientes pode-se realizar uma hidrólise completa. A hidrólise completa de triacilgliceróis conduz a uma mistura de ácidos graxos livres e glicerol. O processo químico mais utilizado é o Colgate-Emery, que opera em temperaturas e pressões elevadas, ocasionando reações

secundárias que exigem posteriores operações de separação e purificação (GUNSTONE, 1999; ROONEY e WEATHERLEY, 2001). Para que a reação seja rápida e completa é sempre indispensável a presença de catalisadores químicos, em geral ácidos ou bases, ou enzimas (ALVAREZ-MACARIE et al., 1999).

A hidrólise parcial tem como intermediários DAG e MAG, que consistem em TAG sem um ou dois ácidos graxos, respectivamente. Diversos fatores definem se a reação será completa ou não, como o tempo de reação e a disponibilidade de reagentes para a conversão completa. A Figura 6 mostra as etapas de reação de hidrólise de um triacilglicerol.

**Figura 6:** Hidrólise sequencial dos grupos acila no glicerídeo, catalisada por lipases. Fonte: CASTRO et al. (2004).

$$H_2C - O - C - R_1$$
 $H_2C - OH$ 
 $H_2C -$ 

Em geral nas reações de hidrólise há um "período de indução" inicial, no qual as taxas de reação são muito baixas em função da baixa miscibilidade dos substratos (MOQUIN e TEMELLI, 2008). Após este período as velocidades de reação crescem e começam a ser formados AGL e DAG e, sequencialmente, MAG. Após certo tempo, dependendo das condições reacionais, o DAG e o MAG podem começar a ser consumidos ou permanecerem em equilíbrio. Excesso de água no meio tende a deslocar o equilíbrio da reação para a formação de AGL.

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas (MERÇON, 1998).

A hidrólise é geralmente conduzida sob pressão da ordem de 4,83 MPa e temperatura em torno de 250 °C, por um período máximo de 2 horas, obtendo-se rendimentos entre 96 a 99%. Os produtos resultantes são ácidos graxos extremamente escuros e uma solução aquosa rica em glicerol, que necessitam ser redestilados para remoção da cor e de subprodutos. Depois da destilação, alguns desses produtos encontram aplicação direta e outros são quimicamente processados, fornecendo uma variedade de outros produtos (CASTRO et al., 2004). Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, consequentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras usando lipases como catalisadores.

Linfield et al. (1984a) estudaram a hidrólise de sebo e óleos de coco e oliva utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. A reação em emulsão foi conduzida em sistemas de frascos agitados, obtendo-se altos valores de conversão de 97 a 99% em 72 horas de reação.

Em outro trabalho, Linfield e seus colaboradores (1984b), utilizando os mesmos óleos e lipase de *Candida rugosa*, abordaram a influência do pH, da temperatura e de aditivos sobre a atividade enzimática, determinando também a quantidade mínima de enzima necessária para se alcançar de 95 a 98% de hidrólise em 72 horas de reação.

Wang et al. (1988) analisaram a hidrólise de óleo de oliva catalisada por lipase de *Candida rugosa* em sistema com emulsão. Os autores estudaram a hidrólise sem nenhum tipo de emulsificante e com emulsificação realizada apenas com agitação mecânica. Foram verificadas taxas de hidrólise de 30-35% em 1 hora.

Fu et al. (1995) estudaram a hidrólise do óleo de oliva, óleo de soja, óleo de palma, óleo de coco e óleos hidrogenados com lipase de *Aspergillus* sp. Todos os substratos analisados puderam ser hidrolisados aos ácidos graxos correspondentes pela enzima, com rendimento de 90 a 99%, em tempo de reação de 2 à 24 horas.

Ghosh e Bhattacharyya (1995) estudaram a hidrólise enzimática de óleos comerciais com alta acidez, como de coco, mostarda, girassol e arroz. Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez foram quase completamente hidrolisados por lipase de *Candida cylindracea* em 48 horas de reação. O óleo de coco, com acidez inicial de 69,2% em ácido laúrico, foi hidrolisado à temperatura de 35 °C por 48 horas, atingindo acidez final de 80%.

Kiatsimkul et al. (2006) estudaram 8 diferentes lipases comerciais na hidrólise de óleo de soja em agitador rotativo e verificaram que a lipase de *C. rugosa* conduziu a um melhor rendimento na reação de hidrólise em 24 horas (25%) seguida da lipase de *A. niger* (13%). Quando foi realizada hidrólise do óleo de soja epoxidado, 45% de conversão foram obtidos pela lipase de *B. cepacia* e 23% pela lipase de *C. rugosa* em 2 horas de reação.

Padilha e Augusto-Ruiz (2007) realizaram hidrólise de óleo de pescado empregando lipase de pâncreas suíno em solução tampão pH 8 e acetato de polivinila como emulsificante. As reações foram realizadas a 38 °C sob agitação magnética e o rendimento em ácidos graxos livres foi de 44% em 1 hora de reação.

Gomes (2009) realizou hidro-esterificação de óleo residual da indústria pesqueira. Na etapa de hidrólise, ácidos graxos livres foram obtidos por duas vias: hidrólise química e hidrólise enzimática. Na hidrólise química o óleo residual de indústria pesqueira (contendo 25% de água em sua composição) foi adicionado ao reator a 300 °C e 500 rpm, por 1 hora. A hidrólise enzimática foi realizada pela enzima de *Penicillium simplicissimum* (produzida pelo autor por fermentação estado sólido), durante 48 horas, a 45 °C. Após 1 hora a 300 °C, a hidrólise química resultou em 93% de conversão em ácidos graxos e após 48 horas a 45 °C, a hidrólise enzimática resultou em 81% de conversão.

Rodrigues e Ayub (2011) estudaram a hidrólise de óleo de soja com mistura de enzimas comerciais de *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100L, imobilizada em Lewatit<sup>®</sup> VP OC 1600) e *R. miehei* (RML, Lipozyme RM IM) em agitador rotativo, a 30 °C por 10 horas. Na condição ótima (razão molar água:óleo 3:1, 25% de enzima sobre a massa de óleo, razão mássica TLL/RML de 65%) foram obtidos 95% de conversão.

A literatura aponta que, em condições de pressão atmosférica e temperaturas mais amenas, a hidrólise enzimática é bastante lenta e, em muitos casos, atinge baixas conversões mesmo em longos tempos de reação. Frente à isso, surge a necessidade de se estudar novas tecnologias para a otimização de reações de hidrólise enzimática de óleos vegetais.

#### 2.7 Ultrassom

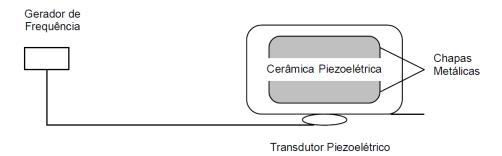
O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezoelétrico e, 14 anos depois, Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação. Entretanto, somente em 1912 quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation And Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (MARTINEZ et al., 2000).

O banho e a sonda de ultrassom são, basicamente, os dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassonoras. A fonte de energia ultrassonora é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, sistema este que constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais e o transdutor

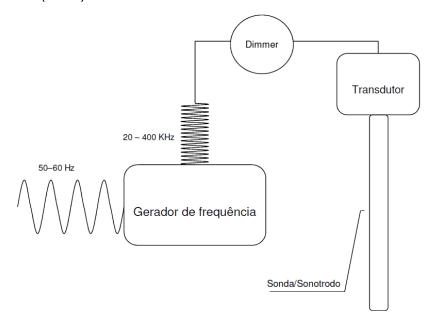
transmite os impulsos ultrassonoros ao meio reacional (BARBOSA e SERRA, 1992).

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassonora é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassonora e, consequentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Na sonda, o transdutor é acoplado na extremidade do equipamento e entra em contato direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (BARBOSA SERRA, 1992). As **Figuras** 7 е 8 apresentam, esquematicamente, um sistema de banho e uma sonda ultrassônicos, respectivamente.

**Figura 7:** Esquema genérico de um banho de ultrassom. Fonte: BABICZ (2009).



**Figura 8:** Esquema genérico de um aparelho de ultrassom de sonda. Fonte: AWADALLAK (2012).



A região do ultrassom pode ser dividida em duas áreas principais: alta potência e baixa potência. As ondas sonoras de alta potência (1-10 MHz) causam permanente mudança física e química porque produzem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. A aplicação das ondas sonoras de alta potência se dá nas áreas da Biologia (homogeneização, rompimento de células), Engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), Geologia (localização do mineral, depósito de óleo), Industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc.), Medicina (esterilização, fisioterapia, inalações), Física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som) e Polímeros (polimerização, despolimerização, degradação do peso molecular) (MARTINEZ et al., 2000).

As ondas sonoras de baixa potência, com frequência maior que 20 KHz, são usadas em campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos. Estas ondas ultrassonoras são empregadas em exames de feto, inspeções de solda, medidas de espessuras. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco. Cabe destacar que a sensibilidade do ouvido humano encontra-se na faixa de 16 Hz a 16 KHz (BARBOSA e SERRA, 1992).

As ondas sonoras dos equipamentos de ultrassom são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como ar, metais, isolantes, água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo (MAIA et al., 2000).

A propagação das ondas ultrassônicas é um fenômeno físico e ocorre por meio de um corpo vibrando que transmite seu movimento às moléculas adjacentes e estas transmitem às outras ao seu redor antes de retornarem à sua posição de equilíbrio. Desta forma, mantendo este movimento, ocorre a criação de ciclos de compressão e expansão (SINISTERRA, 1992).

Quando em meios líquidos, este ciclo gera cavidades que aumentam durante a expansão, pois os gases adsorvidos no líquido e os próximos à

cavidade evaporam promovendo aumento de tamanho. Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode liberando calor e pressão muito elevados em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido. Tal efeito é o conhecido fenômeno de cavitação (KORN et al. 2003).

Na cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis e as transitórias. As primeiras oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido, na fase de descompressão. Elas precisam de vários ciclos de expansão e compressão para atingir o volume crítico e podem tornar-se transitórias, que são as bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo, então, responsáveis pela cavitação (SINISTERRA, 1992).

Existem muitos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999).

Estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada "ponto quente", onde se inicia a implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (LIU et al., 2008).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (LIU et al., 2008).

Quando em sistemas com líquidos imiscíveis, este colapso das microbolhas pode promover uma eficiente agitação, aumentando a velocidade de formação de gotículas microscópicas, aumentando a superfície de contato e as forças coesivas, formando micro-emulsões. Espécies reativas e a indução de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas também podem ocorrer (LIU et al., 2008).

Nos últimos anos têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência. O sistema de ultrassom é considerado uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável (MASON, 2007).

Nas reações químicas o ultrassom de alta potência é o mais usado, pois pode produzir cavitação e/ou formação de microfluxos em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (BOLDYREV, 1995).

A utilização de ultrassom em reações químicas possui algumas vantagens, entre elas: redução do tempo de reação; redução da quantidade de reagentes; aumento de rendimento; seletividade e favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais (MARTINEZ, 2000).

Em um estudo de Chen et al., de 2001 (apud ZHAO et al., 2005) a reação de hidrólise do 4,4-disubstituído-2-fenil-2-oxazolin-5-ina em uma solução alcalina sob sonicação mostrou que a reação pode ser concluída em 15 minutos, enquanto que sem ultrassom, para uma hidrólise similar, são necessárias 24 horas de reação.

Kapturowska et al. (2012) mostraram a eficiência da sonda ultrassônica na ruptura de células de *Yarrowia lipolytica* KKP 379 para liberação de sua lipase intracelular. O ultrassom também vem sendo empregado com sucesso em conjunto com outras técnicas, como a eletrólise, em processos de separação de emulsões óleo em água, na remoção de gordura em tratamento de efluentes (STACK et al., 2005).

A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (BABICZ, 2009).

Entretanto, a temperatura pode agir como o fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas, uma vez que as enzimas podem ser inativadas termicamente. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas (LERIN, 2010).

Fiametti et al. (2011) estudaram a glicerólise enzimática de óleo de oliva para produzir mono e diacilgliceróis, sob a influência de irradiação de ultrassom, num sistema livre de solvente, com e sem a presença de agentes tensoativos, utilizando uma lipase comercial imobilizada (Novozym 435) como catalisador. Os resultados mostram rendimentos muito satisfatórios de MAG e DAG, acima de 50% em peso, em 2 horas de reação a 65 °C.

Liu et al. (2008) estudaram o efeito do ultrassom na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando lipase de *Candida lipolytica*. Os autores relataram que, comparando com a reação conduzida em *shaker*, as taxas de reação aumentaram em 94% para a reação realizada em 1 hora, 64% na reação de 2 horas, 58% na reação de 3 horas, 41% na reação em 4 horas e de 34% na reação de 5 horas. A taxa de reação em 5 horas em banho ultrassônico foi 2,3 vezes maior que a obtida em 12 horas de reação em *shaker*.

Babicz et al. (2010) avaliaram a hidrólise enzimática em banho de ultrassom, utilizando diferentes lipases. Os autores relataram que, com frequência de 47 kHz e potência de 12 W, utilizando 1% de enzima, a produção de diacilgliceróis foi de 40% com Lipozyme TL IM, 41% com Lipozyme RM IM e de 32% utilizando Novozym 435. Os experimentos foram conduzidos em pressão atmosférica, temperatura de 55 °C e taxa de agitação de 700 rpm, por 1 hora e 30 minutos.

Awadallak (2012) verificou desnaturação enzimática quando empregou sonda ultrassônica na hidrólise de óleo de palma por Lipozyme RM IM a 55 °C. Quando expôs a mistura reacional somente 3 minutos à sonda para formação da emulsão como etapa prévia à reação de hidrólise, suas conversões aumentaram cerca de 5 vezes frente à reação de hidrólise assistida pela sonda.

A utilização de ultrassom em reações de hidrólise pode ser uma ferramenta simples e importante no controle de agregação e/ou dispersão de partículas. Em reações enzimáticas o ultrassom é uma boa ferramenta a ser utilizada, podendo perturbar ligações fracas e induzir a mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (BABICZ, 2009).

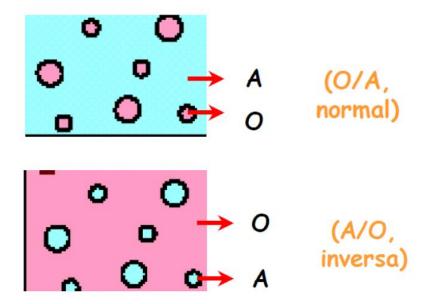
Em vista da escassez de dados na literatura, mostra-se bastante interessante o estudo da influência do sistema de ultrassom na hidrólise enzimática de óleos vegetais.

#### 2.8 Emulsões

Uma emulsão é definida como uma mistura de dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis onde uma das fases encontra-se dispersa na outra sob a forma de gotas de tamanho microscópico ou coloidal (SALAGER, 1999; ROSA, 2003; CHUCHEVAL e CHOW, 2008).

A fase dispersa é conhecida como fase interna ou descontínua da emulsão, e o veículo ou fase circundante é conhecido como fase externa ou contínua. Como a maioria dos sistemas é composto de água e óleo, as emulsões são classificadas em dois tipos, baseado na natureza da fase dispersa (Figura 9): O/A (óleo em água) ou A/O (água em óleo). Nas emulsões O/A, o óleo é a fase dispersa e a água a fase continua, já numa emulsão A/O, a água é a fase dispersa e o óleo a fase continua; e ambas são extensivamente utilizadas em diversas aplicações (CORRÊA, 2005).

Figura 9: Esquema genérico de emulsões O/A e A/O. Fonte: ROSANO (1998).



Uma emulsão estável é aquela que mantém suas gotas dispersas na fase contínua por um período de tempo "razoável", sem que haja separação de suas duas fases. Este tempo pode variar de minutos a anos, dependendo da emulsão em questão. Agentes superficialmente ativos podem ser adicionados a uma emulsão para aumentar sua estabilidade, e são conhecidos como emulsificadores ou agentes emulsificantes (OLIVEIRA, 2010).

Certos fatores influenciam nas características de uma emulsão:

- Propriedades do óleo e da água: a diferença de densidades entre a fase aquosa e oleosa afeta a taxa de separação e, consequentemente, a estabilidade. A viscosidade influencia fortemente a energia requerida para formar as gotas e a velocidade de difusão das gotas na fase externa (BASTIDAS, 2007). Assim a coalescência entre as gotas é afetada, modificando o seu tamanho final. Não somente as propriedades físicas influenciam as características das emulsões, mas também a presença de substâncias tensoativas (emulsificantes).
- Tempo de agitação: O tamanho final das gotas é influenciado pelo tempo de agitação juntamente com a intensidade. Os tamanhos das gotas diminuem com o tempo de agitação, até alcançarem um valor de diâmetro de gotas assintótico (SALAGER, 1993).

- Intensidade de agitação: O aumento da velocidade de agitação causa a diminuição do tamanho de gotas (SALAGER, 1993).
- Fração relativa de fase aquosa e oleosa: também chamada WOR (water-oil-ratio) ou razão de água-óleo. Causa grande influência no tipo de emulsão a ser formada, em conjunto com o tipo de surfactante, pH e temperatura (BASTIDAS, 2007).

A viscosidade da emulsão e sua aparência são controladas em parte pelo tamanho das partículas da fase dispersa e a proporção entre as fases internas e externas (Tabela 6). Quando o tamanho das partículas da fase dispersa diminui, a emulsão muda de um branco leitoso para transparente (micro-emulsão). Se as partículas são maiores do que 1 µm, a emulsão é branco-leitosa e esta impressão visual é devida ao espalhamento de luz, consequência dos diferentes índices de refração do meio dispersado e o dispersante (fase contínua) (LYSSANT, 1974).

**Tabela 6:** Aparência da emulsão como função do tamanho da partícula da fase dispersa.

Camanho da partícula (μm)	Aparência
>1	Branco
0,1-1	Azul-esbranquiçado
0,05 a 0,1	Semi- transparente
<0,05	Transparente

Fonte: Lyssant (1974).

Quando a tensão interfacial obtida é muito pequena, as partículas dispersas também se tornam muito pequenas e temos as micro-emulsões. Sua formação e estabilidade são compreendidas considerando a formação de interfaces com tensão muito baixa, a ponto de se conseguir a estabilidade termodinâmica do sistema bifásico. A formação de muitas partículas pequenas (ao invés de menos partículas, grandes) causa um grande aumento na entropia e, portanto uma redução na energia livre. Este aumento de entropia é mais do que suficiente para compensar o aumento (menor) da energia livre causado

pelo aumento de área, desde que a tensão interfacial seja muito pequena (LYSSANT, 1974).

O termo micro-emulsão foi introduzido por Schulmann (1943) e é definido como sendo uma dispersão transparente, fluida, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis. São opticamente transparentes em decorrência do diminuto tamanho dos microdomínios de água e óleo (10-200 nm) que não espalham luz visível (BAGWE et al., 2001).

Emulsificação é o processo pelo qual um sistema que compreende dois líquidos imiscíveis (geralmente óleo e água), um dos quais é disperso como pequenas gotículas dentro do outro, é produzido (WINDHAB et al., 2005).

O emprego de ultrassom é um método conhecidamente eficaz para a redução de tamanho de partículas em dispersões e emulsões. Estes equipamentos podem gerar partículas nanoscópicas em suspensões, dispersões e emulsões e, além disso, acelerar reações químicas e bioquímicas através da facilitação da mistura dos reagentes e aumento nas taxas de difusão, entre muitas outras (Kuldiloke, 2002).

Quando ocorre a cavitação e há um colapso nas bolhas próximo do limite de fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante pode fornecer uma agitação muito eficiente na mistura das camadas (YACHMENEY et al., 2004; LI et al., 2005).

A formação de emulsões em ultrassom oferece vários benefícios em relação aos métodos convencionais, como o uso de agitação mecânica, moinhos coloidais de alta ou ultra-elevada pressão, homogeneizadores e microfluidizer (BEHREND e SCHUBERT, 2001). Por exemplo, a energia necessária para produzir uma emulsão por ultrassom é menor do que a necessária nos métodos convencionais; emulsões geradas por ultrassom podem ser mais estáveis; requerem mínimas quantidades de surfactantes e, em muitos casos, a presença de surfactantes é desnecessária; têm um tamanho submicron e uma distribuição de tamanho extremamente estreita.

Vários parâmetros afetam o processo de emulsão, incluindo a pressão hidrostática e teor de gás (BERLAN e MASON, 1996), pré-emulsificação (CHOW-MC GARVA, 2004), viscosidade da fase contínua (LI e FOGLER, 1978), razão óleo:água e concentração de surfactante (MUJUMDAR et al., 1997; HODNETT et al., 2004), posição da sonda do ultrassom em relação à interface líquido-líquido, potência do ultrassom e tempo de exposição (MUJUMDAR et al., 1997; CHOW-MC GARVA, 2004).

A emulsificação em ultrassom tem atraído muito interesse em homogeneização do leite (WU et al., 2000; BOSILJKOV et al., 2011), no encapsulamento de aromas (MONGENOT et al., 2000) e na linha de processamento de molhos de tomate, sucos de frutas, maionese e outros produtos alimentícios similares (POVEY e MASON, 1998) . As indústrias de processamento de laticínios têm utilizado a homogeneização em ultrassom como um passo fundamental no processamento de leite, iogurte e sorvete, pois melhora a estabilidade contra o desnate durante o armazenamento.

Abismail et al. (1999) realizaram um estudo comparativo de emulsificação de óleo em água por agitação mecânica e empregando energia de ultrassom (sonda). Com ultrassom, o tamanho da micela (d<sub>32</sub>) foi muito menor do que o obtido por agitação mecânica sob as mesmas condições, o que torna as emulsões em ultrassom mais estáveis. Para o tamanho de micela d<sub>32</sub>, menor quantidade de agente emulsificante foi necessária quando o ultrassom foi empregado.

Para melhorar as taxas de hidrólise de lipídeos, Ramachandran et al. (2006) utilizaram ultrassom, em vez de um agitador mecânico, para a geração de área interfacial. Por ultrassom, maior área interfacial com distribuição muito menor do diâmetro das gotas de óleo pode ser produzida quando comparada com agitação mecânica. Experimentos realizados para avaliar a taxa de hidrólise dos lipídeos mostraram que a mesma foi significativamente aumentada pela emulsificação em ultrassom e a saturação da área interfacial com a enzima não foi observada, devido à grande área interfacial gerada.

Gaikwad e Pandit (2008) estudaram a emulsificação em ultrassom de 4 diferentes óleos (óleo de parafina (leve), óleo de parafina (pesado), óleo de

soja e óleo de amendoim) em água. Eles constataram que o aumento do tempo de irradiação aumenta o volume da fase dispersa enquanto que diminui o tamanho das gotículas da fase dispersa. Com o aumento na potência da irradiação ultrassônica, ocorre um aumento na fração de volume da fase dispersa enquanto que o tamanho das gotas da fase dispersa diminui. O volume parcial da fase dispersa aumenta para o caso do sistema óleo de amendoim-água enquanto que é baixo para o sistema óleo de parafina (pesado)-água. O tamanho das gotas de óleo de soja dispersas em água é pequeno enquanto que para o óleo de parafina (pesado) é grande. Estas variações podem ser explicadas com base nas diferentes propriedades físico-químicas do sistema, ou seja, a viscosidade do óleo e a tensão interfacial.

Huang et al. (2010) realizaram estudos comparativos de hidrólise de óleo de soja catalisada por lipase de *Candida lipolytica* em sistema livre de solvente, em *shaker* e em banho de ultrassom. O ultrassom foi mais eficiente para dispersar o óleo em água do que a agitação em *shaker*. Maior área interfacial e menor tamanho da micela foram obtidos em banho de ultrassom. Em ultrassom, a maior taxa inicial de hidrólise foi obtida com a fração de volume de óleo de 0,7, o que estava de acordo com a maior área interfacial obtida com a fração de volume de óleo de 0,7, quando a energia ultrassônica foi de 1,64 W/cm². O banho de ultrassom foi muito útil para dispersar o óleo de soja em água, obtendo-se uma maior área interfacial, o que causou uma maior taxa inicial de hidrólise do óleo de soja no sistema livre de solvente.

# 2.9 Considerações Finais

A busca por processos alternativos para a obtenção de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e oleoquímica, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, vem despertando grande interesse dos pesquisadores em todo o mundo nos últimos anos. Uma alternativa é a catálise enzimática que apresenta muitas vantagens em relação

à catálise química. Como exposto ao longo deste capítulo, esta catálise pode ser realizada empregando várias tecnologias, dentre elas a utilização de sistema de ultrassom, que até o presente momento pouco é utilizada para a produção de ácidos graxos livres.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo principal investigar a produção enzimática de ácidos graxos livres, a partir de óleo de soja, em sistema livre de solventes orgânicos, em banho de ultrassom, visando verificar o efeito de vários parâmetros na reação de hidrólise (razão molar óleo:água, concentração de enzima, temperatura, agitação e potência do ultrassom), utilizando as lipases comerciais testadas.

#### 3 Material e Métodos

Neste capítulo será apresentada uma descrição dos materiais utilizados e os métodos e equipamentos empregados para realização deste trabalho. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Termodinâmica Aplicada do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

#### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a etapa de determinação da atividade de hidrólise das lipases:

- Goma arábica (Synth);
- Tampão fosfato de sódio (Vetec) pH 7;
- Acetona (95% de pureza, Vetec);
- Etanol (95% de pureza, Vetec);
- Hidróxido de sódio (Vetec);
- Óleo de oliva (Carbonell).

Para as reações de hidrólise em ultrassom, foram utilizados:

- Óleo de soja (BUNGE);
- Água destilada;
- n-hexano (95% de pureza, Vetec).

Para a determinação do teor de ácidos graxos livres das amostras (AGL (*m*/*m*%)) foram utilizados:

Hidróxido de potássio (Vetec);

- Etanol: Éter etílico (1:1 v/v) (95% de pureza, Vetec);
- Fenolftaleína (Nuclear).

Para as análises de Karl Fisher foram utilizados solução de Karl Fisher (Merck), metanol (99% de pureza, Merck), clorofórmio (99% de pureza, Vetec), água destilada.

#### 3.1.2 Enzimas

Foi realizado um *screening* para definição da enzima com melhor atividade hidrolítica dentre as lipases comerciais:

- Novozym 435 Produzida a partir da lipase de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esferoidal, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9 mm, e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (NOVO NORDISK, 1992).
- Lipozyme RM IM Lipase produzida por fermentação submersa de *Rhizomucor miehei* e imobilizada em resina de troca iônica. Apresenta especificidades nas posições 1,3 do triacilglicerol. O tamanho de partícula está entre 0,2 e 0,6 mm e densidade entre 350-450 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVO NORDISK, 1992).
- Lipozyme TL IM Lipase do fungo geneticamente modificado *Thermomyces lanuginosus* (TIL), produzida em fermentação submersa, purificada e imobilizada em sílica. É uma lipase 1,3-específica para triacilgliceróis, isto é, hidrolisa apenas ésteres de ácidos graxos primários, na posição 1,3 do triacilglicerol, 2-monoacilglicerol e 1,2(2,3)-diacilglicerol. Possui tamanho de partícula entre 0,3 e 1,0 mm e densidade média de 400 kg/m³. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 30-70 °C (NOVO NORDISK, 1992).

• Lipase de pâncreas suíno (Porcine) - Lipase Tipo II, em estado bruto, obtida de pâncreas suíno, também conhecida como triacilglicerol acilhidrolase, com aspecto físico na forma de pó liofilizado, na cor amarelo claro, pH ótimo na faixa de 6,5 a 7,5, temperatura de utilização na faixa de 40-70 °C e com característica de hidrossolubilidade moderada (Sigma-Aldrich).

#### 3.2 Metodologias

#### 3.2.1 Determinação da atividade de hidrólise

Para a dosagem da atividade de hidrólise das lipases, utilizou-se uma emulsão de óleo de oliva 10% (m/v) e goma arábica 5% (m/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7, com agitação mecânica. As enzimas imobilizadas foram ativadas previamente a 40 °C em estufa por 1 hora e a enzima livre foi analisada diretamente. Em um Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 20 mL desta emulsão e 0,1 g de enzima/derivado enzimático, agitando-se em agitador orbital (*shaker*) a 150 rpm por 20 minutos a 37 °C e 65 °C. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida extraindo-se os ácidos graxos com adição de 20 mL de uma solução de acetona/etanol (1:1 v/v). Os ácidos foram então titulados com uma solução de NaOH (0,05 mol/L) até pH 11. Os brancos reacionais foram preparados com 20 mL de emulsão e, depois de decorrido o tempo de agitação, foram adicionados 20 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v) e 0,1 g de enzima. Estes também foram titulados com a solução de NaOH (0,05 mol/L) até pH 11 (PINHEIRO, 2006).

Uma unidade de atividade de hidrólise (U<sub>H</sub>) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima, que pode ser determinada através da Equação 1 (LEAL, 2000).

$$\mathbf{A_{H}} = \frac{(\mathbf{V_a} - \mathbf{V_b}) \times \mathbf{M}}{\mathbf{t} \times \mathbf{E}}$$
 Equação (1)

Onde: A<sub>H</sub> é a atividade hidrolítica (U/g);

 $V_a$  e  $V_b$  correspondem ao volume de solução de NaOH (L) gasto na titulação da amostra e do branco, respectivamente;

M é a molaridade da solução de NaOH (mol/L);

E é a massa de enzima/derivado enzimático (g);

t é o tempo de reação (min).

# 3.2.2 Quantificação dos Ácidos Graxos Livres

A determinação dos ácidos graxos livres nas amostras foi realizada por titulação com KOH, segundo método IUPAC 2.201. Aproximadamente 3 gramas de óleo e 3 gotas de solução de fenolftaleína foram diluídas em 50 mL de uma solução etanol:éter 1:1 (v/v). Esta solução foi titulada com uma solução de KOH 0,1M, sob agitação vigorosa até mudança súbita de coloração branca para rosa. O teor de AGL do óleo foi calculado de acordo com a Equação (2):

Teor AGL(m/m, %) = 
$$\frac{V \times M_{KOH} \times PM_{TAG}}{10 \times m_a}$$
 Equação (2)

Onde: **AGL** (*m/m*,%) é o teor de ácidos graxos livres em porcentagem mássica;

V é o volume da solução de KOH utilizado na titulação (mL);

**M**<sub>KOH</sub> é a molaridade da solução de KOH (mol/L);

**PM**<sub>TAG</sub> é a massa molar média dos triacilgliceróis presentes no óleo (g/mol);

**m**<sub>a</sub>: massa da amostra (g).

A massa molar dos TAG foi calculada como a média ponderada da fração molar das massas moleculares dos triacilgliceróis constituintes do óleo de soja (873g/mol).

#### 3.2.3 Quantificação do teor de água

O teor de água da emulsão formada após os 90 minutos sob efeito do ultrassom foi determinada por titulação de Karl Fisher (modelo DL50, Mettler Toledo). As análises foram realizadas seguindo o procedimento padrão de calibração, amostragem e operação recomendado pelo fabricante.

#### 3.3 Cálculo da taxa inicial de reação

O cálculo da taxa ou velocidade inicial de reação é de extrema importância pelo fato de que pode-se saber se a reação ocorre instantaneamente, além de comparar as diferentes condições avaliadas no estudo cinético. É calculada dividindo-se a variação de conversão num determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética.

A velocidade inicial de reação (r) foi calculada da seguinte forma:

$$r = \frac{dAGL}{dt} |_{t=0}$$
 Equação (3)

Onde: **r**= taxa inicial de reação (min<sup>-1</sup> ou h<sup>-1</sup>);

**AGL**= teor de AGL no tempo t (m/m, %);

**AGL**<sub>0</sub>= teor de AGL no tempo 0 (m/m, %);

t= tempo de reação (min ou h);

t₀= tempo inicial de reação (min ou h).

#### 3.4 Procedimento Experimental

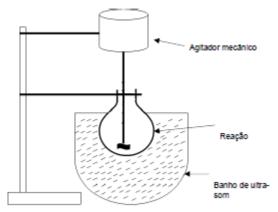
#### 3.4.1 Hidrólise enzimática em modo batelada e batelada alimentada

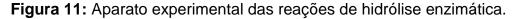
Como etapa prévia às reações de hidrólise, foram estudadas condições de formação de emulsão estável transparente em banho de ultrassom (modelo USC 1800A, UNIQUE – com controle de temperatura, frequência de 40 kW e potência máxima de 132 W), mantendo a agitação mecânica fixa em 600 rpm (agitador mecânico modelo RW 20 D, IKA) e o tempo de exposição de 90 minutos, variando:

- razão molar óleo de soja:água (1:3 1:9);
- potência do ultrassom (40 100%);
- temperatura (40 65°C).

As reações de hidrólise enzimática do óleo de soja assistidas por ultrassom foram conduzidas em um Erlenmeyer de 50 mL. Para cada experimento, eram pesados 18 gramas de óleo e a quantidade de água destilada correspondente à razão molar em estudo (aproximadamente 1,11 g (1:3) e 3,34 g (1:9)) e a reação somente era iniciada pela adição da enzima (1 m/m% e 10 m/m%), com base na massa de substratos (óleo+água), após a mistura estar emulsionada com aparência transparente (condições de temperatura, agitação, tempo e potência do ultrassom definidos anteriormente). Foi selecionada, num primeiro momento, para as reações de hidrólise, a enzima que apresentou maior atividade de hidrólise (segundo procedimento do item 3.2.1.). As Figuras 10 e 11 apresentam o aparato experimental utilizado nos experimentos de hidrólise.

**Figura 10:** Esquema das reações de hidrólise em banho de ultrassom. Fonte: BABICZ (2009).







Foram realizados estudos cinéticos nas condições: (1) razão molar óleo:água de 1:3, 40% da potência do ultrassom (53 W), temperatura de 55 °C e agitação mecânica de 600 rpm; sendo a emulsão prévia obtida nestas condições num tempo mínimo de 90 minutos e, a partir daí, adicionou-se 1% de enzima com base na massa dos substratos; e, (2) razão molar óleo:água de 1:9, 100% da potência do ultrassom (132 W), temperatura de 65 °C e agitação mecânica de 600 rpm; sendo a emulsão prévia obtida nestas condições num tempo mínimo de 90 minutos e, a partir daí, adicionou-se 10% de enzima com base na massa dos substratos.

A fim de se investigar o efeito do ultrassom na conversão de ácidos graxos livres, foram realizadas cinéticas, nestas mesmas condições, em que apenas a formação da emulsão foi assistida pelo ultrassom. Também foi investigado se o sistema reacional seria auto-catalítico sob sonicação, ou seja, uma cinética sem adição de enzima também foi estudada. Todas estas cinéticas foram até 24 horas.

Após decorrido o tempo de reação, solvente n-hexano foi utilizado na filtração à vácuo do óleo hidrolisado para remoção da enzima. A solução era

então, rotavaporada a 60 °C para remoção do solvente. A acidez das amostras foi quantificada segundo procedimento descrito no item 3.2.2.

As mesmas condições reacionais e procedimentos acima descritos foram seguidos para as subsequentes reações em modo batelada alimentada, exceto pelo fato que, foi calculada a taxa de evaporação de água, identificada através das análises em Karl Fisher, e esta quantidade de água era adicionada a cada minuto durante o tempo reacional, através de um pipetador automático.

#### 3.4.2 Hidrólise enzimática em modo contínuo

As cinéticas de hidrólise de óleo de soja em reator contínuo em ultrassom foram realizadas em tubo de polietileno de alta densidade (PA 12), de 2 m de comprimento, diâmetro interno de 4,15 mm e volume total de 27,05 mL. Este tubo foi previamente empacotado com a enzima e acondicionado no banho de ultrassom (modelo USC 1800A, UNIQUE — com controle de temperatura, frequência de 40 kW e potência máxima de 132 W) a 65 °C. A mistura de óleo de soja e água destilada na razão molar 1:9 foi emulsionada previamente sob agitação mecânica de 600 rpm (agitador mecânico modelo 712, Fisatom) até aparência branco leitosa durante 1 hora e, em seguida, bombeada para o reator a uma vazão contínua de 0,5 mL/min por uma bomba de alta pressão para líquidos (HPLC) (Digital Série III marca Acuflow) até o completo preenchimento do sistema reacional. A Figura 12 mostra o aparato experimental para as reações de hidrólise realizadas em modo contínuo.

**Figura 12:** Aparato experimental utilizado para a hidrólise enzimática de óleo de soja em modo contínuo em banho de ultrassom.



O cálculo do volume do reator (V<sub>R</sub>) realizou-se através de seu diâmetro interno e comprimento utilizado. A porosidade do leito foi determinada de acordo com Dalla Rosa (2009), adicionando o cômputo da porosidade interna da enzima. Neste caso, a porosidade do leito deve considerar o volume das enzimas que ocupam o leito do reator e o volume de poros da enzima, como mostra a seguinte equação:

$$\epsilon_{\rm L} = 1 - \left(\frac{{\rm V}_E - {\rm V}_P}{{\rm V}_R}\right)$$
 Equação (4)

Onde:  $\varepsilon_L$ = Porosidade do leito;

**V**<sub>E</sub>= Volume ocupado pelas enzimas no leito do reator;

**V**<sub>R</sub>= Volume do leito do reator;

**V**<sub>P</sub>= Volume de poros das enzimas que ocupam o leito do reator.

Para o cálculo do volume de enzimas (V<sub>E</sub>) obteve-se as seguintes informações: número de unidades de enzima em determinada massa (realizado manualmente) e diâmetro médio das partículas da enzima (calculado pela média da observação do resultado de análise de MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura).

O volume de poros (V<sub>P</sub>) é então multiplicado pela massa da amostra de enzima empacotada no leito do reator. Neste caso, foi adotado como valor de

volume de poros,  $V_{\text{P1}}$ , dado pela ficha técnica do fabricante da enzima, de 0,5 mL/g.

Considerando que condições amenas de temperatura e pressão são envolvidas no processo, o tempo de residência (na verdade, tempo de residência superficial, "superficial residence time", ou tempo espacial) foi estimado no presente trabalho pela porosidade do leito multiplicado pelo seu volume e dividido pela vazão volumétrica de alimentação de substratos a ser utilizada no processo, conforme a equação 4:

$$au = rac{arepsilon_{L} imes V_{R}}{q}$$
 Equação (5)

Nas condições de vazão, enzima e reator empregados, os tempos de residência encontrados foram de 27,05 minutos, que foi o tempo mantido entre as coletas das amostras. O teor de AGL das amostras coletadas foi sendo monitorado segundo o procedimento 3.2.2.

#### 4 Resultados e Discussão

O presente capítulo tem por objetivo apresentar os resultados obtidos no decorrer deste trabalho, relacionados à seleção das enzimas com potencial hidrolítico, testes para formação de emulsão transparente e todas as cinéticas realizadas com as enzimas comerciais de pâncreas suíno e Lipozyme TL IM, nos modos batelada, batelada alimentada e contínuo.

#### 4.1 Seleção das enzimas com potencial hidrolítico

A Tabela 7 apresenta os resultados das medidas de atividade de hidrólise realizadas seguindo metodologia apresentada no item 3.2.1.

**Tabela 7:** Atividade hidrolítica das lipases comerciais, medida a 37 e 65 °C a 150 rpm.

Lipase	Atividade (U/g) 37°C	Atividade (U/g) 65°C
Pâncreas suíno	1027,4 ± 30,8	74,1 ± 21,7
Lipozyme TL IM	$182,4 \pm 7,3$	112,6 ± 5,8
Lipozyme RM IM	55,8 ± 4,1	21,9 ± 1,2
Novozym 435	$14,3 \pm 0,8$	38,7 ± 9,5

Pode-se observar que há uma diferença na atividade hidrolítica entre as duas temperaturas avaliadas para todas as enzimas estudadas, sendo que as menores temperaturas apresentaram as maiores atividades de hidrólise (exceto para a Novozym 435), justificando que quando a enzima é exposta a uma temperatura acima da sua temperatura ótima ocorre uma diminuição de sua atividade de hidrólise. Esta redução da atividade de hidrólise foi vinculada à inativação da proteína, ocasionando uma mudança da estrutura terciária e

quaternária da enzima e, consequentemente, a redução na sua atividade enzimática e até mesmo sua completa inativação (SCRIBAN, 1985). Através da Tabela 7 pode-se também observar que a lipase de pâncreas suíno foi a que apresentou a maior atividade hidrolítica, de 1027,4 U/g a 37 °C, sendo a mesma escolhida para as próximas etapas deste trabalho. Uma vantagem interessante apresentada por esta enzima é seu custo bastante acessível, cerca de um terço do valor comercial de uma lipase imobilizada. A enzima que apresentou melhor atividade hidrolítica a 65 °C foi a Lipozyme TL IM, de 112,6 U/g.

# 4.2 Determinação das condições de formação de emulsão estável transparente

De acordo com resultados prévios de trabalhos que estão sendo desenvolvidos em paralelo pelo grupo, foram investigadas as condições de razão molar óleo de soja:água de 1:3, 1:6 e 1:9, com agitação mecânica fixa em 600 rpm, variando a potência do ultrassom e a temperatura do banho para que a emulsão transparente fosse obtida num tempo de até 90 minutos. A Figura 13 mostra a aparência da microemulsão formada. Devido ao tamanho reduzido das partículas da fase dispersa, somente a fase contínua é identificada a olho nu.

**Figura 13:** Microemulsão obtida nas seguintes condições: razão molar óleo:água 1:9, 100% de potência do ultrassom, 65 °C, agitação de 600 rpm, durante 90 minutos.



Durante o processo de emulsificação, as principais variáveis controláveis do sistema são a relação água/óleo, o tempo de exposição ao ultrassom e a potência ultrassônica liberada. A relação entre a quantidade de água e óleo está ligada diretamente à estabilidade da emulsão, enquanto que o tempo de exposição e a potência do ultrassom estão relacionados com o tamanho das gotículas dispersas (Awadallak, 2012).

De acordo com Lyssant (1974) a viscosidade da emulsão e sua aparência são controladas em parte pelo tamanho das partículas da fase dispersa e a proporção entre as fases internas e externas. Quando o tamanho das partículas da fase dispersa diminui, a emulsão muda de um branco leitoso para transparente (microemulsão). Se as partículas são maiores do que 1 μm a emulsão apresenta aparência branco leitosa e esta impressão visual é devida ao espalhamento de luz, consequência dos diferentes índices de refração do meio dispersado e o dispersante (fase contínua). Numa microemulsão as partículas são menores que 0,05 μm e não espalham luz visível, o que confere sua aparência transparente (BAGWE et al., 2001).

A Tabela 8 apresenta as condições em que a emulsão é formada em 90 minutos para as razões molares estudadas.

**Tabela 8:** Condições encontradas para formação de emulsão transparente, num tempo de 90 minutos e agitação fixa em 600 rpm.

Razão Molar óleo:água	Temperatura (°C)	Potência* (%)
1:3	55	40
1:6	60	70
1:9	65	100

\*Potência de referência: 53W

Conforme a razão molar óleo:água foi aumentada, foram necessárias maiores temperaturas e potência do ultrassom para obter uma emulsão transparente no tempo de 90 minutos mantendo fixa a agitação de 600 rpm. Para os estudos cinéticos posteriores foram então seguidas as condições de temperatura e potência aqui definidas para formação da emulsão durante os

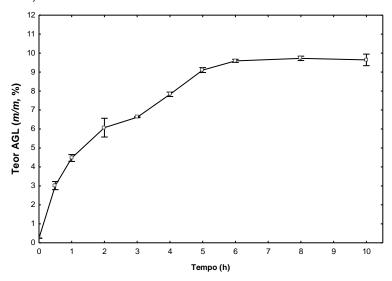
primeiros 90 minutos, seguido da reação de hidrólise pela adição da enzima, nas mesmas condições.

# 4.3 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom pela lipase de pâncreas suíno

Antes de iniciar a avaliação da cinética da reação de hidrólise enzimática sob efeito do ultrassom, foi primeiramente investigado se a reação de hidrólise seria auto-catalítica, ou seja, foram realizados experimentos de 0,5 até 24 horas em que a mistura óleo:água foi submetida ao ultrassom e agitação mecânica, sem adição de qualquer quantidade de enzima. Para tal caso, não houve conversão de ácidos graxos livres em nenhuma dessas reações.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos na primeira cinética de hidrólise destrutiva, realizada na razão molar estequiométrica óleo:água (1:3), 55 °C, 40% de potência, 600 rpm (condições de formação de emulsão para esta razão molar) e 1% de lipase de pâncreas suíno (calculada sobre a massa dos substratos). O tempo reacional variou de 0,5 até 10 horas, a contar a partir da formação da emulsão e consequente adição da enzima. As linhas apenas ligam os pontos experimentais e não representam qualquer ajuste.

**Figura 14:** Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:3, 1% de enzima, 600 rpm, 40% de potência, 55 °C.

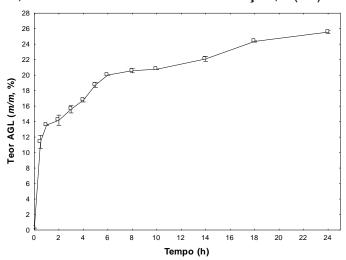


Pode ser observado que nestas condições foram obtidas baixas conversões em ácidos graxos livres de, no máximo, 9,8% em até 10 horas de reação.

Para as etapas subsequentes optou-se por se trabalhar com razão molar 1:9 (óleo de soja:água), uma vez que nas reações de hidrólise a água atua como um reagente, promovendo a quebra das moléculas que reagem com ela (tri-, di- e monoacilgliceróis). Neste sentido, quanto maior a quantidade de água, maior a probabilidade de interação entre os substratos e, portanto, a possibilidade de quebra das moléculas de óleo de soja. O próximo passo foi então aumentar a quantidade de água e de enzima, num novo estudo cinético.

A Figura 15 mostra o estudo cinético realizado na razão molar óleo:água de 1:9, 65 °C, 100% de potência, 600 rpm e 10% de lipase de pâncreas suíno, adicionada após a formação da emulsão. Os experimentos foram conduzidos em até 24 horas.

**Figura 15:** Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, 100% de potência, 65 °C. Velocidade inicial de reação, r (h<sup>-1</sup>) de 15,55.



Pode-se observar que houve um aumento nas conversões em ácidos graxos livres com o aumento na quantidade de reagente (água) e de catalisador (enzima). Porém, as conversões ficaram em, no máximo, 25,5% em até 24 horas de reação.

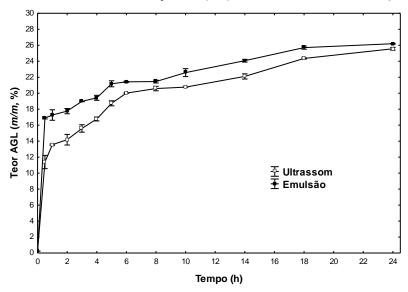
A fim de se investigar o efeito do ultrassom sobre a atividade da lipase, ou seja, se estava ocorrendo desnaturação enzimática pelas ondas

ultrassônicas, realizou-se, nestas mesmas condições, outra cinética onde apenas a emulsão foi obtida em ultrassom e, a partir da adição da enzima, a reação foi conduzida sem a influência do ultrassom.

Abismail et al. (1999) relataram que as emulsões óleo/água formadas por ultrassom são bastante estáveis e podem perdurar por dias. Portanto, o uso do ultrassom durante todo o período reacional com intuito de gerar emulsões pode vir a ser desnecessário, uma vez que, após certo período de exposição às ondas ultrassônicas, as emulsões formadas permaneceriam estáveis por um longo período de tempo.

A Figura 16 apresenta um comparativo entre a cinética conduzida em ultrassom e a cinética em que apenas a formação da emulsão ocorre sob efeito do ultrassom.

**Figura 16:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de pâncreas suíno, com emprego de ultrassom na formação da emulsão e durante a reação e apenas empregando ultrassom na formação da emulsão. Condições experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, 100% de potência, 65 °C. Velocidades iniciais de reação, r (h<sup>-1</sup>) de 15,55 e 20,37, respectivamente.



Observa-se, pela Figura 16, que, a princípio, parece não estar havendo grande influência do ultrassom sobre a enzima, pois o seu emprego não resulta em aumento da atividade enzimática ou desnaturação. Cabe ressaltar que esta conclusão se deu avaliando as conversões de AGL obtidas, já que a atividade de hidrólise após decorridos os temos reacionais não pode ser medida, pelo fato desta enzima estar em sua forma livre e resultar impregnada de impurezas

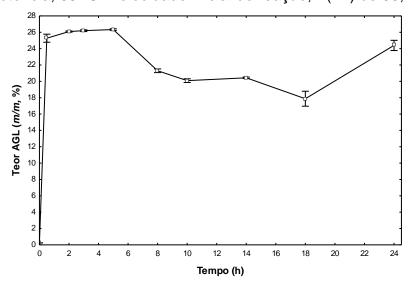
resultantes do sistema reacional. O uso do ultrassom apenas durante a etapa prévia de formação de emulsão transparente conduziu à uma velocidade inicial de reação (r) um pouco maior comparada ao uso do ultrassom durante todo o tempo reacional (20,37 e 15,55 h<sup>-1</sup>, respectivamente).

A próxima etapa consistiu em avaliar a influência da temperatura sobre a enzima, empregando a lipase comercial imobilizada Lipozyme TL IM, conhecida por apresentar boa atividade de hidrólise em temperaturas próximas a 65 °C.

# 4.4 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom pela enzima Lipozyme TL IM

A Figura 17 apresenta a cinética de hidrólise de óleo de soja em ultrassom, empregando Lipozyme TL IM como catalisador. Para todas as reações, a enzima foi ativada previamente a 40 °C em estufa durante 1 hora.

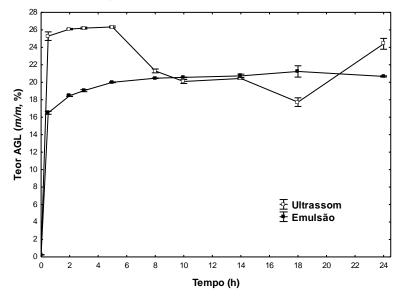
**Figura 17:** Cinética enzimática da hidrólise de óleo de soja em banho de ultrassom nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, 100% de potência, 65 °C. Velocidade inicial de reação, r (h<sup>-1</sup>) de 30,74.



Empregando a Lipozyme TL IM também não foram obtidas conversões em ácidos graxos livres superiores a 26,3% em até 24 horas. De maneira análoga à lipase de pâncreas suíno, foi realizada então uma nova cinética em

que somente a emulsão foi assistida por ultrassom, com resultados apresentados na Figura 18.

**Figura 18:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com emprego de ultrassom e apenas empregando ultrassom na formação da emulsão, sem empregá-lo durante a etapa reacional. Condições experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, 100% de potência, 65 °C. Velocidades iniciais de reação, r (h<sup>-1</sup>) de 30,74 e 10,71, respectivamente.



Mais uma vez não houve grande diferença entre os resultados obtidos em termos de conversões de AGL com e sem uso do ultrassom nas reações de hidrólise. Pode-se observar que uma maior velocidade inicial de reação foi obtida quando empregado o ultrassom (30,74 h<sup>-1</sup>), porém com o passar do tempo as conversões tendem a se equivaler.

A fim de se encontrar possíveis razões para tão baixas conversões, foram realizadas análises de Karl Fisher para determinar o teor de água presente após a formação da emulsão em ultrassom (90 minutos). A tabela 9 mostra o teor de água das amostras na razão molar óleo:água de 1:9 emulsionadas a 65 °C por 90 minutos em ultrassom.

**Tabela 9.** Teor de água das amostras emulsionadas em ultrassom (65 °C, 600 rpm, 100% potência) quantificado por titulação de Karl Fisher. Média de 5 repetições por amostra.

Amostra	Teor de água (%)		
1	1,54 ± 0,1		
2	$1,62 \pm 0,26$		
3	$1,51 \pm 0,7$		

Considerando que a fração mássica de água adicionada inicialmente à mistura era de aproximadamente 15,65% (3,34 gramas), foi constatado que antes mesmo de dar-se início à reação pela adição da enzima estava ocorrendo grande perda de água por evaporação, em torno de 90%. O ultrassom é reconhecidamente formador de partículas de emulsão microscópicas, que aumentam a área interfacial e consequentemente, elevam as taxas de reação. Provavelmente por esse mesmo motivo, as gotículas de água se tornaram mais suscetíveis à evaporação à temperatura de 65 °C.

Awadalak (2012) identificou altas taxas de evaporação de água, acima de 33% em 4 horas, quando empregou sonda ultrassônica na emulsificação de óleo de palma a 55 °C, para posterior reação de hidrólise catalisada por Lipozyme RM IM. Quando expôs a mistura reacional somente 3 minutos à sonda para formação da emulsão como etapa prévia à reação de hidrólise, suas conversões aumentaram cerca de 5 vezes frente à mesma reação de hidrólise assistida pela sonda (50 e 10%, respectivamente).

Em um trabalho em paralelo do grupo, Zenevicz (2012) estudou a hidrólise de óleo de soja variando as condições de emulsão. As condições estudadas foram: razão molar óleo:água de 1:9, 10% de lipase de pâncreas suíno, 40°C e 100% de potência do ultrassom. Quando a mistura permaneceu em banho de ultrassom sob agitação mecânica de 300 rpm por 2 minutos, seguida imediatamente da adição da enzima, obteve-se cerca de 80% de conversão em AGL, enquanto que, quando a mistura foi deixada por 90 minutos a 2000 rpm para formação de emulsão transparente em banho de ultrassom, e a partir da adição da enzima a agitação foi reduzida para 300 rpm, as conversões não ultrapassaram 30%. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, evidenciando que a etapa prévia

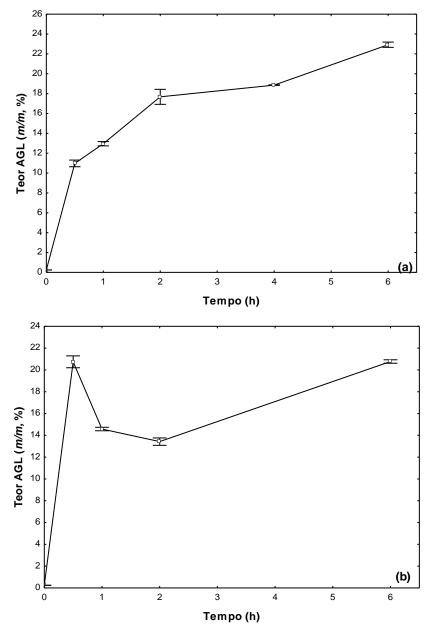
de formação de emulsão transparente está sendo responsável pelas baixas conversões em AGL, pois está elevando as taxas de evaporação de água.

4.5 Estudo cinético da hidrólise de óleo de soja em ultrassom sem formação de emulsão prévia por sistema batelada e batelada alimentada

Para evitar perdas por evaporação, as cinéticas foram repetidas em banho de ultrassom, agora sem a formação prévia de emulsão. Foram seguidas duas estratégias de hidrólise em ultrassom para ambas as enzimas: batelada, onde a reação inicia-se pela adição da enzima tão logo é iniciada a agitação e a irradiação ultrassônica; e batelada alimentada, onde uma gota de água de 0,068 mL era adicionada à mistura a cada minuto com pipetador automático. Esta quantidade de água adicionada foi definida com base na taxa de evaporação encontrada por análise de Karl Fisher (taxa de evaporação de 1% por minuto (0,034 mL) e definida a adição de 2% de água por minuto).

A Figura 19 (a) e (b) mostra os resultados dessa nova estratégia para a reação de hidrólise utilizando lipase de pâncreas suíno nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100% e 65 °C.

**Figura 19:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela lipase de pâncreas suíno, com emprego de ultrassom, sem formação de emulsão prévia, por **(a)** batelada e **(b)** batelada alimentada (0,068 mL/min). Condições experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%, 65 °C.

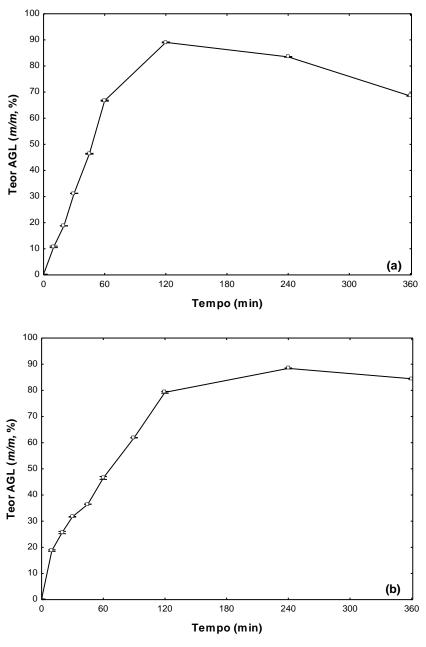


Pode-se observar que quando empregada a lipase de pâncreas suíno não houve aumento nas conversões de AGL em nenhuma das estratégias, evidenciando que a temperatura utilizada é muito alta para esta enzima, provavelmente conduzindo à desnaturação rápida da mesma. Cabe salientar que esta enzima é comercializada e foi utilizada em sua forma bruta, o que a torna mais susceptível à desnaturação por agentes químicos e físicos (como a temperatura). Estes resultados estão de acordo com o *screening* de atividade

de hidrólise, onde esta lipase tem sua atividade reduzida de 1027,4 U/g em 37 °C para 74,1 U/g em 65 °C.

Partimos então para o estudo da Lipozyme TL IM para as duas estratégias. A Figura 20 (a) e (b) apresenta os resultados para a reação de hidrólise utilizando Lipozyme TL IM nas seguintes condições: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100% e 65 °C.

**Figura 20:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com emprego de ultrassom, sem formação de emulsão prévia, por **(a)** batelada e **(b)** batelada alimentada (0,068 mL/min). Condições experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%, 65 °C. Velocidades iniciais de reação, r (min<sup>-1</sup>) de 1,07 **(a)** e 0,72 **(b)**.



Na Figura 20 (a) pode-se verificar claramente que quando se emprega a lipase Lipozyme TL IM, há um aumento nas conversões em AGL para índices de 89% após 2 horas de reação. Tendo por base a estequiometria da reação, onde a conversão máxima em ácidos graxos livres que pode ser obtida é 90%, estes resultados alcançados indicam a conversão praticamente total dos triacilgliceróis presentes no óleo em ácidos graxos livres.

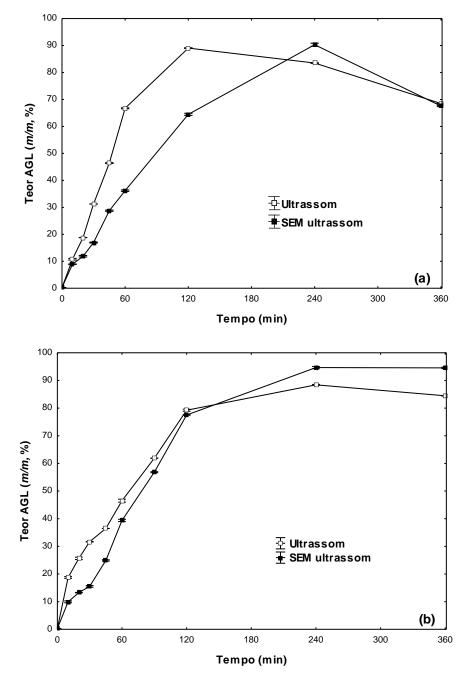
Também pode-se observar que a partir de 4 horas de reação as conversões começam a diminuir, provavelmente por restrições de substrato (evaporação da água).

Abismail e colaboradores (1999) mostraram que, para misturas com grande porcentagem de óleo (>50% v/v), a taxa de desestabilização das emulsões com o passar do tempo se torna significante, mesmo quando estas são formadas pelo uso do ultrassom. Cabe ressaltar que os autores estudaram o sistema querosene/água, mas considerando que este resultado pode ser estendido ao sistema óleo de soja/água aqui estudado, o declínio na taxa de reação com o passar do tempo pode estar relacionado com a desestabilização das emulsões formadas pelo ultrassom.

Quando a água é adicionada no decorrer da reação (Figura 20 (b)), a cinética é um pouco mais lenta (r=0,72 min<sup>-1</sup>), mas atinge os mesmos 88% após 4 horas de reação, sem grandes quedas na conversão em 6 horas.

Frente a estes novos e promissores resultados, repetiu-se as cinéticas com a Lipozyme TL IM sem o emprego do ultrassom, para verificar o efeito do mesmo. A Figura 21 (a) e (b) mostra o comparativo, nas duas estratégias, entre as reações conduzidas em ultrassom e sem a influência da irradiação ultrassônica.

**Figura 21:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, sem formação de emulsão prévia, com e sem emprego de ultrassom, por **(a)** batelada (velocidades iniciais de reação, r (min<sup>-1</sup>) de 1,07 e 0,56, respectivamente) e **(b)** batelada alimentada (0,068 mL/min) (velocidades iniciais de reação, r (min<sup>-1</sup>) de 0,72 e 0,63, respectivamente). Condições experimentais: razão molar 1:9, 10% de enzima, 600 rpm, potência de 100%, 65 °C.



Na Figura 21 pode-se observar que o emprego do ultrassom não tem grande influência nas reações de hidrólise na batelada alimentada (b). Pode-se concluir que na batelada (a) sem ultrassom a reação de hidrólise é mais lenta (r=0,56 min<sup>-1</sup>), corroborando com a teoria das emulsões e mostrando que o

ultrassom reduz as limitações de transferência de massa, melhorando a agitação molecular e, consequentemente, aumentando a área interfacial para a enzima estar agindo.

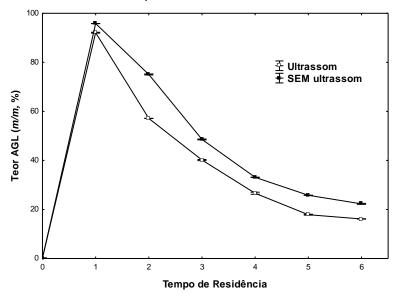
A conversão alcançada com ultrassom em 2 horas é atingida em 4 horas sem irradiação ultrassônica. Provavelmente, para o sistema reacional estudado, as limitações de transferência de massa estão sendo vencidas pelo simples emprego da agitação mecânica.

Liu et al. (2008) compararam a hidrólise enzimática de óleo de soja em sistema de ultrassom (potência de 1,64 W/cm², temperatura de 50 °C, concentração de enzima de 1% (m/m) e razão molar água/óleo de 0,675:1 (m/m); e *shaker* (45 °C, concentração de enzima de 0,55% (m/m), razão molar água/óleo de 1,35:1 (m/m)). Os autores observaram que a ação do ultrassom visivelmente acelerou a reação de hidrólise enzimática de óleo de soja em sistema livre de solvente catalisada pela lipase, e apresentou uma eficácia 2,3 vezes maior se comparado com *shaker*.

### 4.6 Teste de hidrólise de óleo de soja em reator contínuo

Um teste, de caráter apenas exploratório, foi realizado em reator contínuo, com e sem emprego de ultrassom, nas condições do modo batelada (razão molar óleo:água de 1:9, temperatura de 65 °C, 100% da potência do ultrassom, substratos prévio à alimentação sob agitação de 600 rpm durante 1 hora) empregando aproximadamente 12,66 gramas de Lipozyme TL IM para rechear o reator (2 m) e utilizando vazão de entrada de 0,5 mL/min, o que resulta num tempo de residência de aproximadamente 27 minutos. A cada tempo de residência uma amostra foi coletada e a conversão em AGL foi quantificada. A Figura 22 mostra os resultados obtidos para a hidrólise em reator contínuo com e sem o emprego do ultrassom.

**Figura 22:** Hidrólise de óleo de soja catalisada pela Lipozyme TL IM, com e sem emprego de ultrassom, em reator contínuo. Cada tempo de residência equivale a 27 minutos. Condições experimentais: razão molar óleo:água de 1:9, temperatura de 65 °C, 100% da potência do ultrassom.



Conversões em ácidos graxos livres de até 94% foram obtidas no primeiro tempo de residência e, a partir daí, as conversões apresentaram redução drástica. Observou-se após o término das cinéticas, que a enzima ficou bastante impregnada por glicerol, 'subproduto' da reação de hidrólise, não permitindo mais seu contato com a mistura que é bombeada. Isto, provavelmente, tenha sido o fator causador da queda nas conversões de maneira tão contundente. Aqui cabe salientar a presença de erro experimental, já que sabe-se que o máximo de conversão em AGL possível de ser obtido é 90%.

Pode-se observar ainda através da Figura 22, comportamentos idênticos para a cinética com e sem emprego de ultrassom, mostrando novamente, pouca ou nenhuma influência do ultrassom no sistema estudado. Neste caso, a emulsão branco leitosa formada por agitação a 600 rpm antes do bombeamento para o reator pode ter sido suficiente para promover aumento da área interfacial de contato com a enzima.

### 4.7 Considerações Finais

A tabela 10 mostra um compilado dos trabalhos de hidrólise enzimática de diferentes óleos, empregando diferentes lipases, em diferentes sistemas de agitação (orbital, magnética ou mecânica) encontrados até o momento na literatura especializada.

**Tabela 10**. Resumo dos trabalhos de hidrólise enzimática de óleos vegetais presentes na literatura.

Autores (Ano)	Óleo	Lipase	Conversão / Tempo
Linfield et al. (1984)	Coco e oliva	Candida rugosa	98% / 72 h
Wang et al. (1988)	Oliva	Candida rugosa	35% / 1 h
Ghosh e Bhattacharyya (1995)	Mostarda, girassol e arroz	Candida cylindracea	99% / 48 h
Kiatsimkul et al. (2006)	Soja	Candida rugosa	25% / 24 h
Padilha e Augusto-Ruiz (2007)	Pescado	Pâncreas suíno	44% / 1 h
Gomes (2009)	Pescado	Penicillium simplicissimum	81% / 48 h
Babicz et al. (2010)	Palma	Lipozyme TL IM	40% / 1,5 h
Rodrigues e Ayub (2011)	Soja	T. lanuginosus e R. miehei	95% / 10 h
Awadalak (2012)	Palma	Lipozyme RM IM	50% / 24 h

Frente ao que foi exposto na revisão bibliográfica em relação ao estado da arte e avaliando os resultados alcançados neste trabalho em comparação com os trabalhos encontrados na literatura resumidamente apresentados na tabela 10, fica evidente a relevância do mesmo; que apesar de ser um trabalho ainda em fase inicial, apresenta grande potencial para estudos mais aprofundados, visto os bons resultados obtidos em conversões em ácidos graxos livres, quando empregada a lipase comercial Lipozyme TL IM, a 65 °C, 600 rpm, razão molar de 1:9, sem formação de emulsão prévia.

#### 5 Conclusões

Neste trabalho foi estudada a influência do ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de soja por duas enzimas comerciais, lipase de pâncreas suíno e Lipozyme TL IM. A consecução do mesmo permitiu, de forma geral, concluir que:

- O ultrassom mostrou-se eficiente na etapa de emulsificação, apresentando a formação de emulsão nas condições estudadas sem necessidade do uso de emulsionantes.
- O ultrassom intensificou a taxa de evaporação da água, que é um dos substratos, durante a emulsificação a 65 °C.
- A lipase de pâncreas suíno foi a que apresentou maior atividade de hidrólise a 37 °C, seguida da Lipozyme TL IM. A 65 °C, a lipase que apresentou melhor atividade hidrolítica foi a Lipozyme TL IM.
- O emprego do ultrassom nas reações de hidrólise parece não influenciar no sistema estudado. Provavelmente, a agitação mecânica empregada (600 rpm) foi suficiente para romper as barreiras à transferência de massa e promover uma eficiente mistura do sistema água/óleo.
- A lipase de pâncreas suíno apresentou desnaturação a 65 °C, evidenciando que esta temperatura está muito acima da sua temperatura ótima e que, por ser uma enzima na forma bruta, esteve mais susceptível à desnaturação frente às condições a que foi exposta.
- Empregando a enzima comercial imobilizada Lipozyme TL IM, foram obtidas conversões em torno de 90% em ácidos graxos livres, em 2 horas de reação, nas condições de razão molar óleo de soja:água de 1:9, 10 m/m% de enzima, 600 rpm de agitação, 65 °C, indiferente à presença ou não do ultrassom, quando o sistema não foi previamente emulsionado.
- O estudo da produção de AGL em modo contínuo mostrou-se promissor, alcançando o máximo de conversão após 1 tempo de residência, à vazão de 0,5 mL/min, na razão molar óleo:água de 1:9, 65 °C e agitação de 600 rpm, e

não houve diferença significativa nas conversões com o emprego do ultrassom. Apesar das reduções significativas nas conversões a partir do 2º tempo de residência pela formação de glicerol, o reator contínuo apresenta uma estratégia interessante para estudos mais aprofundados para a hidrólise de óleo de soja.

Os resultados obtidos estão muito além dos encontrados na literatura para a hidrólise enzimática de óleo de soja, seja em termos de altas conversões ou baixos tempos de reação, mostrando ser uma tecnologia limpa bastante promissora.

#### 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

O novo processo estudado neste trabalho mostrou ser bastante promissor, mas por ser um estudo ainda em fase inicial, pode-se fazer algumas sugestões para próximos trabalhos:

- Realizar um planejamento de experimentos para investigar quais variáveis são significativas na reação de hidrólise do óleo de soja e otimizar a produção de ácidos graxos livres;
- Realizar um estudo mais aprofundado da produção de AGL em modo contínuo, estudando todas as variáveis envolvidas no processo através de um planejamento de experimentos;
- Estudar o processo de hidro-esterificação do óleo de soja, ou seja, realizar a reação de hidrólise seguida da reação de esterificação do óleo de soja, por batelada sequencial e/ou em modo contínuo.

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. www.abiove.com.br, acesso em 05/11/2012.

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J.P.; WILHELM, A.M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. **Emulsification by ultrasound: Drop size distribution and stability**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 6, p. 75-83, 1999.

ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V. BARATTI, J. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 63, p. 63-70, 1999.

ARANDA, D.A.G.; BRITTO, P.P.; CARVALHO, L.G.; CAMACHO, L. **Estudo de catalisadores homogêneos na produção de biodiesel a partir da esterificação de ácidos graxos**. 13º Congresso Brasileiro de Catálise – CBCat, Foz do Iguaçu, 2005.

AWADALLAK, J. A. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo, 2012.

BABICZ, I. Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

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

BAGWE, R.P.; KANICKY, J.R.; PALLA, B.J.; PATANJALI, P.K.; SHAH, D.O. Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 18, p. 77-140, 2001.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. **Biorreactors with immobilized lipases**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 392-416, 1996.

BARBOSA, J.C.S. e SERRA, A.A. **Ultrassom (I): influencia do ultrassom na química**. *Química Nova*, v. 14, n. 4, p. 302-316, 1992.

BARON, A.M. Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2003.

BASTIDAS, T.J.P. **Geração de Emulsões durante a Produção de Petróleo**. Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica. Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2007.

BATISTA, E.; MONNERAT, S.; KATO, K.; STRAGEVITCH, L.; MEIRELLES, A.J.A. Liquid-liquid equilibrium for systems of canola oil, oleic acid and short-chain alcohols. *Chemical Engineering Journal*, v. 44, p. 1360-1364, 1999.

BEHREND, O. e SCHUBERT, H. Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 271-276, 2001.

BERLAN, J. e MASON, T. J. **Dosimetry for power ultrasound and sonochemistry**. *Advances in Sonochemistry*, v. 4, p. 1-73, 1996.

BEVILAQUA, J.V. Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

BOBBIO, F.O. e BOBBIO, P.A. **Introdução à Química dos Alimentos**. Livraria Varela, 2ª ed., São Paulo, 1992.

BOLDYREV, V.V. **Mechanochemistry and sonochemistry**. *Ultrasonics Sonochemestry*, v. 2, n. 2, p. 143-145, 1995.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**. Interciência, Rio de Janeiro, 2008.

BORNSCHEUER, U.T. e KAZLAUSKAS, R.J. **Hydrolases in Organic Synthesis – Regio and Stereoselective Biotransformations**. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

BOSILJKOV, T.; TRIPALO, B.; BRNČIĆ, M.; JEZEK, D.; KARLOVIC, S.; JAGUŠT, I. Influence of high intensity ultrasound with different probe diameter on the degree of homogenization (variance) and physical properties of cow milk. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 34-41, 2011.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G., SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H.F. e ANDERSON, W.A. **Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases**. *Química Nova*, v. 18, p. 544-554, 1995.

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

CHOW-MC GARVA, R. A. Study on the Sonocrystallisation of Ice. Ph.D. Thesis at University of Leeds, 2004.

CHUCHEVAL, A. e CHOW, R.C.Y. **A study on the emulsification of oil by power ultrasound**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 916-920, 2008.

CORRÊA, M. A. **Curso de Cosmetologia: aspectos teóricos e práticos**. Educação Continuada. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2005.

CÔTÉ, A. e SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from Streptomyces coelicolor A3(2). Enzyme and Microbial Technology, v. 42, p. 381-388, 2008.

DALLA ROSA, C. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2009.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros**. *Química Nova*, v. 27, p. 623-630, 2004.

DARIO, M. Recuperação da glicerina oriunda do processo de produção de

**Biodiesel - Um processo Quimúrgico**. Monografia de Graduação em Química-Bacharelado. Universidade Federal do Mato Grasso - UFMT. Cuiabá, 2006.

ERGINER, R.; TOPPARE, L.; ALKAN, S.; BAKIR, U. **Immobilization of invertase in functionalized copolymer matrices**. *Reactive & Funcional Polymers*, v. 45, p. 227-233, 2000.

FIAMETTI, K.G.; SYCHOSKI, M.M.; DE CESARO, A.; FURIGO JR, A.; BRETANHA, L.C.; PEREIRA, C.M.P.; TREICHEL, H. DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J.V. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, p. 981-987, 2011.

FREGOLENTE, P.B.L.; PINTO, G.M.F.; WOLF-MACIEL, M.R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELLA, C.B. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular**. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1539-1543, 2009.

FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; DUANT, J. **Oil and fat hydrolysis with lipase from** *Aspergillus sp. Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, n. 5, p. 527-530, 1995.

GAIKWAD, S.G. e PANDIT, A.B. Ultrasound emulsification: Effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 15, p. 544-563, 2008.

GHANEM, A. e ABOUL-ENEIN, H.Y. **Application of lipase in kinetic resolution of racemates**. *Chirality*, v. 17, p. 1-15, 2005.

GHOSH, S. e BHATTACHARYYA, D.K. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 72, n. 12, p. 1541-1544, 1995.

GIRELLI, A.M. e MATTEI, E. **Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review**. *Journal of Chromatography B*, p. 3-16, 2005.

GOMES, M.M.R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Escola de

- Química EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.
- GUNSTONE, F.D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, n. 12, p. 1535-1549, 1999.
- GÜRSEL, A.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; YAGGCL, Y. Immunization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers. *Reactive & Funcional Polymers*, v. 57, p. 57-65, 2003.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.;; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HIDALGO, F.J. e ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recente advances and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, p. 499-506, 2003.
- HODNETT, M.; CHOW, R.; ZEQIRI, B. High-frequency acoustic emissions generated by a 20 kHz sonochemical horn processor detected using a novel broadband acoustic sensor; a preliminary study. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, p. 441-454, 2004.
- HUANG, J.; LIU, Y.; SONG, Z.; JIN, Q.; LIU, Y.; WANG, X. Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, p. 521-525, 2010.
- ISIK, S.; ALKAN, S.; TOPPARE, L.; CIANGA, I.; YAGGCL, Y. Immunobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-mehylbutyl-2—(3-thyenyl) acetate/polypyrrole matrices. *European Polymer Journal*, v. 39, p. 2375-2381, 2003.
- JAEGER, K.E. e REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v. 16, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Rewiew of Microbiology*, v. 53, p. 315-335, 1999.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 457-470, 2008.

KADEMI, A.; LEBLANE, D.; HOUDE, A., **Lipases**. *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*. The Haworth Press Inc., New York, p. 552-561, 2004.

KADER, R.; YOUSUF, A.; HOQ, M.M. **Optimization of lipase production by** *Rhizopus MR 12* in shake culture. *Journal of Applied Sciences*, v. 7, p. 855-860, 2007.

KAPTUROWSKA, A.U.; STOLARZEWICZ, I.A.; KRZYCZKOWSKA, J.; FLORJANCZYK, E.B. **Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from Yarrowia lipolytica**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, p. 186-191, 2012.

KIATSIMKUL, P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Selective hydrolysis of epoxidized soybean oil by commercially available lipases: Effects of epoxy group on the enzymatic hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 41, p. 55–60, 2006.

KIRK, O.; BORCHET, T.V.; FUGLSANG, C.C. **Industrial enzyme applications**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 345-351, 2002.

KOLAKOWSKA, A. e SIKORSKI, Z.E. Chemical and functional properties of food lipids. *CRC Press*, p. 38-68, 2002.

KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom**. *Revista Analytica*, n. 3, p. 34-39, 2003.

KULDILOKE, J. Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetables juices. Ph.D. Thesis at Technische Universitat, Berlin, 2002.

LEAL M.C.M.R. **Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr., G.L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

- LERIN, L.A. **Síntese enzimática de ascorbil-palmitato em diferentes sistemas reacionais**. Tese de Doutorado em Ciências da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- LI, C.; YOSHIMOTO, M.; OGATA, H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 12, p. 373-384, 2005.
- LI, M.K. e FOGLER, H.S. Acoustic emulsification. Part 1: The instability of the oil–water interface to form the initial droplet. *Journal of Fluid Mechanics*, v. 88, p. 499-512, 1978.
- LIMA, J.R.O., SILVA, R.B., SILVA, C.C.M., SANTOS, L.S.S., SANTOS JR, J.R., MOURA, E.M., MOURA, C.V.R. **Biodiesel de babaçu** (*Orbignya Sp.*) obtido por via etanólica. *Química Nova*, v. 30, p. 600-603, 2007.
- LINFIELD, W.M.; BARUSKAS, R.A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S.; STEVENSON, JR. **Enzimatic fat hydrolysis and synthesis**. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 61, n. 2, p. 191- 195, 1984a.
- LINFIELD, W.M.; O'BRIEN, D.J.; SEROTA, S.; BARUSKAS, R.A. **Lipid-lipase interactions Fat splitting with lipase from** *Candida rugosa*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 61, n. 6, p. 1067-1071, 1984b.
- LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.15, p. 402-407, 2008.
- LOTTI M. e ALBERGHINA L. **Lipases: Molecular Structure and Functions.** Em:Polaina J. e MacCabe A.P. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer, Dordrecht, p. 263-282, 2007.
- LYSSANT, K. Emulsions and Emulsions Technology. Surfactant Science Series, v. 6, New York, 1974.
- MACRAE, A.R. e HAMMOND, R.C. **Present and future applications of lipases**. *Biotechnology and Genetic Reviews*, v. 3, 1985.

MAIA, D.J.; DEPAOLI, M.A.; ALVES, O.L. **Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras**. *Química Nova*, v. 23, p. 204-215, 2000.

MARTINEZ, M.A.U.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI M.J. **O** efeito do ultrassom em reações químicas. *Química Nova*, v. 23, p. 251-256, 2000.

MASON, T.J. **Developments in ultrasound – non-medical**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 93, p. 166-175, 2007.

MATOS, L.M.C. Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol. Dissertação de Mestrado em Química – Instituto de Química - IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

MERÇON, F. Estudo da hidrólise enzimática de óleo de babaçu em bioreator com membrana. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1998.

MONGENOT, N.; CHARRIER, S.; CHALIER, P. **Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 861-867, 2000.

MOQUIN, P.H.L. e TEMELLI, F. **Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, p. 94-101, 2008.

MUJUMDAR, S.; KUMAR, P.; PANDIT, S.A.B. **Emulsification by ultrasound:** relation between intensity and emulsion quality. *Indian Journal of Chemical Technology*, v. 7, p. 277-284, 1997.

NOVO NORDISK. Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions. Technical Report A-05948, 1992.

NUNES, S.P. **Produção e consumo de óleos vegetais no Brasil.** DESER - Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais. *Conjuntura Agrícola*, n. 159, 2007.

OLIVEIRA, A.G. Caracterização da distribuição do tamanho de gotas em emulsões água e óleo utilizando diferentes técnicas de medição. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2010.

OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F. Síntese de butirato de butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. *Química Nova*, v. 23, p. 632-636, 2000.

PADILHA, M.E.S. e AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 27, n. 2, p. 285-290, 2007.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. *Current Science*, v. 77, p. 149-162, 1999.

PAQUES, F.W.; Macedo, G.A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, p. 93-99, 2006.

PEIXOTO, E.C.D.; RODRIGUES, C.E.C.; MEIRELLES, A.J.A. Estudo do equilíbrio líquido-líquido do sistema óleo de soja refinado/ácido linoleico comercial/etanol hidratado, a 25°C. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UNICAMP, Campinas, 2005.

PIGHINELLI, A.L.M.T.; PARK, K.J.; RAUEN, A.M.; BEVILAQUA, G.; GUILLAUMON FILHO, J.A. Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo expeller. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, p. 66-71, 2008.

PINHEIRO, D.M. **Produção de lipase por** *Penicillium restrictum*. Dissertação de Mestrado em Ciências - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 1992.

PINHEIRO, T.L. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microorganismo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim, 2006.

POVEY, M.J.W. e MASON, T.J. **O** ultrassom em **Processamento** de **Alimentos.** Editora Springer, Berlin, 1998.

PRIMO M.S.; CENI G.C.; MARCON N.S.; ANTUNES O.A.C.; OLIVEIRA D.; OLIVEIRA J.V. Effects of compressed carbon dioxide treatment on the specificity of oxidase enzymatic complexes from mate tea leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 43, p. 283–290, 2007.

- RAMACHANDRAN, K.B.; AL-ZUHAIR, S.; FONG, C.S.; GAK, C.W. **Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, p. 19–24, 2006.
- RASO, J.; MANAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 5, p. 157-162, 1999.
- RODRIGUES, R.C. e AYUB, M.A.Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.
- ROONEY, D. e WEATHERLEY, L.R. The effect of reaction conditions upon lipase catalyzed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 10, p. 947-953, 2001.
- ROSA, J.J. Desenvolvimento de um novo processo de tratamento de águas oleosas Processo FF. XIX Prêmio Jovem Cientista: Água Fonte da Vida, 2003.
- ROSANO, H.L.; GANDOLFO, F.G.; HIDROT, J-D.P. Stability of W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> multiple emulsions, influence of ripening and interfacial interactions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 138, p. 109-121, 1998.
- SALAGER, J.L. **Tamaño de Gotas de una Emulsion**. Cuaderno FIRP 235. Modulo de Enseñanza en Fenómenos Interfaciales. Facultad de Ingenieria. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela, 1993.
- SALAGER, J.L. Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propriedades deseadas. Estado del arte. Parte B. Cuaderno FIRP S747- B. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela, 1999.
- SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. Chemistry and Biochemistry of palm oil. *Progress in Lipid Research*, n. 39, p. 507-558, 2000.
- SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; BHOOPANDER, G. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Journal Microbiology Methodology*, v. 39, p. 239-247, 2003.

SCHERER, R.P. Estudo da imobilização de lipase comercial de pâncreas suíno em diferentes suportes inorgânicos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2010.

SCRIBAN, E. Biotecnologia. Editora Malone, São Paulo, 1985.

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

SILVA, L.D.; NASCIMENTO, I.G.; PAGANO, R.L.; RAMOS, A.L.D. **Modelagem** cinética da reação de hidrólise de óleo de soja. 16º Congresso Brasileiro de Catálise – CBCat, Campos do Jordão, 2011.

SINISTERRA, J.V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*, v. 30, p. 180-184, 1992.

SOARES, C.M.F. Otimização por Planejamento Experimental da Imobilização de Lipase em Sílica de Porosidade Controlada na Presença de Estabilizantes. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2000.

STACK, L.J.; CARNEY, P.A.; MALONE, H.B.; WESSELS, T.K. Factors influencing the ultrasonic separation of oil-in-water emulsions. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 12, p. 153-160, 2005.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, V. J. **A review on microbial lipases production**. *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, p. 182-196, 2010.

TRES, M.V. Separação de miscelas óleo de soja/n-butano e óleo de soja/n-hexano utilizando membranas cerâmicas e poliméricas do tipo fibra oca. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2012.

TUTER, M. e AKSOY, H.A. Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola* 

*lanuginosa* and composition of glycerolysis poducts. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 31-34, 2000.

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

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 105, p. 308-317, 2003.

VOLL, F.A.P. **Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2011.

WAKABAYASHI, H. Enzyme-catalyzed transformations of sulfur-containing flavor precursors. Tese de Doutorado em Ciências, Departamento Geral de Tecnologia de Alimentos, Universidade Técnica de Munique, Munique, 2004.

WANG, Y.J.; SHEU, J.Y.; WANG, F.F.; SHAW, J.F. Lipase-catalysed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 31, n. 6, p. 628-633, 1988.

WANG, L.; WANG, Y.; HU, C.; CAO, C.; YANG, X.; ZHAO, M. Preparation of diacylglycerol-enriched oil from free-fatty acids using lecitase ultracatalysed esterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 88, n. 10, p. 1557-1565, 2011.

WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; NAITO, S.; TAGUCHI, H.; GOTO, N.; NAGAO, T.; MATSUO, N.; TOKIMTSU, I., YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H. **Fat-soluble vitamin status is not affected by diacilglicerol consumption**. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 45, p. 259-264, 2001.

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

WINDHAB, E.J.; DRESSLER, M.; FEIGL, K.; FISCHER, P.; MEGÍAS-ALGUACIL, D. Emulsion processing - from single-drop deformation to

**design of complex processes and products**. *Chemical Engineering Science*, v. 60, p. 2101-2113, 2005.

WU, H.; HULBERT, G.J.; MOUNT, J.R. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 1, p. 211-218, 2000.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E. J.; LAMBERT, A. H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton. *Ultrasonics*, v. 42, p. 87-91, 2004.

ZENEVICZ, M.C.P. Comunicação pessoal.

ZHAO, Y.; FENG, R.; SHI, Y.; HU, M. Sonochemistry in China between 1997 and 2002. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 12, p. 173-181, 2005.

ZILLER, S. **Grasas y aceites alimentarios**. Editora Acribia, 7<sup>a</sup> edición, Zaragoza, Espanha, 1996.