



Universidade Federal do Ceará
Departamento de Tecnologia de Alimentos
Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos

Nair do Amaral Sampaio Neta

**ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE
ÁCIDOS GRAXOS POR VIA ENZIMÁTICA OBJETIVANDO
APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

Fortaleza-Ceará
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NAIR DO AMARAL SAMPAIO NETA

**ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE
ÁCIDOS GRAXOS POR VIA ENZIMÁTICA OBJETIVANDO
APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

**FORTALEZA
2007**

NAIR DO AMARAL SAMPAIO NETA

**ESTUDO DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES DE
ÁCIDOS GRAXOS POR VIA ENZIMÁTICA OBJETIVANDO
APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.

Co-Orientadora: M.Sc. Rosa Ferreira Araújo de Abreu.

**FORTALEZA
2007**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Nair do Amaral Sampaio Neta

Dissertação aprovada em 01/ 03/ 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.
(Orientador)

Prof^a. Dra. Dorasílvia Ferreira Pontes.

Prof^a. Dra. Selma Elaine Mazzetto.

Prof. Dr. João José Hiluy Filho.

Prof^a. Dra. Selene Maia de Moraes (UECE).

Dedico este trabalho de pesquisa a Deus pelo dom da vida; aos meus amados pais Lourdes e Bernardo, pelo amor incondicional, dedicação, apoio e esforços sempre presentes durante todo o meu crescimento pessoal e profissional; ao meu marido, pelo carinho, amizade, paciência e incentivos constantes para o desenvolvimento deste trabalho; a minha irmã Nadir, pelo apoio, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por efetuar em minha vida tanto o querer como o realizar, segundo a sua boa vontade.

Ao Professor Dr. José Osvaldo Beserra Carioca, orientador, agradeço o apoio constante para a realização acadêmica deste trabalho.

A Rosa pela paciência e orientação prestadas durante a realização deste trabalho.

A Professora Selene Maia de Moraes pela valorosa ajuda prestada nos resultados deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Mestrado da UFC, pelos ensinamentos e experiências transmitidos.

Aos queridos amigos do PADETEC, Lincoln, Glauber, Katiany, Ada, Emmanuelle, Joana, Raquel, Soraya e Manuel pela valorosa contribuição durante a execução e conclusão deste trabalho.

Ao Paulo, secretário da Coordenação do Curso de Pós-Graduação de Tecnologia de Alimentos, por sua dedicação ao curso, paciência e por sua amizade.

Ao Mazinho, meu querido primo, pela imensurável dedicação durante toda a minha vida, pelo companheirismo sincero e pela amizade.

Aos meus amigos, Prof. José Cals, José Pereira e José Augusto (meus três Josés), pela imensurável dedicação e valorosa contribuição durante a minha vida acadêmica, pela amizade sincera nos momentos difíceis e por esta conquista.

Aos amigos do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira e a operadora Jeanny, pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao meu querido cachorro Chicão, pelas brincadeiras e descontração nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - (CAPES) pela bolsa.

Ao Programa de Pós – Graduação do Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de obtenção do grau de Mestre.

A todas as minhas colegas que participaram da minha jornada acadêmica. Em especial a minha família por participar da concretização dessa conquista.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de avançar mais um passo em busca de minha realização profissional.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho.

*“Quem não sonha, não realiza.
Quem não ousa, não conhece seus
limites”.*

Arquimedes Bastos.

RESUMO

Diversos experimentos foram realizados com o objetivo de estudar a reação de esterificação enzimática do ácido oléico com a frutose em meio etanólico, visando a síntese de biosurfactantes biodegradáveis. Para tanto, foi utilizada a enzima *Candida Antarctica B* na temperatura de 55 °C e em tempos de reação variando entre 48, 72, 96 e 120 horas. De acordo com os resultados obtidos, constatou-se que a citada enzima catalisou preferencialmente o etanol presente no meio reacional para a formação do éster oleato de etila. Este fato foi confirmado através do espectro de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C), bem como do espectro de infravermelho pela presença de um pico de absorção em $1738,4\text{ cm}^{-1}$, característico deste éster. Os resultados da reação de formação do oleato de etila indicam que o maior rendimento da reação foi observado no tempo de 96 horas e que o tempo de 120 horas o rendimento foi inferior. Os experimentos realizados com o objetivo de se obter ésteres de frutose a partir do ácido oléico em meio etanólico não lograram êxito, apesar da literatura indicar a possibilidade de se realizar esta reação em outros meios que utilizam solventes não recomendados para o uso alimentício. O oleato de etila apresenta caráter lipofílico e na indústria de alimentos encontra aplicação na desidratação osmótica de tomates e pimentas do tipo “dedo de moça”, facilitando a perda de água, ganho de açúcar e cor mais luminosa. O uso do oleato de etila no processo de desidratação diminui o tempo de secagem, aumenta sua eficiência sem deixar nenhum tipo de resíduo químico.

Palavras-chave: Biodegradável, lipases, esterificação, biosurfactantes, oleato de etila.

ABSTRACT

Several experiments were done aiming at the study on the enzymatic esterification of the oleic acid with fructose in ethanolic medium, focusing the synthesis of biodegradable biosurfactants. For that purpose, it was utilized the enzyme, *Candida antarctica* B., at temperature of 55 °C, in reacting time of 48, 72, 96 e 120 hours. Accordingly to the obtained results it was verified that the related enzyme catalyzed primarily the ethanol present in the reactional medium to form the ester: ethyl oleate. This fact was confirmed through magnetic nuclear resonance spectra (^1H and ^{13}C) as well as, through infrared spectrum, by the presence of absorption peak at $1738,4\text{ cm}^{-1}$, characteristic of that ester. The results of the reaction of ethyl oleate production indicate that the highest yield was observed in about 96 hours time, and for the 120 hours time it was observed also an inferior yield. The experiments accomplished for the obtention of fructose esters from oleic acids in ethanolic medium were not successful like in other solvents not recommended for food use. The ethyl oleate shows a lipophilic character and in the food industry it finds application in the osmotic dehydration of tomatoes and peppers “dedo de moça”, improving water release, sugar yield and solar brightness. The use of ethyl oleate in the dehydration process decreases the drying time increases its efficiency without leaving any traces of chemical residues.

Keywords: Biodegradable, lipases, esterification, biosurfactants, ethyl oleate.

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Açúcares simples em algumas frutas, hortaliças e vegetais	23
2	Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.	38
3	Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos.	40
4	Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes.	52
5	Leitura do RMN (^1H e ^{13}C).	61
6	Resultados das solubilidades do produto em diversos reagentes.	62
7	Porcentagens correspondentes aos rendimentos de acordo com o tempo.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estrutura da D-Glucose e D-Frutose, respectivamente. . . .	22
2	Estrutura do ácido oléico.	26
3	Estrutura dos ésteres de açúcares.	30
4	Reação de esterificação enzimática.	32
5	Estruturas químicas de alguns biosurfactantes	39
6	Estrutura do éster.	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Frutose	19
2.1.1	Características físico-químicas	20
2.1.2	Fontes de frutose	21
2.1.3	Consumo de frutose	23
2.1.4	Benefícios do uso de frutose	24
2.2	Ácidos graxos	25
2.3	Enzimas	26
2.3.1	Lipases	27
2.4	Reações catalizadas por lipases	31
2.4.1	Efeito da água na atividade e estabilidade das lipases	34
2.5	Aditivos	35
2.5.1	Biosurfactantes	36
2.5.1.1	Classificação e natureza química dos biosurfactantes	38
2.5.1.2	Função fisiológica dos biosurfactantes	41
2.5.1.3	Propriedades dos biosurfactantes	42
2.5.1.4	Aplicações industriais	43
2.5.1.4.1	Biorremediação	44
2.5.1.4.2	Limpeza de reservatórios de óleos	46
2.5.1.4.3	Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)	46
2.5.1.4.4	Aplicações terapêuticas	48
2.5.1.4.5	Biosurfactantes na agricultura	48
2.5.1.4.6	Biosurfactantes na mineração	49
2.5.1.4.7	Produtos de higiene e cosméticos	49
2.5.1.4.8	Indústria de alimentos	50
2.5.1.4.9	Outras aplicações	52
2.6	Oleato de etila	53
2.6.1	Aplicações do oleato de etila	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Materiais	55
3.2	Métodos	55
3.2.1	Metodologia empregada	55
3.2.1.1	Purificação do produto	56
3.2.2	Caracterização do produto	56
3.2.2.1	Infravermelho (IV)	56
3.2.2.2	Ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) (RMN)	57
3.2.2.3	Espectroscopia de massa (EC)	57
3.2.2.4	Tensão superficial	57
3.2.2.5	Solubilidade	58
3.2.2.6	Rendimentos	58
3.2.3	Fluxograma de preparação das amostras	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	Infravermelho (IV)	60
4.2	Ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) (RMN)	60
4.3	Espectroscopia de massa (EC)	61

4.4	Tensão superficial.	61
4.5	Solubilidade.	62
4.6	Rendimentos da síntese.	63
4.7	Discussão dos produtos.	64
4.7.1	Éster de frutose (biosurfactante)	64
4.7.2	Oleato de etila.	64
5	CONCLUSÕES	66
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

As mais diversas reações orgânicas (esterificações, interesterificações, transesterificações e hidrólises) podem ser efetuadas por rotas de síntese empregando catalisador químico ou bioquímico. Por meio da biocatálise grandes melhorias de processo podem ser obtidas, principalmente em relação aos custos operacionais (tempo de reação, gasto de energia, mão-de-obra). Por esta razão, é cada vez mais crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica (AIRES-BARROS, 2002; FABER, 1997).

A tensão superficial surge nos líquidos como resultado do desequilíbrio entre as forças agindo sobre as moléculas da superfície em relação àquelas que se encontram no interior da solução. As moléculas de qualquer líquido localizadas na interfase líquido-ar, realizam um número menor de interações intermoleculares comparadas com as moléculas que se encontram no interior do líquido. A força resultante que atrai as moléculas da superfície de um líquido para o seu interior torna-se o principal obstáculo para a formação de bolhas, gotas e a nucleação de cristais em líquidos. Como estas forças de coesão tendem a diminuir a área superficial ocupada pelo líquido, observamos freqüentemente gotas adotarem a forma esférica. A esta força que atua na superfície dos líquidos dá-se o nome de tensão superficial e, geralmente, é quantificada determinando-se o trabalho necessário para aumentar a área superficial. Quanto menor a tensão superficial maior a facilidade para um líquido se espalhar (ADAMSON & GAST, 1997).

De fato, a aplicação de tensoativos, surfactantes ou ésteres de frutose na indústria alimentícia, fornece uma ótima relação teoria-prática para a discussão da ação destes compostos sobre a tensão superficial. Devido à propriedade de reduzir a tensão superficial dos líquidos, os surfactantes também podem ser classificados como emulsificantes. As moléculas dos produtos tensoativos são constituídas por um grupo lipofílico e um grupo hidrofílico (STEINHART, 2000).

Entre esses, especial atenção tem sido dedicada às enzimas lipolíticas (lipases), em função de sua alta atividade catalítica exibida em diversos meios orgânicos, catalisando a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água (KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998).

Estas lipases são empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, etc) como acadêmico. Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases e que atuam sobre ligações éster. São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (JAEGER & EGGERT, 2002; PANDEY *et al.*, 1999).

Em 1958, SARDA & DESNUELLE propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética: a propriedade de ativação na presença de substratos pouco solúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface óleo/ água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água.

A determinação da estrutura tridimensional de alguns tipos de lipases, propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas apresentava recoberto por uma “tampa” hidrofóbica, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofreria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da “tampa” na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (BRADY *et al.*, 1990; SCHRAG *et al.*, 1991; WINKLER *et al.*, 1990).

Entretanto, mais recentemente foi observado que a presença da “tampa” não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descritas lipases, como a de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Cândida antartica* B que apresentam em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (JAEGER & REETZ, 1998).

Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa (ex: ácidos oléico, linoléico, linolênico), ou seja, ligações éster tríplices (BIER *et al.*, 1955; BROCKMAN & BORGSTROM, 1984; FERRATO *et al.*, 1997).

O importante campo de aplicação desta tecnologia é a produção de ésteres de ácidos graxos e açúcares (frutose), que apresentam larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (CAO *et al.*, 1999; CHAMOULEAU *et al.*, 2001; LORTIE, 1997).

Segundo KAMEL (1997) e KOVÁCS *et al.* (1992) não há ordem específica de adição dos emulsificantes, no entanto esta deve ser executada de forma a garantir a homogeneização da mistura.

Além de seu efeito conservante, ésteres de açúcares têm sido associados como agentes antitumor e inibidores do crescimento de plantas. Os ésteres de frutose são moléculas anfífilas que apresentam, na mesma estrutura, uma parte apolar (hidrofóbica) e uma parte polar (hidrofílica). Em função disso, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) formando um filme molecular, que reduz as tensões interfacial e superficial, atribuindo propriedades únicas aos tensoativos, tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

A preparação de microemulsão é uma alternativa na busca de um material mais homogêneo quanto à forma e tamanho das partículas. Conhecendo-se a relação de concentrações de água e de surfactante, pode-se controlar o tamanho médio das gotículas de microemulsão e, portanto, pressupõe-se, das partículas. Admitindo-se partículas esféricas a partir de considerações geométricas, podemos chegar às equações que permitem calcular diretamente o raio da partícula (BARNICKEL *et al.*, 1992).

Os ésteres de açúcares podem ser preparados pela transesterificação de ésteres metílicos com açúcares (frutose) catalisada por uma base em meio ao solvente dimetilformamida ou sem solvente. Porém, o produto resultante é uma mistura de mono-, di-, e tri-, ésteres de açúcar sendo esta mistura não recomendada ao consumo humano, pois o solvente utilizado (dimetilformamida) não é permitido pela legislação para produtos com fins alimentícios (FEUGE *et al.*, 1970; OSIPOW *et al.*, 1956).

No entanto, as reações enzimáticas vêm sendo cada vez mais empregadas para esterificação da frutose e ácidos graxos resultando em mono éster de frutose, pois, as enzimas atuam de forma específica resultando em um produto mais puro (RAKMI *et al.*, 1997).

O presente estudo tem como objetivos desenvolver uma tecnologia ecologicamente correta para a produção de: 1 - Éster de frutose por via enzimática, que é um biosurfactante vegetal e biodegradável, através da reação de esterificação da frutose com o ácido graxo (oléico), utilizando como biocatalisador a lipase *Candida Antarctica B*. O biosurfactante obtido será destinado a aplicação em produtos com fins alimentícios e, 2 - Oleato de etila por via enzimática, que é um éster obtido através da reação de esterificação do ácido oleico com o álcool etílico, utilizando como biocatalisador a lipase *Candida Antarctica B*. O produto obtido será destinado a aplicação em processos de desidratação osmótica em diversos alimentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Frutose

A frutose é um importante carboidrato encontrado no organismo humano e na maioria das plantas, tendo sido isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar. Seu nome é originário da palavra latina *fructus*, já que as frutas são importantes fontes de frutose (WANG & VANEYS, 1981).

É um monossacarídeo com ampla distribuição na natureza e possui um poder adoçante cerca de 70 % superior ao da sacarose (CRUZ *et al.*, 1998). Sua utilização na indústria de alimentos e bebidas vem crescendo de forma acentuada, pois esse açúcar não apresenta problemas de cristalização como a sacarose (GE *et al.*, 1998).

Tolerada por pacientes diabéticos, a frutose também está relacionada com o aumento da absorção de ferro em crianças (PESSOA & VITOLLO, 1999). Dessa forma, vem sendo recomendada como adoçante alternativo para diabéticos, uma vez que promove diminuição do nível de glicose plasmática (AKGÜN & ERTEL, 1985) e, diferentemente da glicose, pode ser metabolizada independentemente da insulina (BLAKELY *et al.*, 1995).

Como componente de frutas e outros vegetais, é ingerida regularmente na dieta. Também é sintetizada no organismo a partir da glicose, via sorbitol, e esse processo se relaciona com a manutenção do equilíbrio óxido-redutivo. Nos últimos anos, especialmente em países desenvolvidos, a ingestão de frutose vem aumentando acentuadamente, em decorrência do maior consumo de produtos industrializados contendo frutose como, adoçantes e emulsificantes. Deste modo, é importante conhecer seus aspectos metabólicos, bem como os efeitos associados ao seu uso inadequado (DAVIES *et al.*, 1998).

A frutose é mais conhecida por sua intolerância associada ao seu metabolismo que pode ter conseqüências clínicas importantes e também como possível substituta da glicose na dieta dos diabéticos, pelo fato de possuir estrutura química semelhante à da glicose, mas não necessitar da insulina para o seu metabolismo. Entretanto, seus efeitos metabólicos, principalmente os relacionados ao metabolismo lipídico e toda uma rede de metabólitos, são bem menos divulgados (BARREIROSI *et al.*, 2005).

2.1.1 Características físico-químicas

A frutose é considerada um açúcar, sendo um composto sólido, incolor, cristalino e solúvel em água. O termo "açúcar" deriva do sânscrito *çarkara*, que significa grão de areia. O termo em sânscrito deu origem ao grego *sakkaron*, ao latim *saccharum* e ao árabe *sukkar*. A palavra portuguesa açúcar tem origem árabe. Os açúcares são carboidratos e apresentam carbono, hidrogênio e oxigênio na sua composição em uma proporção de 1:2:1 (MALTA & GUIMARÃES, 1976).

Comercialmente a frutose é produzida a partir da isomerização da glicose que, por sua vez, é obtida por hidrólise multi-enzimática do amido. É um monossacarídeo, pois é composta por seis átomos de carbono unidos em ligações covalentes simples, apresentando grupamentos hidroxila, formados por hidrogênio e oxigênio e um grupamento carbonila, formado por ligação dupla entre o carbono e o oxigênio. A posição desse grupamento é que determinará, após a hidrólise do monossacarídeo, se ele dará origem à cetona ou aldeído (GODFREY & WEST, 1996).

Segundo NELSON *et al.* (2000), a glicose, contendo o grupamento carbonila no final da cadeia, quando hidrolisada, fornecerá cetona e será denominada ceto-hexose. A glicose, por sua vez, quando hidrolisada, dará origem a um aldeído, sendo chamada de aldo-hexose. A oxidação dos carboidratos é a principal via metabólica produtora de energia para a maioria das células não fotossintéticas, fornecendo um grama de frutose 16 kJ de energia.

2.1.2 Fontes de frutose

A frutose, também conhecida como levulose, além de ser encontrada sob forma isolada na natureza, é constituinte da sacarose (β -D-Fructofuranosil α -D-glicopirranose) e de outros polímeros denominados *fructans* ou inulina, sendo esta encontrada na chicória, batata-doce e alcachofra de Jerusalém (MATTHEWS *et al.*, 1987; RUMESSEN, 1992).

A frutose é o monossacarídeo predominante em várias frutas, incluindo maçãs, laranjas e melões. Os vegetais podem conter de 1 % a 2 % de seu peso na forma de frutose livre e mais 3 % de frutose sob a forma de sacarose (MATTHEWS *et al.*, 1987).

Conforme HALLFRISCH (1990), a frutose pode ser encontrada como rafinose, que é um trissacarídeo, e também como estaquiose, que é um tetrassacarídeo, em algumas leguminosas como a soja, lentilha, ervilha e feijão. Essas formas não são absorvidas pelo intestino humano, sendo fermentadas pelas bactérias no intestino grosso, gerando gases que acompanham a digestão dessas leguminosas.

De acordo com WANG & VANEYS (1981), na década de 70, a separação da frutose e da glicose a partir de soluções compostas por açúcares invertidos foi conseguida por meio da cromatografia de troca iônica. A utilização desse método aumentou a produção de frutose pura e diminuiu drasticamente o seu preço. Ao mesmo tempo, o isolamento de isomerases capazes de transformar a D-glucose em D-frutose (FIGURA 1) levou à introdução comercial de xaropes derivados de amido, ricos em frutose.

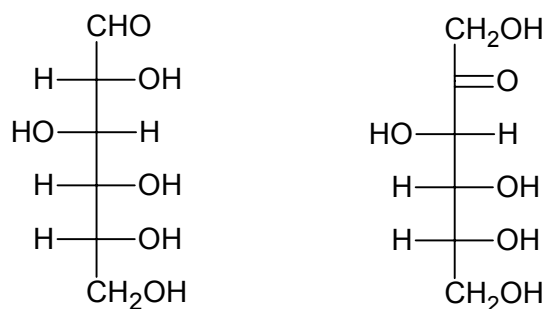


FIGURA 1 – Estrutura da D-Glucose e D-Frutose, respectivamente.

A frutose vem sendo empregada como adoçante de bebidas e frutas industrializadas, constituindo de 4,0 % a 8,0 % de seu peso em decorrência de algumas características, como a maior solubilidade em soluções aquosas e pelo fato de ser mais doce, cerca de 1,7 vez mais que a sacarose. Alimentos produzidos em confeitarias têm, em média, 1,0 % a 2,0 % de frutose, porém se esses alimentos apresentarem frutas na composição, a quantidade de frutose pode aumentar para cerca de 11,0 %. O mel fornece a maior concentração de frutose (42,4 % do peso), sendo considerado um adoçante natural (HALLFRISCH, 1990).

A frutose pode ainda ser produzida a partir do sorbitol. Isso ocorre quando esse poliól é oxidado em uma reação mediada pela enzima sorbitol-desidrogenase. Açúcares simples e o sorbitol estão presentes em algumas frutas, hortaliças e vegetais (TABELA 1). Doces, balas de menta, gomas de mascar, alimentos e sucos dietéticos apresentam sorbitol em sua composição (RUMESSEN, 1992).

2.1.3 Consumo de frutose

Na dieta humana ocidental, os carboidratos correspondem de 200 a 300 g/ dia ou a cerca de 40 % a 50 % da energia ingerida. A ingestão diária de frutose livre (excluindo a sacarose), nos EUA, é de cerca de 16 g/ dia. Caso haja ingestão de xaropes de milho, ricos em frutose, o consumo pode atingir 60 a 100 g/ dia e até 150 g/ dia se somada a frutose proveniente da sacarose (RUMESSEN, 1992).

TABELA 1 - Açúcares simples em algumas frutas, hortaliças e vegetais

Alimentos	Frutose (%)	Glicose (%)	Sacarose (%)	Sorbitol (%)
Frutas				
Maçã	6-8,0	1-4,0	1-5	0,2-1,0
Suco de maçã	6-8,0	1-4,0	4	0,3-1,0
Banana	2-4,0	3-6,0	6-14	?
Cereja	5-7,0	5-7,0	0,2	1,4-2,1
Uva	5-7,0	5-7,0	0,5	0,2
Laranja	2-3,0	2-3,0	4-7	-
Suco de laranja	2-6,0	2-6,0	2-4	-
Pêra	5-9,0	1-2,0	1-2	1,2-3,5
Suco de pêra	5-9,0	1-2,0	1-2	1,1-2,6
Ameixa	1-4,0	2-5,0	1-5	0,3-2,8
Morango	1-3,0	1-3,0	1-2	<0,1
Tomate	1-1,5	1-1,5	<0,1	<0,1
Mel	41	34	2	-
Hortaliças e vegetais				
Aspargos	1,4	1,0	0,3	-
Feijão	1-1,5	0,5-1,0	0,6	-
Repolho	1,6	1,7	0,4	-
Cenoura	1,0	1,0	4,0	-
Alho	1,5	1,0	1-1,5	-
Alface	0,6	0,5	0,1	-
Cebola	1,0	2,0	1,0	-
Ervilha	<0,1	<0,1	1-5,0	-
Batata	<0,1	<0,1	<0,1	-

Fonte: HALLFRISCH (1990).

A ingestão de frutose no Brasil não está bem estabelecida. Estima-se um consumo médio de cerca de 4,34 g/ dia de frutose livre, originária de frutas, doces, hortaliças e outros vegetais. A quantidade de frutose provinda da sacarose é de aproximadamente 27,5 g/ dia. Essa estimativa foi baseada em dados estatísticos de consumo de produtos alimentares fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), utilizando-se como fonte às pesquisas sobre orçamentos familiares, realizadas entre Outubro de 1995 e Setembro de 1996 (IBGE, 2006).

Segundo MONTEIRO *et al.* (2000), estudos mostraram que a dieta do brasileiro vem sendo modificada com uma tendência para redução do consumo de leguminosas, hortaliças e frutas e aumento do consumo de açúcares simples e conseqüentemente de frutose, principalmente a proveniente da sacarose. Essa mudança nos hábitos alimentares poderá repercutir no metabolismo lipídico e ocasionar o aumento dos lipídios totais e triglicerídios na circulação.

2.1.4 Benefícios do uso de frutose

O uso de frutose na dieta de diabéticos foi preconizado desde 1893, quando Minkowski observou a independência da frutose em relação à insulina para a sua metabolização. Vários estudos posteriores reforçaram a idéia de que a frutose, assim como o sorbitol, seriam benéficos na dieta de diabéticos (SPARKS, 1992).

De acordo com o consenso de 2002 da *Associação Norte-Americana de Endocrinologia* (AAE), o consumo de carboidratos recomendado para pacientes diabéticos deve corresponder de 55 % a 60 % do total de calorias ingeridas e o total de carboidratos, mais do que a fonte parece ser o fator crítico que determina o efeito na glicemia.

O uso de frutose também foi sugerido no manuseio dietético da diarreia intratável da infância, como fonte alternativa de carboidrato para crianças incapazes de tolerar os polímeros de glicose (CLARK *et al.*, 1986).

A frutose foi também utilizada no tratamento da intoxicação alcoólica aguda. Estudos indicaram que 500 mL de frutose a 40 %, ofertados em um período de 30 minutos, aumentavam em cerca de 25 % a taxa de declínio dos níveis de etanol sangüíneo. As doses recomendadas variaram de um a três litros de solução de frutose a 10 % (COARSE & CARDONI, 1975).

2.2 Ácidos graxos

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K (CLAUSS, 1996). Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico, linolênico, oléico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (GURR & HARWOOD, 1996; KARLESKING, 1996).

Nos últimos quinze anos tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras (AHMED, 1995; CLAUSS, 1996; GONÇALVES, 1996; LIMA & NASSU, 1996). Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (GUNSTONE, 1999).

Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes (CLAUSS, 1996; GRAMPONE, 1993).

Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um produto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (CASEY & MACRAE, 1992; GUNSTONE, 1999; HAMMOND & GLATZ, 1988).

A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada, por meio da modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo (interesterificação) (CLAUSS, 1996; HAMMOND & GLATZ, 1988).

Atualmente, pode-se destacar a obtenção de óleos de elevada estabilidade, obtidos por modificação genética de sementes oleaginosas, com baixos teores de ácidos graxos polinsaturados, ou seja, óleos com alto teor de ácido oléico (FIGURA 2), cuja composição em ácidos graxos e triglicerídios é muito diferente dos óleos convencionais (RATTRAY, 1990).

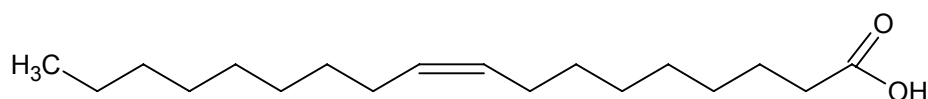


FIGURA 2 – Estrutura do ácido oléico.

2.3 Enzimas

Devido às suas propriedades, as enzimas têm vasta aplicação na síntese orgânica. O seu uso como catalisadores em reações sintéticas e em solventes orgânicos não é recente, sendo que no início do século XX surgiram as primeiras aplicações (ZARK *et al.*, 1991).

O uso de enzimas em síntese orgânica vem crescendo exponencialmente, e atualmente os dados registram mais de 800 artigos e patentes que descrevem cerca de 18500 biotransformações mediadas por enzimas e microorganismos. A imobilização protege a sua configuração nativa, tendo também um efeito benéfico a sua estabilidade (CARREA & RIVA, 2000; FABER, 1997).

De acordo com a sua origem, as enzimas podem ser classificadas em: enzimas microbianas, enzimas de origem animal e enzimas de origem vegetal (LIMA *et al.*, 2001).

O interesse no uso de enzimas para o processamento de alimentos se deve a diversos fatores, entre eles: especificidade de ação, velocidade de reação de 10^8 a 10^{12} vezes, ação rápida e eficiente em baixas concentrações, atividade em condições brandas de pH, temperatura (30 a 70 °C) e pressão atmosférica, fácil controle da reação e pequena toxicidade (OLSEN, 1995; TIMMIS & DEMAINE, 1998). São classificadas e codificadas pela NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) de acordo com a reação catalisada. A nomenclatura utiliza a abreviação E.C. (Enzyme Commission) seguida de até 4 dígitos referentes à classe e subclasses a que pertencem.

De acordo com AMFEP (2004), em geral, as enzimas são consideradas como auxiliares no processamento de alimentos. Embora possam permanecer no produto final, não exercem uma função específica neste. Portanto, não são consideradas como aditivos alimentares, ao contrário de adoçantes, espessantes, antioxidantes, etc.

2.3.1 Lipases

Entre as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico, encontram-se as lipases (PANDEY *et al.*, 1999).

Lipase é o nome genérico para um grupo de enzimas pertencentes à classe das hidrolases e que atuam sobre ligações éster. São capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meios aquo-restritos, como reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise, e por atuar sobre substratos não naturais (JAEGER & EGGERT, 2002).

As lipases são originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (SAXENA *et al.*, 2003). Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura (HASAN *et al.*, 2006).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente a versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (HASAN *et al.*, 2006).

Entre os processos de maior interesse, estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (VULFSON, 1994). As razões do enorme potencial biotecnológico dessas enzimas incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requerem a presença de co-fatores; iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e, iv) exibem uma alta enantiosseletividade (JAEGER & REETZ, 1998).

De acordo com DIAS *et al.* (2005), também podemos citar como vantagens na utilização desses tipos de enzimas: a formação de produtos mais puros devido à alta seletividade do catalisador, bem como as condições amenas de temperatura e pH necessárias à síntese, em contraposição às condições extremas associadas ao uso de processos químicos, pois no caso da síntese de ésteres de açúcar por esterificação química, sem o uso de biocatalisadores, serão necessárias altas temperaturas, o que dificulta a obtenção do produto.

Utilizando a rota química, é favorecida a formação dos ésteres de ácidos graxos: mono, di, tri e tetra. Quando se pretende obter apenas um desses compostos, é importante dispor de técnicas que permitam correlacionar a distribuição de produtos obtidos, qualitativa e quantitativamente, com estas condições, como a cromatografia por exclusão de tamanho (GPC) e a espectrometria por ressonância magnética de ^{13}C (RMN ^{13}C) (EYCHENNE & MOULOUNGUI, 1998).

A utilização de água como solvente em biotransformações afeta a produtividade de reações de esterificação catalisadas por hidrolases pelo deslocamento do equilíbrio químico. O uso de um solvente orgânico permite a superação destes problemas, além de melhorar a especificidade da enzima (AIRES-BARROS, 2002).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno e ibuprofeno), agroquímica (inseticidas e pesticidas) e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) (JAEGER *et al.*, 1994; KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998).

Dentre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres de ácidos graxos apresenta-se como uma vertente bastante promissora, em função da importância de inúmeros ésteres na vida cotidiana. Produtos naturais, tais como triglicerídios, fosfolipídios, esteróides, aromatizantes e fragrâncias, apresentam em comum uma ligação éster, apesar das diferentes propriedades físicas e diversas estruturas químicas que possuem (JAEGER *et al.*, 1994; YAHYA *et al.*, 1998).

Conseqüentemente, o número de rotas de sínteses orgânicas que incorporam um substrato enzimático vem sendo largamente estudadas (JONES, 1986; MARGOLIN, 1991; SOLEWICK, 1987; ZARKS *et al.*, 1991).

Bem ilustrativos são os processos que utilizam enzimas lipolíticas (lipases) como catalisadores, para um largo espectro de reações (CASTRO & ANDERSON, 1995; HARWOOD, 1989; MACRAE & AMUNDSON, 1985). Entre estes, destaca-se a obtenção de ésteres por via enzimática (FIGURA 3) por oferecer, além das vantagens tradicionais, a possibilidade de classificar inúmeros ésteres de grande importância do setor alimentício como produto natural (COSTA *et al.*, 1995; LANGRAND *et al.*, 1988; MILLER *et al.*, 1988).

Ésteres de ácidos graxos e açúcar também vêm sendo utilizados como inseticidas sintetizados com base em produtos naturais encontrados em plantas. Materiais sintetizados a partir de ésteres de açúcar podem, potencialmente, substituir produtos já utilizados na indústria, por constituírem produtos de maior biodegradabilidade (PARK *et al.*, 2004).

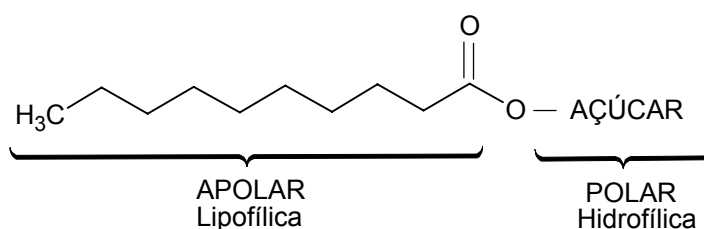


FIGURA 3 – Estrutura dos ésteres de açúcares.

A lipase B de *Cândida antarctica*, também conhecida como CAL-B, pode ser utilizada em processos industriais como a síntese de triglicerídeos e esterificação de álcoois terpenos, e seu uso já foi registrado na síntese de acil-hexoses, oleatos de frutose e ésteres de glicose, além da sua regiosseletiva na esterificação de açúcares (COULON *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2003).

Para elaboração deste estudo, foi utilizada uma enzima lipolítica que, é uma lipase do tipo CAL-B *Cândida antarctica* produzida por fermentação submersa de microrganismos *Aspergillus oryzae* geneticamente modificada e adsorvida sobre resina acrílica macroporosa numa concentração de 3 % (massa/ massa)

2.4 Reações catalisadas por lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações (KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (GANDHI, 1997; YAHYA *et al.*, 1998). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (BALCÃO *et al.*, 1996; VULFSON, 1994).

Outros solventes, além de água e álcool, podem ser utilizados como nucleófilos em reações catalisadas por estas enzimas. Desta forma, as lipases podem participar de reações como aminólises, tiotransesterificações e oximólises, em solventes orgânicos, com elevada seletividade (FABER, 1997; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

O uso deste biocatalisador em aminólise de ésteres, em meios anidros, tem sido bem sucedido na síntese de peptídeos e amidas de ácidos graxos (KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998). Esses resultados são promissores para a utilização de tecnologia de lipases em síntese de peptídeos opticamente ativos, polímeros, surfactantes e novos detergentes com baixo custo (GHOTRA *et al.*, 2002; KAZLAUSKAS & BORNSCHEUER, 1998).

A atividade hidrolítica da lipase pode ser diretamente relacionada com sua atividade de síntese, mas é independente de sua atividade de interesterificação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (YAHYA *et al.*, 1998).

A esterificação direta de açúcares com ácidos graxos catalisada por lipase (FIGURA 4) é um procedimento bastante complexo, devido à baixa solubilidade dos açúcares em meios orgânicos (LORTIE, 1997). Conversões elevadas têm sido reportadas usando piridina como solvente, no entanto, esse tipo de solvente é incompatível com aplicações em aditivos alimentares. Outras soluções são baseadas no uso de açúcares protegidos, que requerem etapas adicionais de síntese (LORTIE, 1997; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

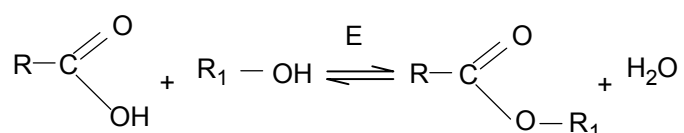


FIGURA 4 – Reação de esterificação enzimática.

De acordo com YUTAKA & KITAGAWA (1998), os resultados preliminares obtidos em cromatografia de camada fina mostraram que no caso da catálise por enzimas lipolíticas, as conversões de açúcares em ésteres são influenciadas fortemente pela concentração de água empregada, a variação da temperatura e a concentração de enzima.

Para determinarmos a presença desses ésteres de açúcares existem várias técnicas tais como, a espectroscopia na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN ^1H , ^{13}C), espectroscopia de massa (EM), entre outras. Sendo consideradas técnicas de inestimável importância na análise orgânica qualitativa, amplamente utilizadas nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas, bem como, em linhas de produção e no controle de processos industriais (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; SOLOMONS & FRYHLE, 2001).

O infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e espectrometria de massas (EM) constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação (LOPES & FASCIO, 2004).

Quando se adicionam à água pequenas quantidades de um composto anfifílico solúvel, uma parte é dissolvida como monômeros e outra parte forma uma monocamada na interface ar/ água. As moléculas anfifílicas da monocamada estão em equilíbrio com os monômeros presentes da solução, e a cada concentração de monômero corresponde uma tensão superficial característica. Quando a concentração de monômero atinge um valor crítico, o tensoativo adicionado começa a associar-se na forma de micelas. As micelas são definidas como agregados coloidais termodinamicamente estáveis, formadas espontaneamente por compostos anfifílicos acima de uma determinada concentração, designada concentração crítica micelar (CMC), a temperaturas superiores à temperatura crítica micelar (HELENIUS & SIMONS, 1975).

Ensaio realizado por COSTA *et al.*, (1995) com diferentes sistemas de solventes possibilitaram a purificação de ésteres. A síntese enzimática do produto foi comprovada através do espectro de FT-IR que apresentou uma absorção em 1744 cm^{-1} (*Bacillus Subtilis* alcalina), 1743 cm^{-1} (*Bacillus Subtilis* neutra) e 1737 cm^{-1} (*Sacharomyces cereviciae*) característica de carbonila de ésteres.

Segundo GATFIELD (1995), os ésteres de frutose, quando preparados por processos enzimáticos, podem ser caracterizados como naturais ou idênticos ao natural, sendo, portanto, preferidos pelo mercado consumidor.

2.4.1 Efeito da água na atividade e estabilidade das lipases

Mesmo num meio não-convencional constituído essencialmente por uma fase orgânica, a quantidade de água no sistema influencia fortemente a atividade catalítica de enzimas (CABRAL *et al.*, 2001). Para baixos teores de água, a atividade enzimática é geralmente baixa.

Normalmente, a atividade enzimática aumenta com o aumento da camada de hidratação da enzima, o que é devido à ação lubrificante da água que aumenta a flexibilidade interna da enzima (SCHMID *et al.*, 2000).

De acordo com FERNANDES *et al.*, (2001), a estabilidade enzimática, normalmente diminui com o aumento da quantidade de água. A água participa numa variedade de mecanismos que causam a desnaturação da proteína conduzindo à inativação das enzimas.

Em micelas invertidas consegue-se uma estabilidade elevada através do controle da atividade de água. Para lipases suspensas em solventes orgânicos, obtêm-se em geral estabilidades elevadas, uma vez que a quantidade de água é muito pequena (valores de atividade de água <1) as enzimas adquirem uma maior rigidez conformacional (estado desidratado). Além disso, não ocorre proteólise, outra causa comum de desnaturação em água (CABRAL *et al.*, 2001).

Existe uma quantidade adequada de água (15 %) para qual a taxa de conversão é máxima. Para pequenas e altas concentrações de água observa-se pouca conversão. Acredita-se que as lipases hidratadas apresentam alta atividade. No entanto, para quantidades de água maiores de 15 %, o equilíbrio se desloca para a esquerda (FIGURA 4), desfavorecendo a formação dos produtos, na reação de esterificação (CHOPINEAU *et al.*, 1988).

2.5 Aditivos

De acordo com o Decreto Lei n.º 55.871 de 26/ 03/ 1965, aditivo alimentar é considerado pela legislação brasileira como a substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo.

Esta legislação obriga os produtores a mencionarem nas embalagens de alimentos e bebidas os aditivos utilizados e também proíbe que os aditivos substituam a matéria-prima básica, alterem o valor nutritivo, sejam tóxicos ou mascarem falhas de fabricação. Muitos aditivos utilizados em alimentos e bebidas apresentam propriedades toxicológicas, portanto, é dever dos órgãos competentes fiscalizar a qualidade dos alimentos industrializados para preservar a saúde dos consumidores (BRASIL, 1998).

A definição da FAO/ WHO (*Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization*) é mais explícita que o Decreto lei n.º 55.871 de 26/ 03/ 1965 e parece mais adequada, considerando aditivo como a substância não nutritiva adicionada intencionalmente ao alimento, geralmente em quantidades pequenas, para melhorar sua aparência, aroma, sabor, textura e conservação (FAO, 2007).

Esse tipo de aditivo deve ser diferenciado do aditivo incidental, que é a substância residual ou migrada, presente no alimento, como decorrência das fases de produção, beneficiamento, acondicionamento, estocagem e transporte, ou das matérias-primas nele empregadas.

2.5.1 Biosurfactantes

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria desses compostos disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (DESAI & BANAT, 1997).

Os surfactantes são moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/ água e água/ óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades dos surfactantes (BANAT, 2000).

Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Segundo BOGNOLO (1999), vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídios) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais.

Atualmente, nos países industrializados 70-75 % dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam. Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de produtos mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biosurfactantes (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Os biosurfactantes são atóxicos, inodoros, biocompatíveis e biodegradáveis; propriedades que aliadas ao baixo custo e sua origem renovável contribuem para o aumento do consumo desses produtos (YUTAKA & KITAGAWA, 1998).

De fato, uma legislação recente discrimina emulsificantes quimicamente idênticos em produtos naturais e não naturais (US, 1985). A preferência dos consumidores por produtos naturais, tem estimulado estudos com a finalidade de se obter abundantemente precursores extrativos naturais através de métodos enzimáticos. Estes métodos têm capacidade de produzir grandes quantidades de substâncias emulsificantes, que não seriam acessíveis por processos extrativos. Os produtos obtidos desta forma são de fato considerados naturais pela legislação (FUGANTI & ZUCCHI, 1998; US, 1985).

2.5.1.1 Classificação e natureza química dos biosurfactantes

Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados como apresentado na TABELA 2 (DESAI & DESAI, 1993).

TABELA 2 - Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonados
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: DESAI & DESAI (1993).

Os biosurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos como, por exemplo, o emulsan (FIGURA 5), no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos (ROSENBERG *et al.*, 1979), ou o liposan de *C. lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984).

Algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biosurfactantes, como por exemplo, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, algumas espécies de *Cyanobacteria* e alguns patógenos como *S. aureus* e *Serratia sp.*. Bactérias do gênero *Acinetobacter sp.* produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante (KAPPELI & FINNERTY, 1979). As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biosurfactantes particulados.

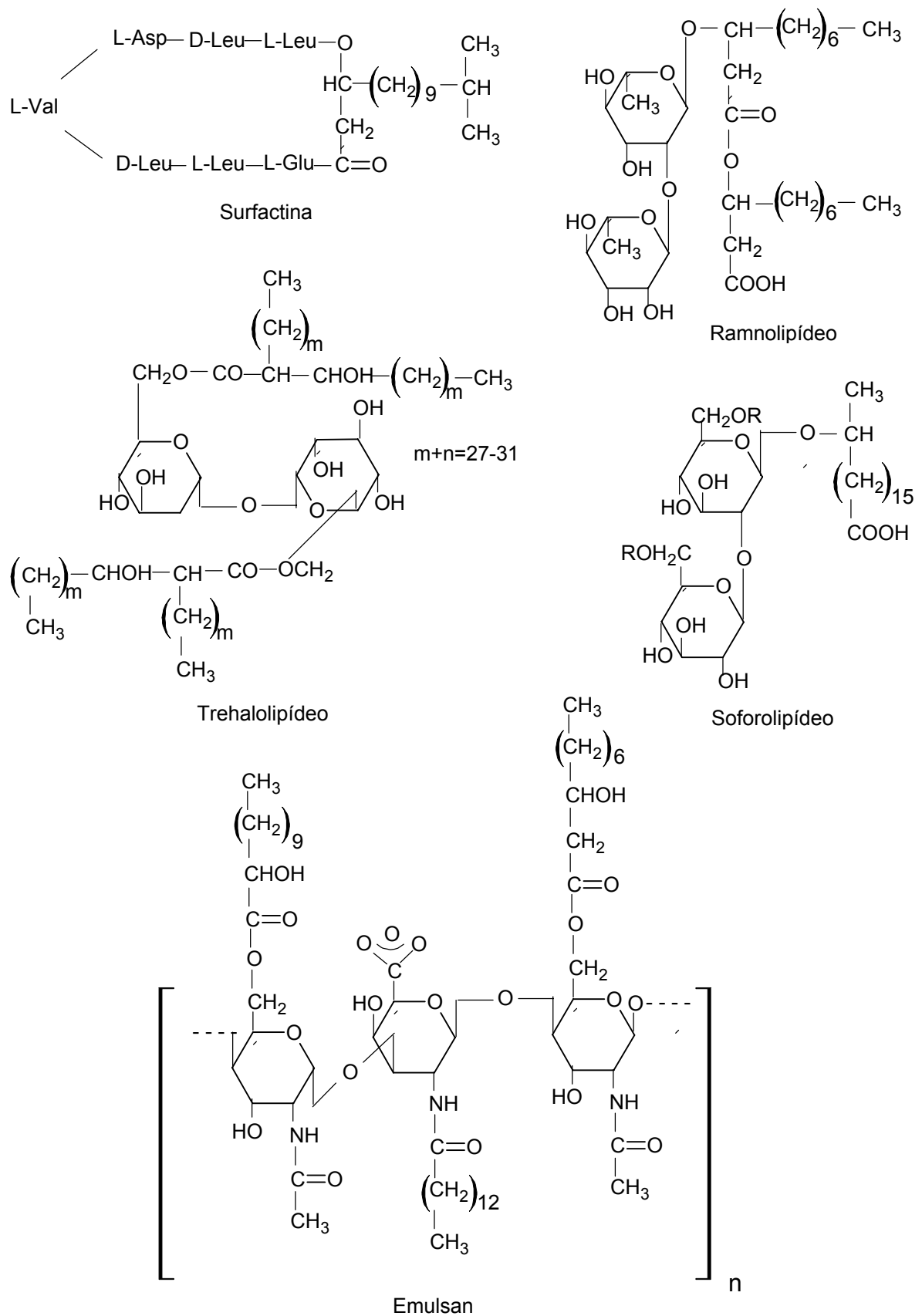


FIGURA 5 – Estruturas químicas de alguns biosurfactantes
 Fonte: NITSCHKE & PASTORE (2002).

Os biosurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (BOGNOLO, 1999; CAMEOTRA & MAKAR, 1998). A maioria dos biosurfactantes são neutros, ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (TABELA 3).

TABELA 3 - Principais classes de biosurfactantes e microrganismos envolvidos

<i>Tipos de biosurfactantes</i>	Microrganismos
Glicolipídios	
- ramnolipídios	Pseudomonas aeruginosa
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, T. Apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	Pseudomonas fluorescens
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Sufactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e Fosfolipídios	
- Ácidos graxos	Corynebacterium lepus
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	Acinetobacter calcoaceticus
- biodispersan	Acinetobacter calcoaceticus
- liposan	<i>Cândida lipolytica</i>
- carboidrato- lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio- proteína	<i>Cândida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	Acinetobacter calcoaceticus
- células	Várias bactérias

Fonte: DESAI & BANAT, 1997.

2.5.1.2 Função fisiológica dos biosurfactantes

Embora a exata função fisiológica dos biosurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções lhe têm sido atribuídas:

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY *et al.*, 1991). As cepas de *Bacillus subtilis* produzem biosurfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (COOPER *et al.*, 1981);
- Transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biosurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*, onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos (KAPPELI & FIECHTER, 1977);
- Aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Os elementos chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células a superfícies. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG & RON, 1999);
- Atividade antibiótica: demonstrada por vários biosurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios. Os ramnolipídios de *P. aeruginosa* e a surfactina (FIGURA 5) de *B. subtilis* funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biosurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996).

2.5.1.3 Propriedades dos biosurfactantes

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biosurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999), conforme evidenciado a seguir:

- Atividade superficial e interfacial: os biosurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biosurfactante (COOPER & PADDOCK, 1984);
- A concentração micelar crítica (CMC) dos biosurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/ L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/ água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/ m respectivamente (BOGNOLO, 1999);
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biosurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75 °C por até 140 h e pH entre 5 e 12 (HOROWITZ *et al.*, 1990). Os biosurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3 % é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999);
- Biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos os biosurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN & GIBBS, 1993);
- Baixa toxicidade: os biosurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998); além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ *et al.*, 1998);

- Os biosurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (DESAI & BANAT, 1997);
- Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biosurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (REISER *et al.*, 1989).

2.5.1.4 Aplicações industriais

O maior mercado para os biosurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, bem como na remoção da poluição decorrente de derramamentos de óleo no ambiente (VAN DYKE *et al.*, 1991).

Na síntese dos ésteres dos ácidos graxos com açúcar, um dos grandes obstáculos a serem resolvidos se constitui na escolha do solvente, visto que não havia um produto comum aos reagentes hidrófilos e lipófilos, simultaneamente. Com o emprego da dimetilformamida consegue-se eliminar este problema, facilitando o isolamento dos tensoativos; em contra-partida não poderemos obter um produto com fins alimentícios, pois, a dimetilformamida é tóxica (OSIPOW *et al.*, 1956).

Vários são os solventes e os processos indicados para o isolamento dos ésteres graxos da frutose e, ainda, dos ésteres metílicos e da frutose que não reagiram, contudo o processo é complexo e percebe-se que, na realidade, não existe um método genérico para o isolamento dos tensoativos, devendo-se considerar, todavia, que comportamentos e estruturas diferentes devem exigir processos específicos, adaptados às características intrínsecas dos produtos (BERTSCH *et al.*, 1965; MARTINELLI, 1977; OSIPOW *et al.*, 1956).

Conforme destacado abaixo, o uso de métodos físicos de análise (IV, RMN, EC) traz uma série de vantagens, destacando-se a redução no tempo de análise, diminuição substancial nas quantidades de amostra, ampliação da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas, não destruição da amostra (exceto EM) e a possibilidade de acoplamento com métodos modernos de separação, como a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (DOYLE & MUNGALL, 1980).

Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

2.5.1.4.1 Biorremediação

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Como os biosurfactantes aumentam a interação superficial A/ O, estes aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995).

A capacidade dos biosurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes; entretanto, os estudos ainda ocorrem à nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biosurfactantes permanece ainda como um desafio (ATLAS, 1991).

Os biosurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (LANG & WAGNER, 1993).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) pelo uso de biosurfactantes. O tratamento de amostras contaminadas por fenantreno (DAZIEL *et al.*, 1996) e naftaleno (ZHANG *et al.*, 1997) com biosurfactantes resultaram no aumento nas suas taxas de mineralização e solubilização.

O uso de biosurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactante produzido por *Pseudomonas* foi relatada, sendo que outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (KARANTH *et al.*, 1999).

Os biosurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo (MILLER, 1995). Surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas (BOGNOLO, 1999).

2.5.1.4.2 Limpeza de reservatórios de óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biosurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões O/ A, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biosurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (BOGNOLO, 1999).

A utilização de biosurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90 % dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (BANAT *et al.*, 1991).

2.5.1.4.3 Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

A MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biosurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (BANAT, 1995).

O mecanismo de MEOR *in situ* deve-se provavelmente a múltiplos efeitos dos microrganismos no ambiente e no óleo. Estes efeitos incluem: formação de gás e aumento da pressão; produção de ácido e degradação da matriz calcárea; redução na viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de biosurfactantes; produção de solventes; degradação de macromoléculas do óleo, resultando em diminuição da viscosidade; bloqueio seletivo da biomassa nas zonas de alta permeabilidade (JACK, 1988; KHIRE & KHAN, 1994).

A utilização de biosurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biosurfactantes no reservatório e subseqüentes propagação *in situ* ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfactantes; ou, ainda, a produção de biosurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatório (BANAT, 1995).

A última estratégia é mais cara devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biosurfactante (MOSES, 1987). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de biosurfactantes (BANAT *et al.*, 2000).

Para ser útil na MEOR *in situ* os microrganismos devem ser aptos a crescer em condições extremas, como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa tensão de oxigênio (KARANTH *et al.*, 1999). Muitos microrganismos adaptados a condições extremas, com capacidade para recuperação de óleo cru têm sido isolados e estudados (JENNEMAN *et al.*, 1983).

2.5.1.4.4 Aplicações terapêuticas

A surfactina (FIGURA 5), um dos mais conhecidos biosurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (ARIMA *et al.*, 1968; PEYPOUX *et al.*, 1999). O biosurfactante produzido por *R. erythropolis* inibiu o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (UCHIDA *et al.*, 1989).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstra atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (THIMON *et al.*, 1995). A inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biosurfactante produzido por *Lactobacillus* foi relatada. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes (VELRAEDS *et al.*, 1996).

2.5.1.4.5 Biosurfactantes na agricultura

Os biosurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (LIN, 1996). Surfactantes de *Bacillus subtilis* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis (PATEL & GOPINATHAN, 1986).

Os ramnolipídios (FIGURA 5) possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (STANGUELLINI & MILLER, 1997).

2.5.1.4.6 Biosurfactantes na mineração

Compostos tenso-ativos produzidos por culturas de *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.* foram utilizados para flotação e separação de calcita e eschelita. A recuperação foi de 95 % para CaWO_4 e 30 % para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (KOSARIC *et al.*, 1987).

O biodispersan, polissacarídeo aniônico, produzido por *A. calcoaceticus* A2, foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água (ROSENBERG *et al.*, 1988). Biosurfactantes de *C. bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (POLMAN *et al.*, 1994).

2.5.1.4.7 Produtos de higiene e cosméticos

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biosurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos (BROWN, 1991).

Um produto comercial que continha 1 mol de sofrorolipídios e 12 moles de propilenoglicol, apresentou excelente compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais (YAMANE, 1987). Alguns sofrorolipídios (FIGURA 5) são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem.

A preparação de biosurfactantes pela ação enzimática (principalmente lipases) sobre moléculas hidrofóbicas promoveu um novo direcionamento na produção destes compostos, principalmente para utilização em produtos de higiene e cosméticos (BANAT *et al.*, 2000).

2.5.1.4.8 Indústria de alimentos

A síntese de ésteres de ácidos graxos com açúcar utilizando biocatalisadores está se tornando uma técnica promissora, devido aos benefícios apresentados pelo uso destes catalisadores, aos constantes investimentos no desenvolvimento de enzimas com maior rendimento, estabilidade e atividade enzimática e ao surgimento de enzimas imobilizadas que possibilitam o reuso várias vezes. Considerando o grande potencial das enzimas como biocatalisadores e apesar de já existirem no mercado algumas aplicações definidas, existe necessidade de estudo e aprimoramento dos processos enzimáticos nesta área, principalmente para estabelecer os processos em escala industrial (PACE, 2006).

Os agentes tensoativos, além de serem usados como auxiliares na biocatálise e de métodos bioquímicos de análise e purificação, têm sido eles próprios, cada vez mais produzidos por via enzimática. Isso tem levado a novos compostos anfifílicos, ditos biológicos ou biosurfactantes, tais como os tensoativos não iônicos obtidos por esterificação enzimática de ácidos graxos com hidratos de carbono ou álcoois polihídricos, em meio orgânico e sob pressão reduzida, catalisada pela lipase *Candida Antarctica B* imobilizada numa resina acrílica (DUCRET *et al.*, 1995).

Os monoésteres apresentam propriedades tensoativas mais vantajosas do que os ésteres múltiplos, pelo que a proporção destes deve ser minimizada. A mesma estratégia permite também obter emulsificantes naturais, como os lisofosfolipídios, muito usados na indústria alimentícia para melhorar a digestibilidade de gorduras. É o caso da síntese de lisolectina por transesterificação (alcoólise) enzimática catalisada por fosfolipases ou preferencialmente, pela lipase do *Mucor miehei* imobilizada (SARNEY *et al.*, 1994).

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase (BANAT *et al.*, 2000) e na solubilização de aromas (BANAT, 2000).

Os biosurfactantes também são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas. Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, sorvetes, leite de coco, produtos lácteos, entre outros, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (VATER, 1986). O bioemulsificante produzido por *C. utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (SHEPHORD *et al.*, 1995).

Na indústria de queijos elas são empregadas na alteração e intensificação do sabor e em processos da aceleração da maturação. Também na indústria de laticínios, as lipases são utilizadas para a obtenção de margarinas de baixo teor calórico, entre outros (ALONSO, 2001).

A literatura reporta a hidrólise do óleo de fígado de bacalhau para a produção de ácidos graxos Omega 3 – insaturados destinados às dietas de grupos clínicos especiais (PANDEY *et al.*, 1999). O enriquecimento de óleos com ácidos graxos poliinsaturados, como por exemplo, ácido linolênico conferem a estes atividades anti-carcinogênicas e anti-escleróticas, sendo chamados atualmente de alimentos nutracêuticos (MARTINS, 2001).

Segundo MOZAFFAR *et al.* (1994), o uso de tensoativos para estabilizar emulsões alimentícias utilizadas na determinação de atividades lipolíticas, deve ter em conta que a atividade da lipase varia tanto em função do tipo de tensoativo, como da sua concentração.

Conforme KAMEL (1997) e KOVÁCS *et al.* (1992), não há ordem específica de adição dos emulsificantes, no entanto deve ser executada de forma a garantir a homogeneização da mistura.

2.5.1.4.9 Outras aplicações

Preocupações ambientais têm orientado a seleção de tensoativos usados nos detergentes domésticos e industriais, pelo seu volume e pelo efeito que podem induzir nas estações de tratamento de águas residuais. Assim, testes de biodegradabilidade e de toxicidade aquática começam a ter uma importância decisiva, tendo-se verificado que tensoativos da mesma família, como os tensoativos glicosídicos e compostos não iônicos com unidades de glucose em comum, apresentam propriedades ambientais bastante diferentes (MADSEN *et al.*, 1996).

Outros campos de utilização dos biosurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersante tem aplicação na indústria de tintas (ROSENBERG & RON, 1999), pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura. As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio (REISER *et al.*, 1989).

A TABELA 4 mostra um resumo das funções e aplicações industriais dos biosurfactantes.

TABELA 4 - Principais aplicações comerciais dos biosurfactantes

Funções	Campo de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: BANAT (2000); BANAT *et al.* (2000).

2.6 Oleato de etila

O oleato de etila (etil cis – 9- octadecanoato) é um éster formado pela reação de esterificação do ácido oléico com etanol (GUNSTONE, 1999). O oleato de etila caracteriza-se por um líquido límpido, de cor amarelo pálido a incolor, sendo praticamente insolúvel em água, mas miscível com clorofórmio, cloreto de metileno, etanol, éter de petróleo e óleos fixos. Apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{38}O_2$ e massa molar igual a 310,51 g/mol (OLEATO, 2007; WIKIPEDIA, 2007).

Apresenta ainda propriedades repelentes à água sendo um eficiente lubrificante e emoliente como o palmitato de isopropila, miristrato de isopropila ou outros ésteres como o oleato de pentaeritritol, oleato de propilenoglicol e etc. (MIRISTRATO, 2007).

2.6.1 Aplicações do oleato de etila

Seu emprego compreende os mais diversos setores, sendo utilizado principalmente nas indústrias farmacêutica e de alimentos. Na indústria alimentícia, o oleato de etila vem recebendo destaque em virtude de suas propriedades benéficas e desejáveis. O efeito da solução de oleato de etila como pré-tratamento na desidratação de frutos é um dos temas que vem sendo amplamente investigado na literatura. Estudos realizados por DOYMAZ (2007) e DOYMAZ (2007a), indicaram que tomates e cerejas pré-tratados com solução de oleato de etila alcalina secaram mais rapidamente que as amostras que não receberam tratamento. Além disso, a capacidade de reidratação foi mais rápida nas amostras pré-tratadas com a solução.

Uma técnica apresentada por SHI *et al.* (1997), no tratamento químico através de soluções com oleato de etila, a fim de aumentar a sua permeabilidade à água, trataram a pele do tomate inteiro (variedade Heinz), e em seguida o submeteram à desidratação osmótica com uma solução de açúcar (65 °Brix), à 25 °C, durante 6 horas. Esse processo apresentou bons resultados em termos de perda de água, ganho de açúcar e cor, e, além disso, não deixa nenhum tipo de resíduo químico.

Sua utilização também é reportada em estudos para manutenção da cor vermelha de pimentas, durante o processo de secagem. ERGÜNES & TARHAN (2006), verificaram que a imersão de pimentas em solução a 2 % de oleato de etila + 2 % de NaOH + 4 % de K_2CO_3 à temperatura de 60 °C proporcionaram elevada retenção de cor, em comparação àquelas que não receberam pré-tratamento.

A comercialização de pimentas, em geral, é “in natura” ou desidratada, tendo como destino principal os frigoríficos dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo que trabalham com produtos cárneos embutidos. As maiores dificuldades de comercialização do produto seco, encontram-se na desuniformidade da cor, da umidade e da contaminação por coliformes ou salmonelas, que são consideradas características negativas decorrentes, principalmente, da secagem natural em terreiros sob condições artesanais rudimentares e más condições sanitárias (AKPINAR, *et al.*, 2002).

Estudos realizados por DOYMAZ & PALA (2002) revelam que, frutos inteiros de pimentas da variedade Kahramanmaras (*Capsicum annum L*), com cortes longitudinais e fatiadas foram tratadas com emulsão aquosa de oleato de etila e K_2CO_3 e, submetidas logo após, a secagem em secador de cabine (50 e 60 °C), até atingirem a umidade de 11 %. O tratamento com oleato de etila promoveu o aparecimento de cor mais brilhante nas pimentas, além de remover a camada de cera e permitir a difusão da água para a superfície com maior facilidade, diminuindo o tempo de secagem e aumentando a eficiência. As pimentas fatiadas tratadas com a solução apresentam uma velocidade maior de secagem.

Diante das inúmeras aplicações do oleato de etila, vários estudos vêm sendo realizados objetivando sua síntese. ZAGO (2006) sintetizou o oleato de etila em n-heptano a partir do ácido oléico e etanol, utilizando a enzima lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada, no intuito de avaliar o tempo de reação, utilizando a radiação de microondas e verificou que esta foi aumentada em 4, 15 % em relação ao meio reacional não irradiado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Segundo os boletins de análises fornecidos pelos fabricantes, foram utilizados nesta pesquisa, a frutose e o ácido oléico industrializados por VETEC Química Fina Ltda, a enzima lipolítica do tipo CAL-B *Cândida antarctica* produzida por SIGMA-ALDRICH, o sulfato de sódio anidro fabricado por LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, e o etanol P.A. da Dinâmica Reagentes Analíticos.

Todos os materiais foram fornecidos pelo Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos (LDPP) do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) - Campus do Pici, em Fortaleza - CE.

3.2 Métodos

3.2.1 Metodologia empregada

Para a análise dos produtos da reação de síntese de biosurfactantes vegetais (esterificação), partiu-se da metodologia desenvolvida por KHALED *et al.*, (1992). No entanto, de acordo com testes preliminares, a metodologia de extração teve de ser modificada assim como as condições cromatográficas.

Para a realização de síntese (esterificação), foram colocados os reagentes nas seguintes quantidades em erlenmeyers: frutose (0,1 mol ou 18,01 g), ácido oléico (10 ml), lipoenzima (0,1 mol ou 0,01 g), sulfato de sódio anidro (5 g) e etanol P.A. (100 ml), onde foram realizadas as reações. Os experimentos ocorreram sob agitação em shaker (200 rpm) para permitir uma temperatura de 55 °C em diferentes tempos (48, 72, 96 e 120 horas).

3.2.1.1 Purificação do produto

Ao final da reação de esterificação, a enzima, juntamente com a frutose e o sulfato de sódio anidro não diluídos, e em seguida foram removidos por filtração utilizando papel de filtro. Logo após, foi retirado todo o etanol através do rotaevaporador. O produto foi identificado através de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizando, para eluição, uma mistura de solventes clorofórmio/hexano (1:1, v/ v), de acordo com o método de DUCRET *et al.* (1995), adaptado.

Finalizando o processo de purificação do produto, as amostras foram submetidas à Cromatografia Líquida em Coluna (CLC), utilizando como fase estacionária Sílica Gel 60 e como fase móvel uma mistura de solventes clorofórmio/hexano (1:1).

3.2.2 Caracterização do produto

Foram realizadas as seguintes determinações nas amostras puras em estudo:

3.2.2.1 Infravermelho (IV)

As amostras em estudo foram analisadas através de espectros infravermelhos, registrados em espectrofotômetro Bio-Rad modelo FTS 165, ajustado em faixa de 450 a 4000 cm^{-1} .

3.2.2.2 Ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) (RMN)

As amostras do produto foram analisadas em espectrofotômetros BRUKER, modelo Avance DPX-500, pertencente ao CENAUREMN, operando na frequência do ^1H a 500 MHz e do ^{13}C a 125 MHz. Para dissolução das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados pelos picos do hidrogênio (δ 7,27) e do carbono deuterado (δ 77,23) pertencentes às moléculas residuais não deuteradas do clorofórmio. Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão externo para os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C .

3.2.2.3 Espectrometria de massa (EC)

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro QP5050A da SHIMADZU, na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, com impacto eletrônico de 70 eV e/ou acoplado ao cromatógrafo gás-líquido modelo CG 17A, usando coluna capilar DB-1 (dimetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro externo e um filme de 0,25 μm , com gradiente de temperatura de 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$ de 100 a 300 $^\circ\text{C}$ e temperatura do injetor de 280 $^\circ\text{C}$.

3.2.2.4 Tensão superficial

A tensão superficial do produto (amostras) foi medida segundo a metodologia descrita por DU-NOUY (1919), a uma temperatura de 55 $^\circ\text{C}$.

3.2.2.5 Solubilidade

Foi testada a solubilidade do biosurfactante em vários solventes orgânicos (todos a 99 °GL): etanol, diclorometano, metanol, hexano, clorofórmio, acetona e a água.

Todos os solventes orgânicos empregados na síntese do biosurfactante foram manipulados a temperatura de 28 °C sendo que, a água foi manipulada a mesma temperatura, 28 °C e a 55 °C.

3.2.2.6 Rendimentos

Os rendimentos foram observados de acordo com os seguintes tempos de reação de esterificação em shaker: 48, 72, 96 e 120 horas, todos na temperatura de 55 °C numa rotação de 200 rpm.

3.2.3 Fluxograma das atividades de preparação das amostras

Utilizou-se o fluxograma que se segue, para a preparação das amostras do produto sintetizado:

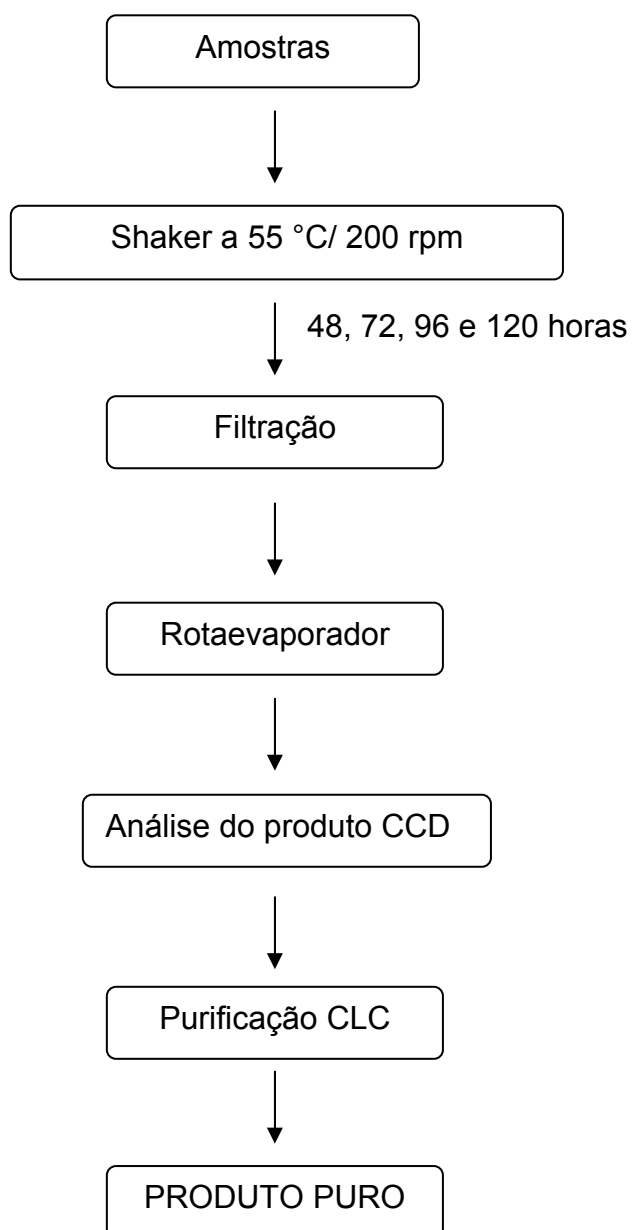


TABELA 5 - Leitura do RMN (^1H e ^{13}C)

	C	δC	δH
CH₃			
	18	14,06	0,85
	2'	14,29	1,25-1,32
CH₂			
	3	24,98	1,25-1,32
	8	27,16	1,61
	11	27,21	2,03
	4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16	22,67; 28,97- 29,75	1,25-1,32
	17	31,9	1,32
	2	34,38	2,29
	1'	60,13	4,13
CH			
	9	129,74	5,36
	10	129,98	5,36
C=O			
	1	173,85	

Com base nas informações fornecidas pelos espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) (FIGURA 6), podemos dizer que o produto se trata do éster oleato de etila.

4.3 Espectrometria de massa (EC)

Foi constatado, através do espectro de massa (ANEXO O) que, o produto resultante da nossa esterificação (oleato de etila) tem massa 310 g.

4.4 Tensão superficial

Uma das características mais importantes de um surfactante é sua capacidade em reduzir a tensão superficial. O éster preparado neste estudo reduziu a tensão superficial da água de 72,5 para 49 dynes cm^{-1} . A concentração de éster utilizado no experimento foi de 30 % a uma temperatura de 55 °C, devido sua baixa solubilidade em água.

De acordo com DUCRET *et al.* (1996), a redução da superfície da água poderia reduzir a tensão superficial por até 38,3 dynes cm^{-1} , dado esse, não compatível ao resultado encontrado em nosso estudo.

4.5 Solubilidade

Foi testada a solubilidade do oleato de etila em diversos solventes orgânicos.

TABELA 6 – Resultados das solubilidades do produto em diversos reagentes

REAGENTES	SOLUBILIDADE
1. Etanol (99 °GL) P.A.	solúvel
2. Diclorometano P.A.	solúvel
3. Metanol P.A.	solúvel
4. Hexano P.A.	solúvel
5. Clorofórmio P.A.	solúvel
6. Acetona P.A.	solúvel
7. Água (28 °C)	insolúvel
8. Água (55 °C)	parcialmente solúvel

De acordo com a TABELA 6, é possível observar que, o resultado encontrado na solubilidade dos reagentes, neste estudo, corresponde aos resultados encontrados por RAKMI & HERAWAN (2000), em seu estudo.

4.6 Rendimentos da síntese

Os rendimentos referentes à síntese dos ésteres de açúcares (frutose) com ácidos graxos (ácido oléico) utilizando catalisador bioquímico, foram observados de acordo com os seguintes tempos de reações em shaker: 48, 72, 96 e 120 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

TABELA 7 – Porcentagens correspondentes aos rendimentos de acordo com o tempo

TEMPO (horas)	PRODUTO %
48	4,03
72	5,08
96	7,82
120	2,18

De acordo com os resultados encontrados podemos observar que, o maior rendimento foi encontrado no tempo de 96 horas. No tempo de 120 horas os resultados se mostraram inferiores neste estudo. Como influência nessa expressiva redução de rendimentos no tempo de 120 horas, temos a interferência da água que, desloca a reação no sentido dos reagentes e não dos produtos.

Para tanto, devemos salientar que os rendimentos de produto ainda são muitos baixos, de acordo com a literatura que, relata valores entre 30 a 40 %, valores esses bastante expressivos com relação ao nosso rendimento maior 7,82 no tempo de 96 horas.

4.7 Discussão dos produtos

4.7.1 Éster de frutose (biosurfactante)

Para que haja esterificação é preciso utilizar como reagentes um álcool (frutose) e um ácido (ácido oléico) para produção de éster (éster de frutose). Para tanto, na reação de síntese, o biocatalizador (enzima) utilizou o meio reacional (etanol) na função álcool em vez da frutose. E, dessa maneira, o produto obtido foi o éster oleato de etila e não o éster de frutose.

No entanto, vale ressaltar que a reação de esterificação para produção de ésteres de açúcares totalmente biodegradáveis, de acordo com a literatura, pode acontecer sendo que, precisa-se de estudos mais detalhados para concretização dos objetivos.

Vale ressaltar que, estes experimentos foram realizados em meio etanol, que é inédito, pois os meios reacionais, de acordo com estudos anteriores, são solventes destinados a outros fins que não sejam alimentícios ou realizando reações com ácidos metilados.

O éster de frutose ou biosurfactante é empregado em produtos com aplicações alimentícias, reduzindo a tensão interfacial do meio, promovendo a homogeneização de misturas (emulsificação) em diversos alimentos, tais como: leite de coco, sorvetes, sucos, etc.

4.7.2 Oleato de etila

O éster oleato de etila foi obtido através da esterificação do ácido oléico com álcool etílico, utilizando-se para a reação um catalisador bioquímico (enzima lipolítica), como dito anteriormente. As características físicas observadas foram: líquido límpido e incolor de caráter lipofílico.

Diversas são as aplicações do oleato de etila. Tem propriedades repelentes à água sendo um eficiente lubrificante e emoliente como o palmitato de isopropila, miristrato de isopropila ou outros ésteres como o oleato de pentaeritritol, oleato de propilenoglicol e etc.

Na indústria de alimentos tem aplicação na desidratação osmótica de tomates e pimentas do tipo “dedo de moça”, facilitando a perda de água, ganho de açúcar e cor mais luminosa dos tomates e pimentas (remove a camada de cera das pimentas) e, além disso, esse processo não deixa nenhum tipo de resíduo químico, diminui o tempo de secagem aumentando sua eficiência.

Vale ressaltar que, estudos estão sendo aprofundados para que se possa ter novas aplicações deste produto em diversos setores da indústria (alimentício, farmacêutico, cosmético, etc).

5 CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos é possível concluir que:

A – Éster de frutose ou biosurfactante:

Foi constatado que, o ácido oléico interagiu com o etanol através do catalisador empregado (enzima lipolítica) e não com a frutose, como esperado. Com isto, o produto obtido foi o oleato de etila e não o biosurfactante.

Os ésteres de frutose são empregados em produtos com aplicações alimentícias, reduzindo a tensão interfacial do meio, promovendo a homogeneização de misturas (emulsificação) em diversos alimentos, tais como: leite de coco, sorvetes, sucos, etc.

B – Oleato de etila:

Características físicas: líquido límpido e incolor de caráter lipofílico.

O maior rendimento foi encontrado no tempo de 96 horas que, ainda é baixo conforme a literatura. No entanto, para o tempo de 120 horas os resultados se mostraram inferiores devido à influência da água na reação de esterificação. Para tanto, é preciso que essa nova tecnologia seja melhor estudada, para que se possa otimizar ainda mais o processo.

O oleato de etila tem propriedades repelentes à água sendo um eficiente lubrificante e emoliente como o palmitato de isopropila, miristrato de isopropila e etc.

Na indústria de alimentos tem aplicação na desidratação osmótica de tomates e pimentas do tipo “dedo de moça”, facilitando a perda de água, ganho de açúcar e cor mais luminosa dos tomates e pimentas e, além disso, esse processo não deixa nenhum tipo de resíduo químico, diminui o tempo de secagem aumentando sua eficiência.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed. New York: Wiley-Interscience, 1997.

AHMED, J. I. Trans-fixed. **Food Science Technology Today**, v. 9, n. 4, p. 228-231, 1995.

AIRES-BARROS, M. R. **Biocatálise em solventes orgânicos**. Boletim de Biotecnologia, n. 72, p. 2-12, 2002.

AKGÜN, S.; ERTEL, N. H. The effects of sucrose, fructose, and high-fructose corn syrup meals on plasma glucose and insulin in non-insulin-dependent diabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 8, p. 279-283, 1985.

AKPINAR, E.K.; BICER, Y.; YILDIZ, C. Thin layer drying of red pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 99-104, 2002.

ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682). Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS (AACE). The American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for the Management of Diabetes Mellitus: The AACE system of intensive diabetes self-management - 2002 up date. **Endocr. Pract.**; v. 8, Suppl. 1, p. 40-82, 2002.

AMFEP. **Association of Manufacturers of Fermentation Enzyme Products**. 2004. Disponível em: < www.amfep.org >. Acesso em: 01 jul. 2006.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.

ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 52, n. 2, p. 149-156, 1991.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and use in microbial enhanced oil recovery and pollution remediation: a review, **Bioresource Technol.**, v. 51, p. 1-12, 1995.

_____. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur.**, n. 198, p. 44-47, 2000.

_____; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

_____; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in the oil tank clean-up. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, n. 7, p. 80-88, 1991.

BARNICKEL, P.; A. WOKAUN; W. SAGER *et al.* Sized tailoring of silver colloids by reduction in W/ O microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 148, p.80-90, 1992.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev Nutr.**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BERTSCH, H.; PUSCHEL, F.; ULSPERGER, E. Manufacture and. Uses of Fatty Acid Sugar Esters. **Tenside**, v. 2, n. 12, p. 397-404, 1965.

BIER, M.; COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. Lipases, in *Methods in Enzymol.* **Academic Press**, v. 1, p. 627-642, 1955.

BLAKELY, S. T.; MISLO, B. L.; BASI, N. S. E.; PAINTER, R. H.. Dietary fructose alters the inulin-like effects of dietary vanadate in adipocytes from rats. **Nutr. Res.**, v. 15, p. 25-35, 1995.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbon. **Colloids and surfaces. A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BRADY, L.; BROZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767-770, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Decreto n. 55.871 de 26 de março de 1965, que modifica o Decreto n 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1965.

_____. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 544, de 16 de novembro de 1998, que fixa os padrões de identidade e qualidade, para refresco, refrigerante, preparado ou concentrado líquido para refresco ou refrigerante, preparado sólido para refresco, xarope e chá pronto para o consumo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1998.

BROCKMAN, H. L.; BORGSTROM, B. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: **Lipases**, p. 3-47. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984.

BROWN, M. J. Biosurfactants for cosmetic applications. **Int. J. Cosmetic Sci.**, v. 13, p. 61-64, 1991.

CABRAL, J. M. S.; MOTA, M.; TRAMPER, J. **Principles of Multiphase Bioreactor Design**. London: Taylor and Francis Books, 2001. 528p.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactants have to compete with surfactants of petrochemical. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CAO, L.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHIMID, R. D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 279-285, 1999.

CARREA, G.; RIVA, S. Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents, **Chem. Int. Ed.** v. 39, n. 13, p. 2226-2254, 2000.

CASEY, J.; MACRAE, A. R. Biotechnology and the oleochemical industry. **Information**, n. 3, v. 2, p. 203-207, 1992.

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

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 11, n. 4, p. 949-954, 2001.

CHOPINEAU, J; McCAFFERTY, F. D.; THERISOD, M.; KLIBANOV, A. M. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium, **Biotechnology Bioeng**, v. 31, n. 3, p. 208-214, 1988.

CLARK, J. H.; BULLOCK, L.; FITZGERALD, J. F. Dietary fructose in the management of intractable diarrhea of infancy. **Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition**, v. 5, p. 81-86, 1986.

CLAUSS, J. Interesterificação de óleo de palma. **Óleos & Grãos**, v. 5, p. 31-37, 1996.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica* **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p. 747-750, 1984.

COARSE, J. F.; CARDONI, A. A. Use of fructose in the treatment of acute alcoholic intoxication. **Am J Hosp Pharm.**, v. 32, n. 5, p. 518-519, 1975.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

COSTA, S. A.; CORTEZ, E. V.; CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da síntese do butirato de citronila por via química e via enzimática. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: COBEQ, p. 81-84, 1995.

COULON, D.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; GHOU, M. Comparison of direct esterification and transesterification of fructose by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 183-186, 1995.

CRUZ, V. D.; BELOTE, J. G.; BELLINE, M. Z.; CRUZ, R. Production and action pattern of inulinase from *Aspergillus niger*-245: Hydrolysis of inulin from several sources. **Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 301-306, 1998.

DAVIES, P. M.; SMMONDS, H. A.; SINGER, B.; MANT, T. G.; ALLEN, E. M.; VASSOS, A. B. Plasma uridine as well as uric acid is elevated following fructose loading. **Adv Exp Med Biol.**, v. 431, p. 31-35, 1998.

DAZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VELLEUR, R.; LEPINS, F.; BISAILLON, J. G. Biosurfactant Production by a Soil Pseudomonas Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1908-1912, 1996.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial Potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**; KOSARIC, N. New York: Marcel Decker, 1993.

DIAS, M. O. S.; TSUKAMOTO, J.; FRANCO, T. T. Síntese de acrilatos de açúcares por biocatálise. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Campinas, SP. **Resumos...** Campinas: COBEQ, p. 01-06, 2005.

DOYLE, M.P.; MUNGALL, W.S. **Experimental Organic Chemistry** - A one-year introductory laboratory manual for organic chemistry. New York: John Wiley & Sons, 1980. 901 p.

DOYMAZ, I. Air-drying characteristics of tomatoes. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1291-1297, 2007.

DOYMAZ, I. Influence of pretreatment solution on the drying of sour cherry. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 591-596, 2007a.

DOYMAZ, I.; PALA, M. Hot-air drying characteristics of red pepper. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 331-335, 2002.

DU-NOUY, P. L. A New Apparatus for Measuring Surface Tension. **J. Gen. Physiol.**, v. 1, p. 521-524, 1919.

DUCRET, A.; GIROUX, A.; TRANI, M.; LORTIE, R. Enzymatic preparation of biosurfactant sugars or sugar alcohols and fatty acids in organic media under reduced pressure. **Biotech. And Bioeng.**, v. 48, p. 214-221, 1995.

DUCRET, A, GIROUX, A, TRANI, M.; LORTIE, R. Characterization of enzymatically prepared biosurfactants. **J. Am. Oil Chem. sot.**, v. 73, n. 1, p. 109-113, 1996.

ERGÜNES, G. ;TARHAN, S. Color retention of red peppers by chemical pretreatments during greenhouse and open sun drying. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 446–452, 2006.

EYCHENNE, V.; MOULOUGUI, Z. Relationships between structure and lubricating properties of neopentylpolyol esters, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 12, p. 4835-4843, 1998.

FABER, K. In: **Biotransformations in Organic Chemistry**. 3 ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 1997. 234 p.

FERNANDES, P.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. **Biocatálise Aplicada em Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações** (N-Lima e M.Mota, eds.), LIDEL-Edições Técnicas LDA, Cap. 10, 2001.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzimol.**, v. 284, p. 327-347, 1997.

FEUGE, R. O.; ZERINGUE, H. J.; WEISS, T. J.; BROWN, M. Preparation of sucrose esters by interesterification. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 47, p. 56-60, 1970.

FLASZ, A.; ROCHA, C. A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Med. Sci. Res.**, v. 26, n. 3, p. 181-185, 1998.

FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 237-246, 1991.

FUGANTI, C.; ZUCCHI, G.; Product distribution in the microbial biogeneration of raspberry ketone from 4-hydroxybenzalacetone. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 4, n. 5, p. 289-293, 1998.

GANDHI, N. N. Applications of Lipase. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 74, n. 27, p. 621-634, 1997.

GATFIELD, I. L. **Food Science and Technology Today**, v. 9, n. 2, p. 237, 1995.

GE, Y.; ZHOU, H.; KONG, W.; TONG, Y.; WANG, S.; LI, W. Immobilization of glucose isomerase and its application in continuous production of high fructose syrup. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 69, p. 203-215, 1998.

GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. C. Lipid shortening: A review. **Food Res. Int.**, n. 35, p. 1015-1048, 2002.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**. New York: Stockton Press., 1996. 609 p.

GONÇALVES, L. A. G. **Revista Óleos & Grãos**, v. 5, n. 30, p. 27-30, 1996.

GRAMPONE, M. A. Propriedades dos óleos vegetais modificados por hidrogenação, interesterificação e fracionamento. **Revista Óleos & Grãos**, n. 15, p. 5-9, 1993.

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

GUNSTONE, F. Fatty acids-nomenclature, structure, isolation and structure determination, biosynthesis and chemical synthesis. In **fatty acid and lipid chemistry**. Aspen Publisher, Gaithersburg, MD, 1999. 252 p.

GUPTA, R. K.; JAMES, K.; SMITH, F. J. Sucrose esters and sucrose ester/glyceride blends as emulsifiers. **J. Am. Oil Chem.**, v. 60, p. 862-869, 1983.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. In: **Lipid Biochemistry: An Introduction**. 4 ed., p. 162-243. London: Chapman & Hall, 1996.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J.**, v. 4, n. 9, p. 2652-2660, 1990.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. In: **Food Biotechnology**; KLING, R. D.; CHEETHAM, P. S. J., v. 2, p. 173-217. UK: Elsevier Publishers Limited, 1988.
HARWOOD, J. The versatility of lipases for industrial uses. **TIBS**, v. 14, p. 125 -126, 1989.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, in press, 2006.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents., **Biochim. Biophys. Acta**, v. 415, p. 29-79, 1975.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 243-248, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares. 1996. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 16 de ago. 2006.

JACK, T. R. Microbially Enhanced Oil. **Recovery Biorecovery**, v. 1, p. 59-73, 1988.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 13, p. 390-397, 2002.

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

JAEGER, K. E.; RANSAK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. FEMS. **Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M.; CLARK, J.B.; FEERO, J. M.; REVUS, D. E.; MENZIE, D. E. A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. **Developments in industrial microbiology**, v. 24, p. 485-492, 1983.

JONES, J. B.. Enzyme inorganic synthesis. **Tetrahedron**, v. 42, p. 3351- 3403, 1986.

KAMEL, B.S. Emulsifiers. In: SMITH, J. (Ed.). **Foods additive user's handbook**, London: Blackie. Cap. 8, p. 169-201, 1997.

KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. **J. Bacteriol.**, v. 131, n. 3, p. 917-921, 1977.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W.R. Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707-712, 1979.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, p. 116-126, 1999.

KARLESKIND, A. Oils and Fats: Manual. **Lavoisier Publishing: Paris**, v. 2, p. 1432-1572, 1996.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. In: **A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology**. REHM, H. J.; STADER, P., eds.; v. 8A, p. 38, 1998.

KHALED, N.; MONTET, D.; FARINES, M.; PINA, M.; GRAILLE, J. Syntheses de mono-esters de sucre par biocatalyse. **Oleagineux**, v. 47, n. 4, p. 181-189, 1992.

KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanisms of microbial enhanced oil recovery. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 170-172, 1994.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. **Biosurfactants and biotechnology. Surfactant science series**. Cap. 11. New York: Marcel Decker, 1987.

KOVÁCS, E.; VÁMOS-KARDOS, E.; KISS-LASZLAVIK, M.; PALLAGI, E. Effect of emulsifiers on the properties of pasta products. **Acta Alimentaria**, v. 21, n. 3-4, p. 205-217, 1992.

LANG, S.; WAGNER, F. **Biosurfactants: production, properties, applications**; KOSARIC, N. Cap. 8. New York: Marcel Decker, 1993.

LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Lipase catalyzed formation of flavour esters. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 8, p. 549-554, 1988.

LIMA, J. R.; NASSU, R. T. Substitutos de gorduras em alimentos: características e aplicações. **Quim. Nova**, v. 19, n. 2, p. 127-134, 1996.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed., v. 3, p. 351-412. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001.

LIN, S. C. Biosurfactants: recent advances. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. **Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho**. Instituto de Química, UFB. 2004.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.

MACRAE, A. R.; AMUNDSON, C. H. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 9, p. 193-217, 1985.

MADSEN, T.; PETERSEN, G.; SCIERO, C.; TORSLOV, J. Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol atoxylate. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 73, n. 7, p. 929-933, 1996.

MALTA, O.; GUIMARÃES, A.P. Açúcar. In: **Enciclopédia Mirador Internacional**. HOUAIS, A. Rio de Janeiro: Encyclopaedia Britannica do Brasil Publicações, p. 93-97, 1976.

MARGOLIN, A. L. Enzymes: Use them. **Chem. tech**, v. 21, n. 3, p. 160-167, 1991.

MARTINELLI, U. A. **Ésteres de ácidos graxos de sacarose com atividade interfacial. Seu emprego na tecnologia farmacêutica e sua influência sobre diversos veículos**. 1977. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1977.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica*** IMUFRJ 50682. Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATTHEWS, R.H.; PEHRSSON, P.R.; FARHAT-SABET, M. Sugar content of selected foods: Individuals and total sugars. In: Home Economics Research Report. Washington (DC): **Hum Nutr Information Service**, v. 48, p. 3-14, 1987.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 65, p. 927-931, 1988.

MILLER, R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. **Environ. Health Persp.**, v. 103, p. 59-62, 1995.

MIRISTRATO de isopropila. **ABOISSA**. Disponível em:<<http://www.aboissa.com.br/homecare/tmiristratoisopropila.htm>>. Acesso em: 29 mar. 2007.

MONTEIRO, C.A., MONDINI, I.; COSTA, R.B.L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 251-258, 2000.

MOSES, V. Microbiol. methods in oil recovery. **Microbiol. Sci.**, v. 10, n. 4, p. 304-309, 1987.

MOZAFFAR, Z.; WEETE, J.D.; DUTE, R. Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Pythium ultimum*. **J. Am. Oil Chem. Soc**, v. 71, n. 1, p. 75-79, 1994.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**. KOSARIC, N., cap.13. New York: Marcel Decker, 1993.

NELSON, K. Y.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier; 2000.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLEATO de etila. **Ethylis oleas**. Disponível em:<www.farmacopeia.org.br/downloads/pdf/6ed/oleato_de_etila.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2007.

OLSEN, H. S. Use of Enzymes in Food Processing in Biotechnology. In: REHM, H.J., REED, G. **Biotechnology**. 2. ed., Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, p. 663-736. 1995.

OSIPOW, L.; SNELL, F. D.; YORK, W. C.; FINCHLER, A. Methods of preparation fatty acid esters of sucrose. **Ind. Eng. Chem.**, v. 48, p. 1459-1462, 1956.

PACE, L. W. B. **Estudo da síntese de ésteres de poliglicóis utilizando lipases e esterases como biocatalisadores**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p. 119-131, 1999.

PARK, D.; HAAM, S.; AHN, I.; LEE, T.G.; KIM, H.; KIM, W. Enzymatic esterification of β -methylglucoside with acrylic/methacrylic acid in organic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 151-160, 2004.

PATEL, M. N.; GOPINATHAN, K. P. Lysozyme-Sensitive Bioemulsifier for Immiscible Organophosphorus Pesticides. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 52, n. 5, p. 1224-1226, 1986.

PESSOA, J.R.; VITOLO, M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, p. 237-245, 1999.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

POLMAN, J.K.; MILLER, K.S.; STONER, D.L.; BRACKENRIDG, C.R. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 61, n. 1, p. 11-17, 1994.

RAKMI, A. R.; HERAWAN, T.; OMAR, O. Preparation of biodegradable and vegetable based surfactant from sugar and palm fatty acid catalysed by *Mucormiehei* lipase. **Elaeis**, p. 100-110, 1997.

RAKMI, A. R.; HERAWAN, T. Properties of biosurfactant enzymatically prepared from fructose and palm fatty acid. **Journal of oil palm research**, v. 12, n. 1, p. 117-122, 2000.

RATTRAY, J. News fats and oils through biotechnology. **Inform.**, v. 1, p. 945-947, 1990.

REISER, J.; KOCH, A. K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. In: **Advances in Applied Biotechnology Series**; ORINGER, J. W.; TILLINGUEST, H. S. Cap. 3. London: Gulf Publishing Company, 1989.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z High and low molecular mass microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, Z. E. Production of biodispersant by *Acinetobacter calcoaceticum* A2. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 317-322, 1988.

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 37, n. 3, p. 402-408, 1979.

RUMESSEN, J. J. Fructose and related food carbohydrates. **Scand J. Gastroenterol.**, v. 27, n. 10, p. 819-828, 1992.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SARNEY, D.B.; FREGAPANE, G.; VULFSON, E.N. Lipase-catalyzed synthesis of lysophospholipids in a continuous bioreactor. **J.Am. Oil Chem. Soc.**, v. 71, n. 1, p. 93-96, 1994.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal microbiology methodology**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S. *et al.*, Industrial Biocatalysis Today and Tomorrow, **Nature**, v. 409, p. 258-268, 2000.

SCHRAG, J. D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, p. 761-764, 1991.

SHEPHORD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

SHI, J. X.; LE MAGUER, M.; WANG, S. L.; LIPTAY, A. Application of osmotic treatment in tomato processing-effect of skin treatments on mass transfer in osmotic dehydration of tomatoes. **Food Research International**, v. 30, p. 669-674, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 5 ed. New York: John Wiley & Sons: 1991.

SOLEWICK, E. Biotecnologia: Enzimas na síntese orgânica. **Informativo do INT**, v. 19, n. 40, p. 20-25, 1987.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, 7 ed., **Livros Técnicos e Científicos**. Rio de Janeiro: Editora S.A, 2001.

SPARKS, J.W. Galactose and fructose. In: POLIN R.A; FOX W. W. **Fetal and neonatal physiology**. Philadelphia: Saunders, p.384-390, 1992.

STANGUELLINI, M. E.; MILLER, R. M. Biosurfactants: Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. **Plant Disease**, v. 81, n. 1, p. 4-12, 1997.

STEINHART, M. R. Auxiliares Têxteis do Ponto de Vista dos. Tensoativos. **Revista Química Têxtil**, n. 61, p. 76-80, 2000.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, M. G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **Microbiol. Letters**, v. 128, n. 2, p. 101-106, 1995.

TIMMIS, K. N.; DEMAIN, A. L. Ecology and industrial microbiology. Strange bedfellows. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 267-270, 1998.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono-and di-succinoyl trehalose lipid by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, n. 3, p. 757-763, 1989.

US. **Code of Federal Regulations**. 21, 101. 22a.3, 1985.

VELRAEDS, M. C. M.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 8, n. 1-2, p. 51-61, 1996.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnol. Adv.**, n. 9, p. 241-252, 1991.

VATER, J. Lipopeptides, an Attractive Class of Microbial Surfactants, **Prog. Colloid Polymer Sci.** n. 72, p. 12-18, 1986.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal., B: Enzym.**, n. 9, p. 4-6, 2000.

VULFSON, E. N. In: **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**; WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. London: Cambridge University Press, 1994.

WANG, Y.M; VANEYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Ann Rev Nutr.** v. 1, p. 437-475, 1981.

WIKIPEDIA. **Ethyl oleate**. Disponível em:<http://en.wikipedia.org/wiki/Ethyl_oleate>. Acesso em: 30 mar. 2007.

WINKLER, F.K.; DARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v. 343, p. 771-774, 1990.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions. **Enzyme Microb. Technol.** n. 23, p. 438-450, 1998.

YAMANE, T. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 64, n. 12, p. 1657-1662, 1987.

YUTAKA, T.; KITAGAWA, M. Science and Technology of Polymers and Advanced Materials. **Plenum Press**, p.447, 1998.

ZAGO, E. C. **Biocatálise utilizando lipases microbianas**. In: 14° EVINCI - Evento de Iniciação Científica da UFPR, Curitiba, 2006.

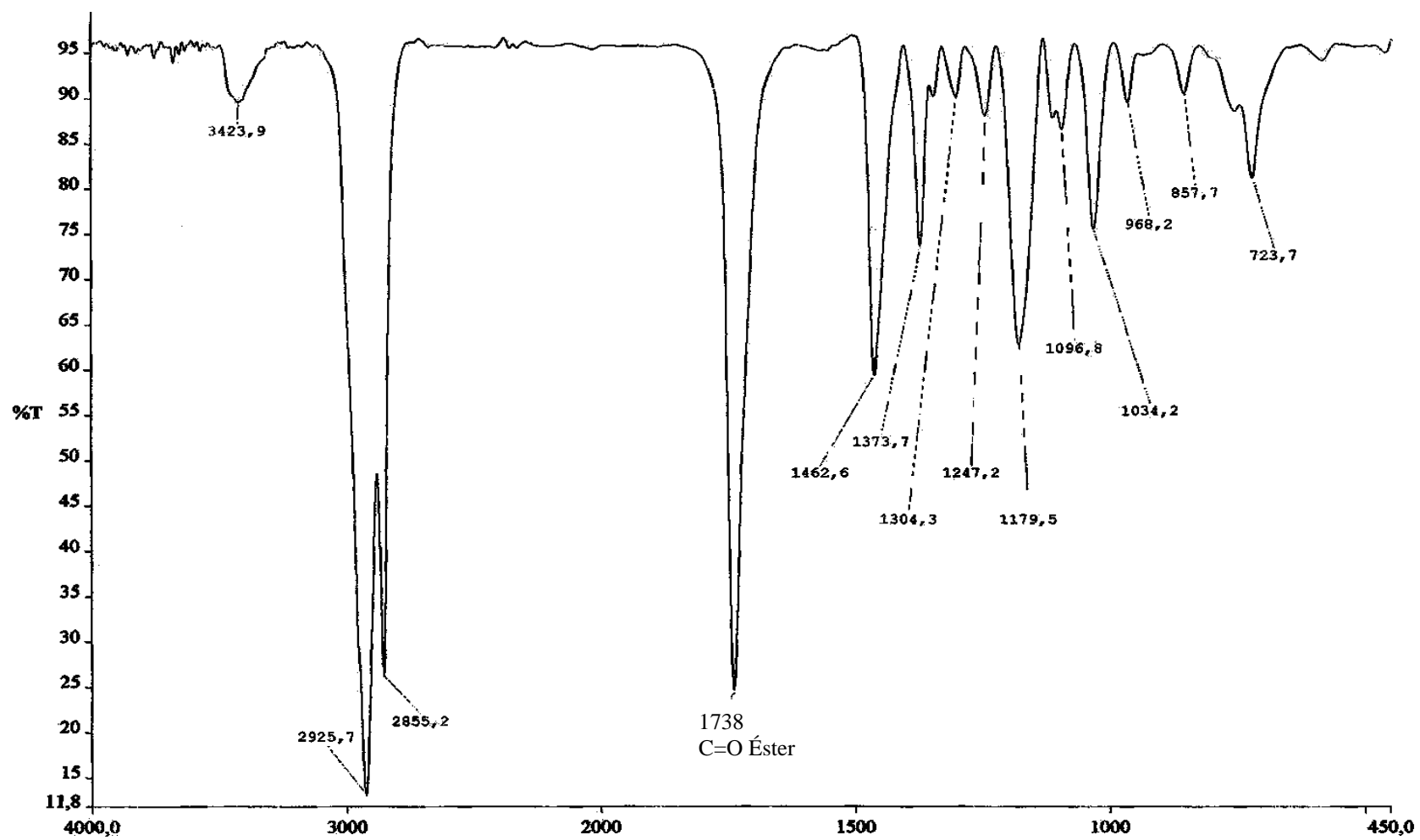
ZARKS, A; EMPIE, M.; GROSS, A. Potentially commercial enzymatic for the fine and specialty chemical industries. **Trends in Biotechnology**, p. 6272-6275, 1991.

ZHANG, X.; ADACHI, S.; WATANABE, Y.; KOBAYASHI, T.; MATSUNO, R. Prediction of the equilibrium conversion for the synthesis of acyl hexose through lipase-catalyzed condensation in water-miscible solvent in the presence of molecular sieve. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 293-297, 2003.

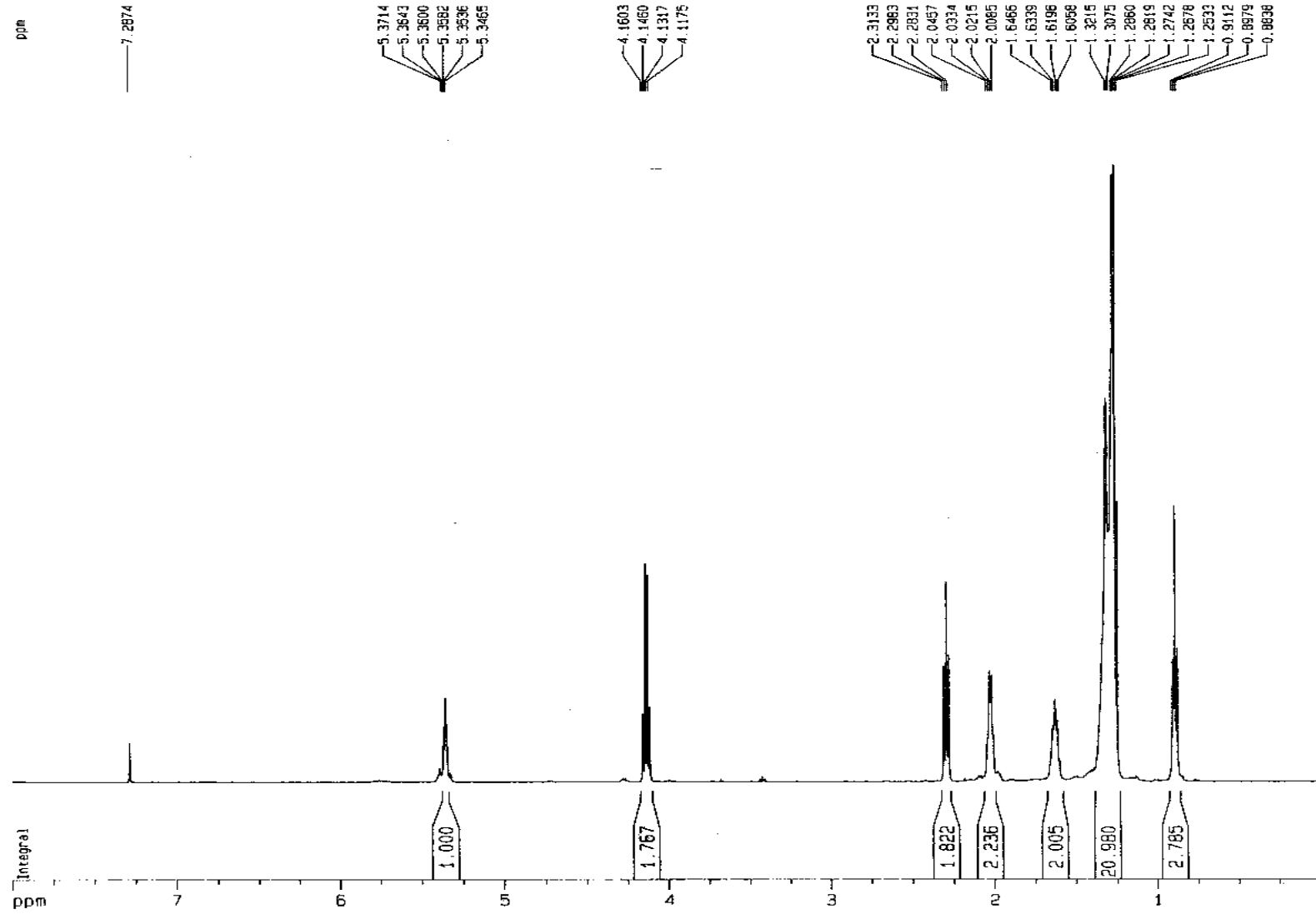
ZHANG, Y.; MAIER, W. J.; MILLER, R.M. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. **Environ. Sci. Technol.**, n. 31, p. 2211-2217, 1997.

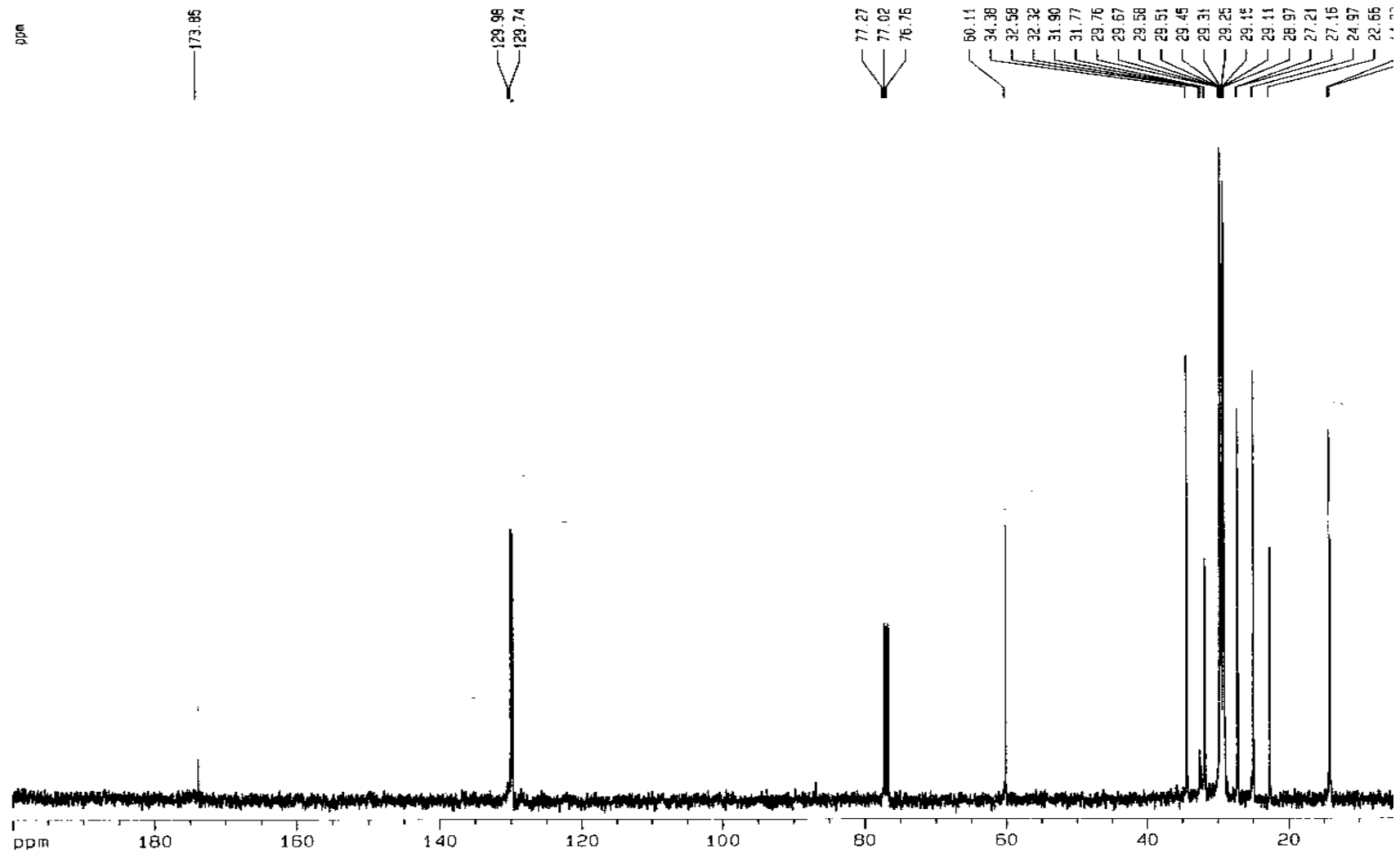
ANEXOS

ANEXO A – Infravermelho correspondente ao éster

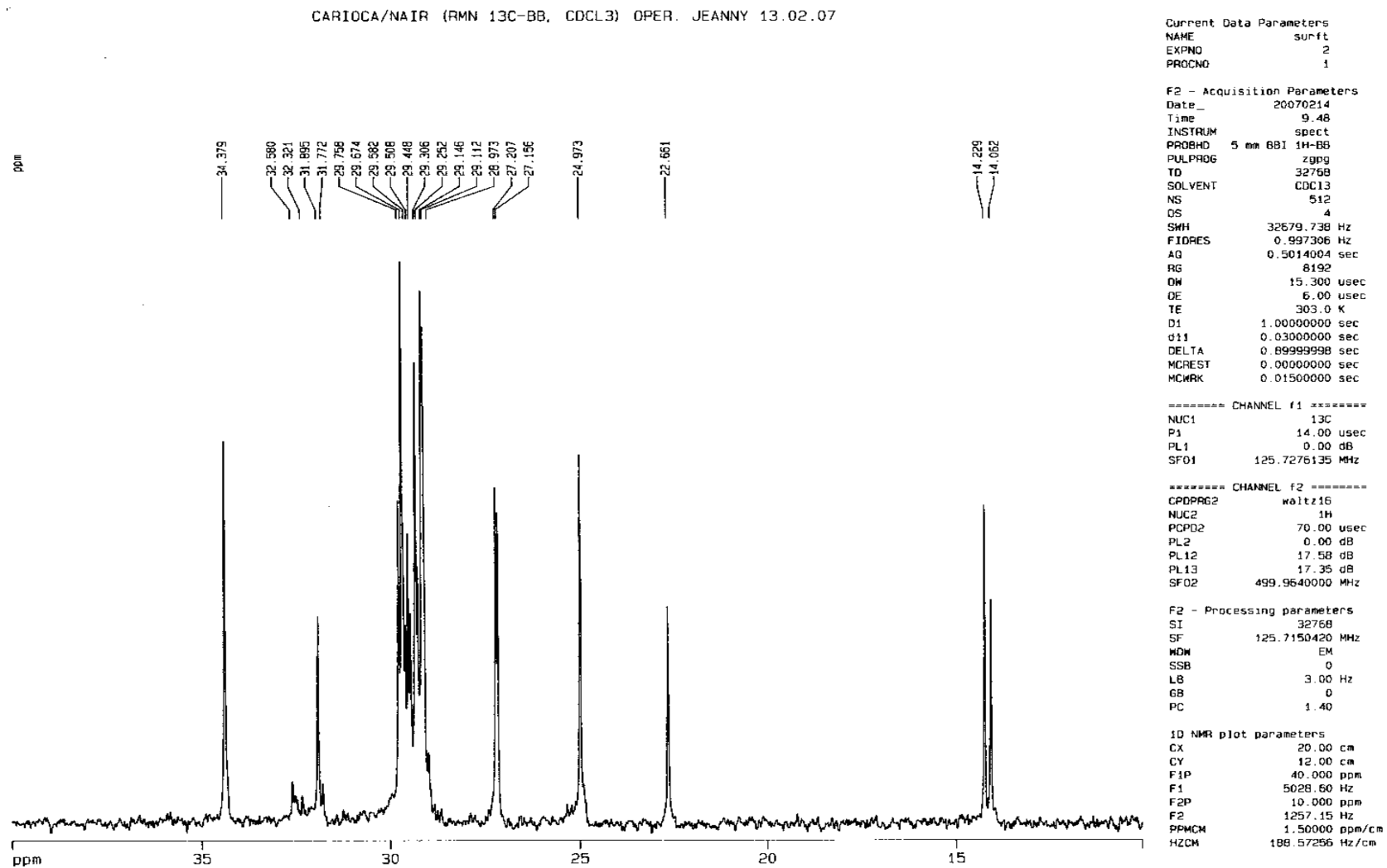


ANEXO B – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto

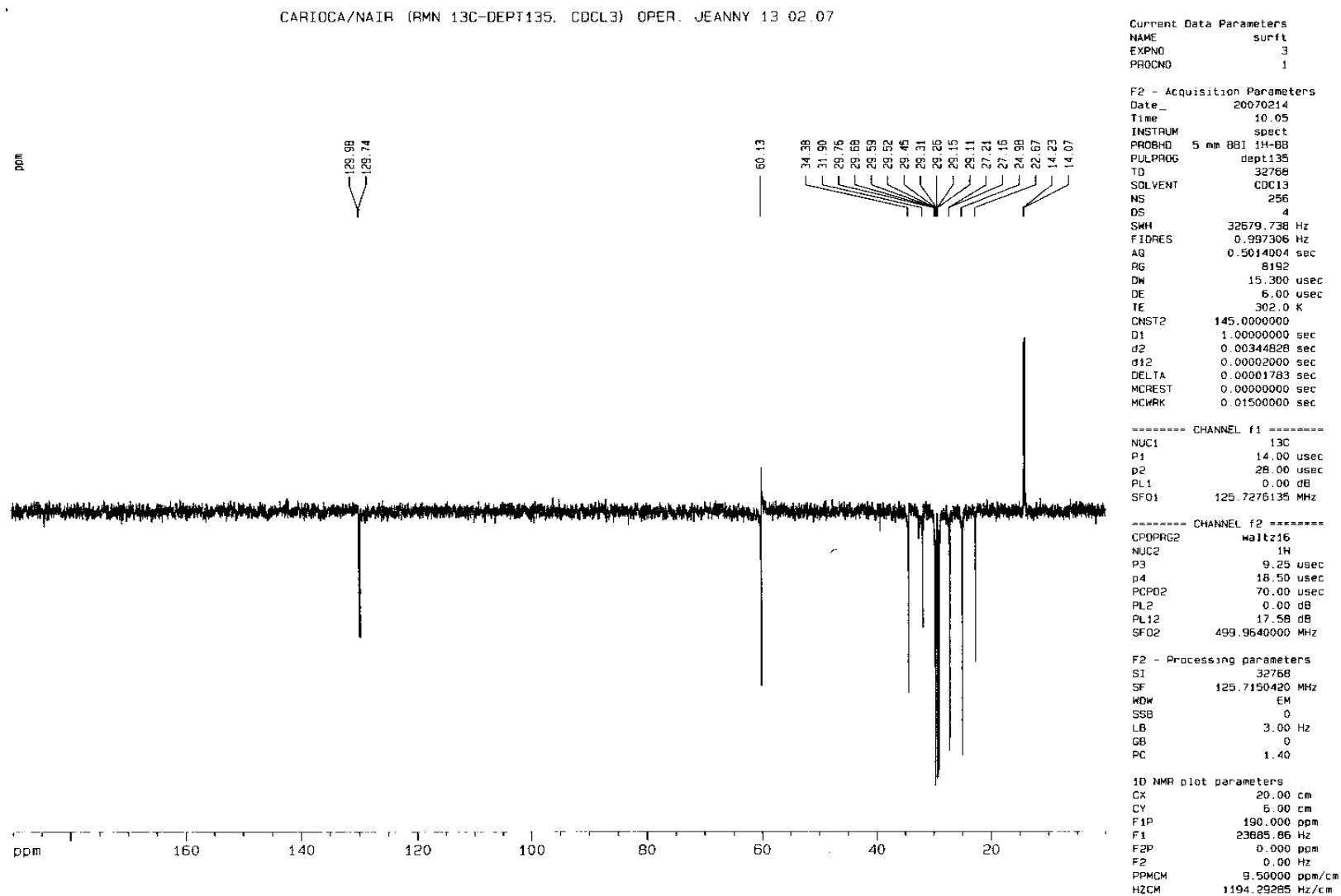


ANEXO C – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto

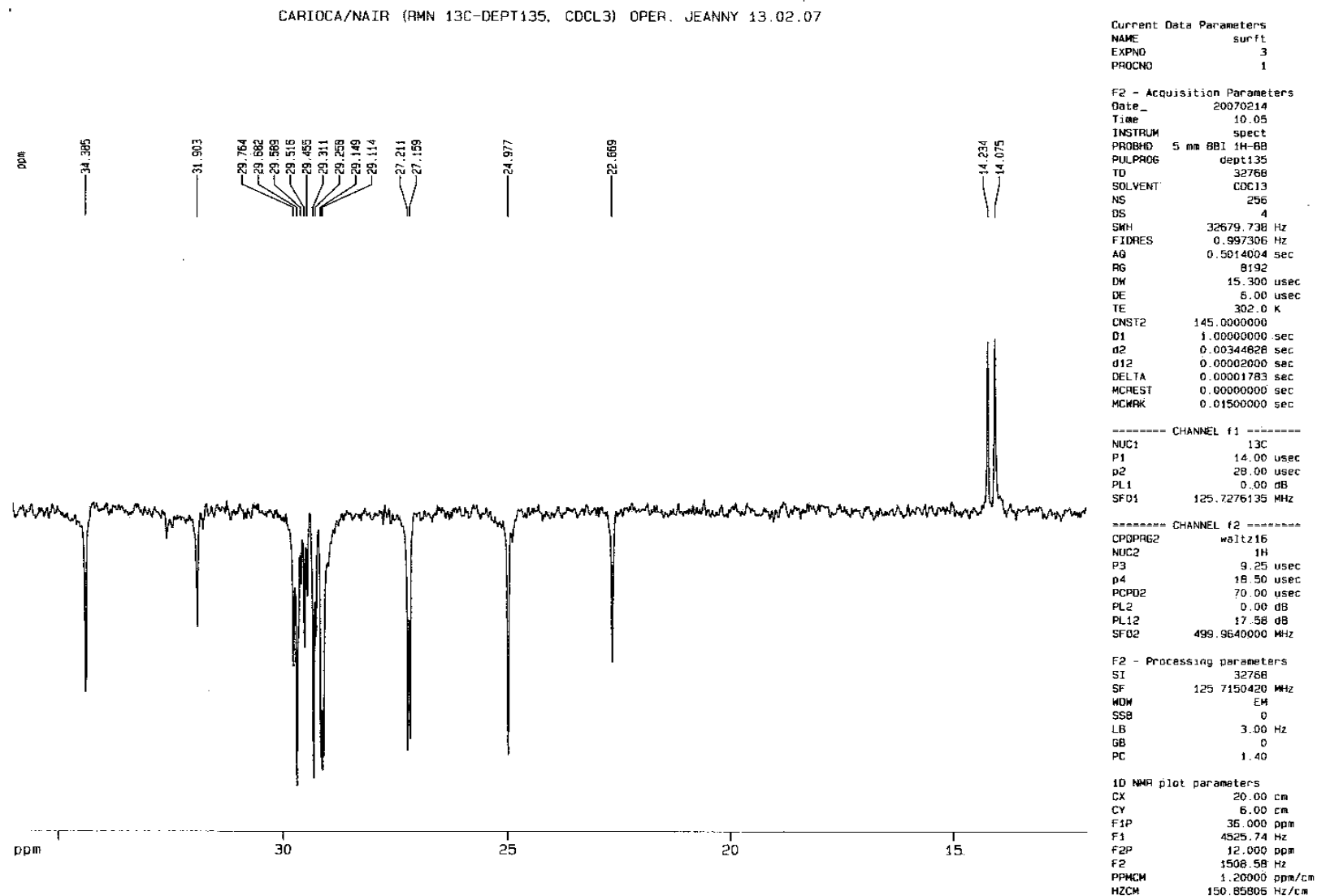
ANEXO D – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto



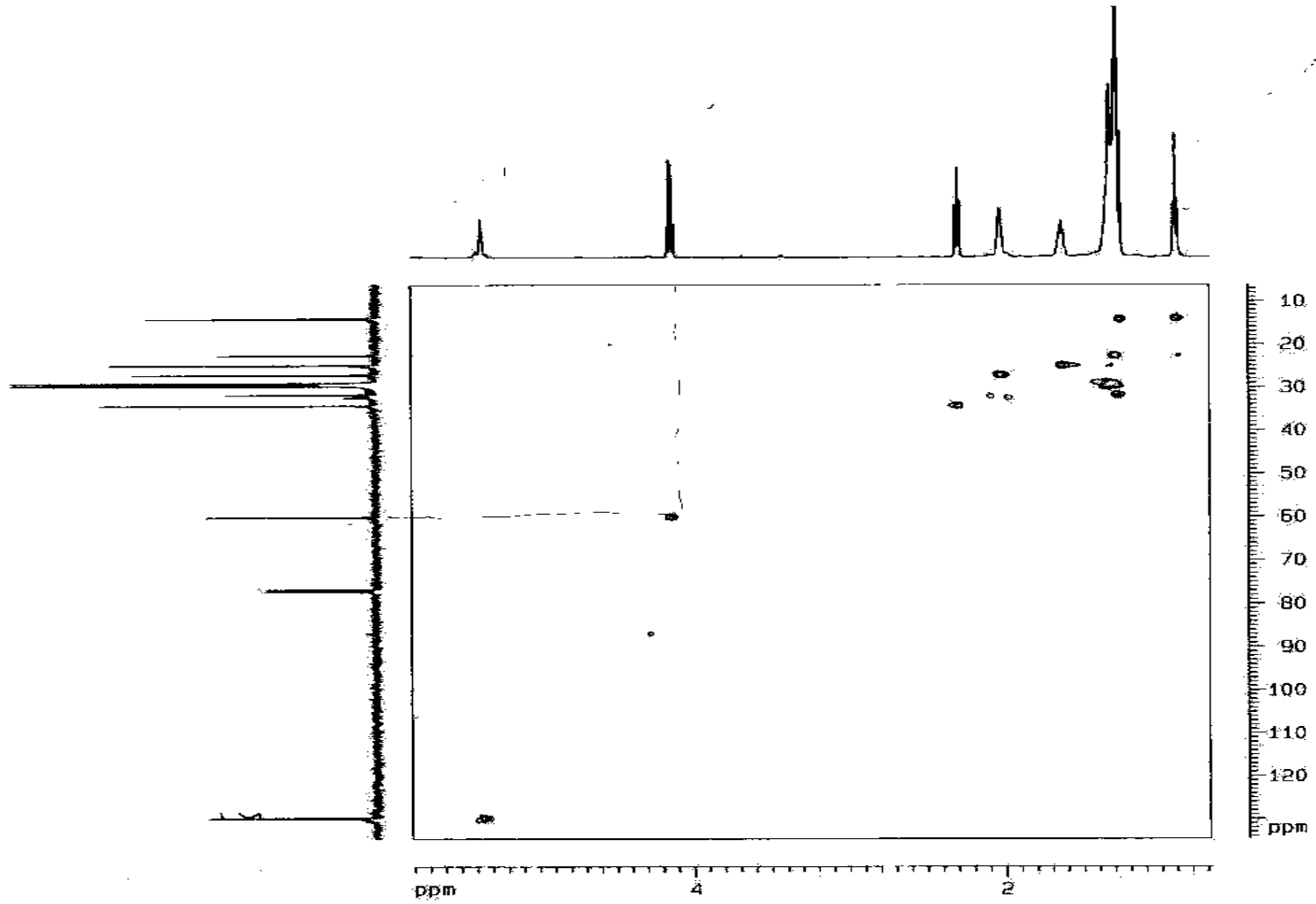
ANEXO E – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto



ANEXO F – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto

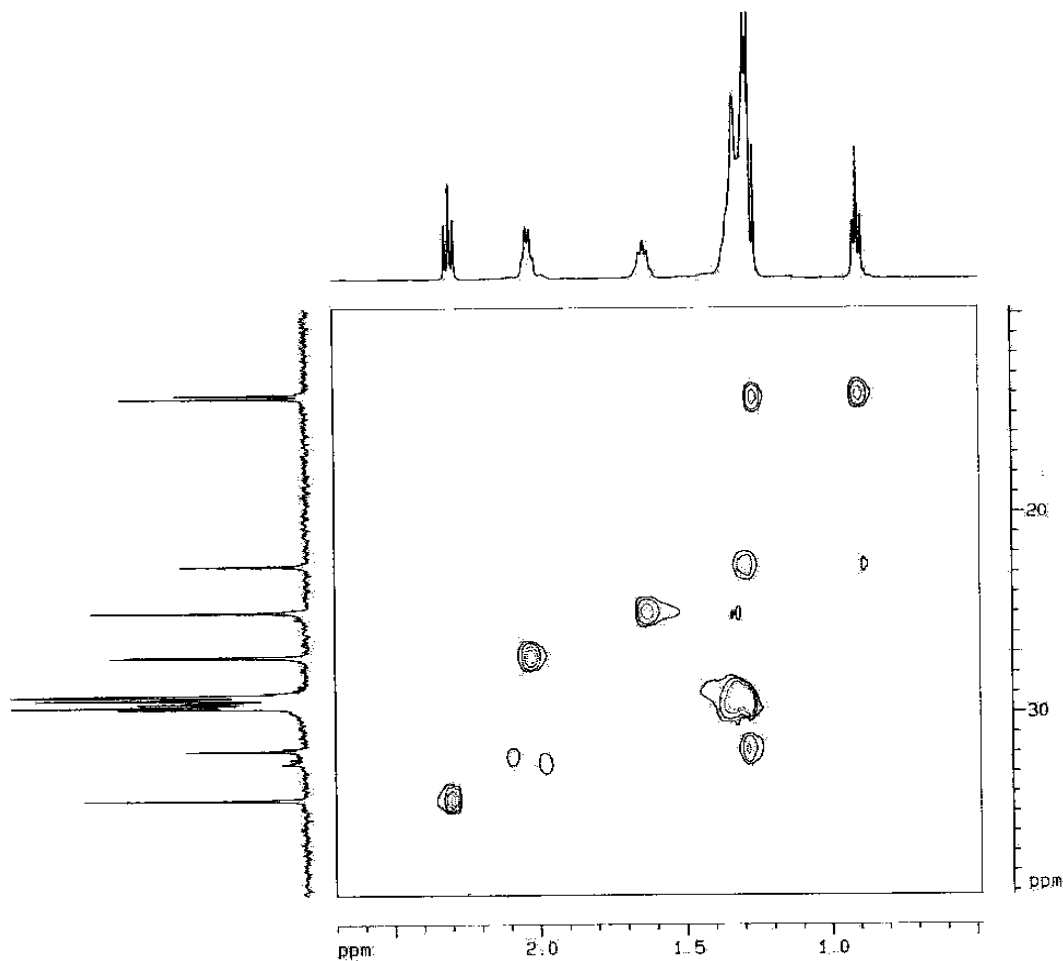


ANEXO H – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto



ANEXO I – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto

CARIDCA/NAIR (HSQC6PPH{1H, 13C}). CDCL3 OPER. JEANNY 13.02.07



```

Current Data Parameters
NAME      CARIDCA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20070214
Time     09:57
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H-13
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS       8
DS       4
SWH      16000.000 Hz
FIDRES   0.441900 Hz
AQ        0.220900 sec
RG        328.5
SR        120.000 MHz
SC        6.00 MHz
TE        303.2 K
ZDELTA   1.4500000 sec
DE      0.0000000 sec
DI      0.0000000 sec
SFO      0.0000000 sec
VSI      0.0000000 sec
SFL      0.0000000 sec
DELTA    0.0000000 sec
DELTA1   0.0050000 sec
DELTA2   0.0000000 sec
YD       0.0000000 sec
RGHRES   0.0000000 sec
RGHRES1  1.0000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
NUC1     13
P1        5.250000
PC        14.500000
PL1       0.00 dB
PR1       0.000000 dB

----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2  zgpg30
NUC2     13C
P2        14.000000
PC        28.000000
PL2       0.00 dB
PR2       0.000000 dB

----- CHANNEL CHANNEL -----
SFO      125.761000 MHz
NUC1     13C
P1        5.000000
PC        14.000000
PL1       0.00 dB
PR1       0.000000 dB
SFO      125.761000 MHz
NUC2     1H
P2        0.000000
PC        0.000000
PL2       0.00 dB
PR2       0.000000 dB

F1 - Acquisition Parameters
NAME      CARIDCA
EXPNO    2
PROCNO   1
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H-13
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS       8
DS       4
SWH      16000.000 Hz
FIDRES   0.441900 Hz
AQ        0.220900 sec
RG        328.5
SR        120.000 MHz
SC        6.00 MHz
TE        303.2 K
ZDELTA   1.4500000 sec
DE      0.0000000 sec
DI      0.0000000 sec
SFO      0.0000000 sec
VSI      0.0000000 sec
SFL      0.0000000 sec
DELTA    0.0000000 sec
DELTA1   0.0050000 sec
DELTA2   0.0000000 sec
YD       0.0000000 sec
RGHRES   0.0000000 sec
RGHRES1  1.0000000 sec

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      125.761000 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

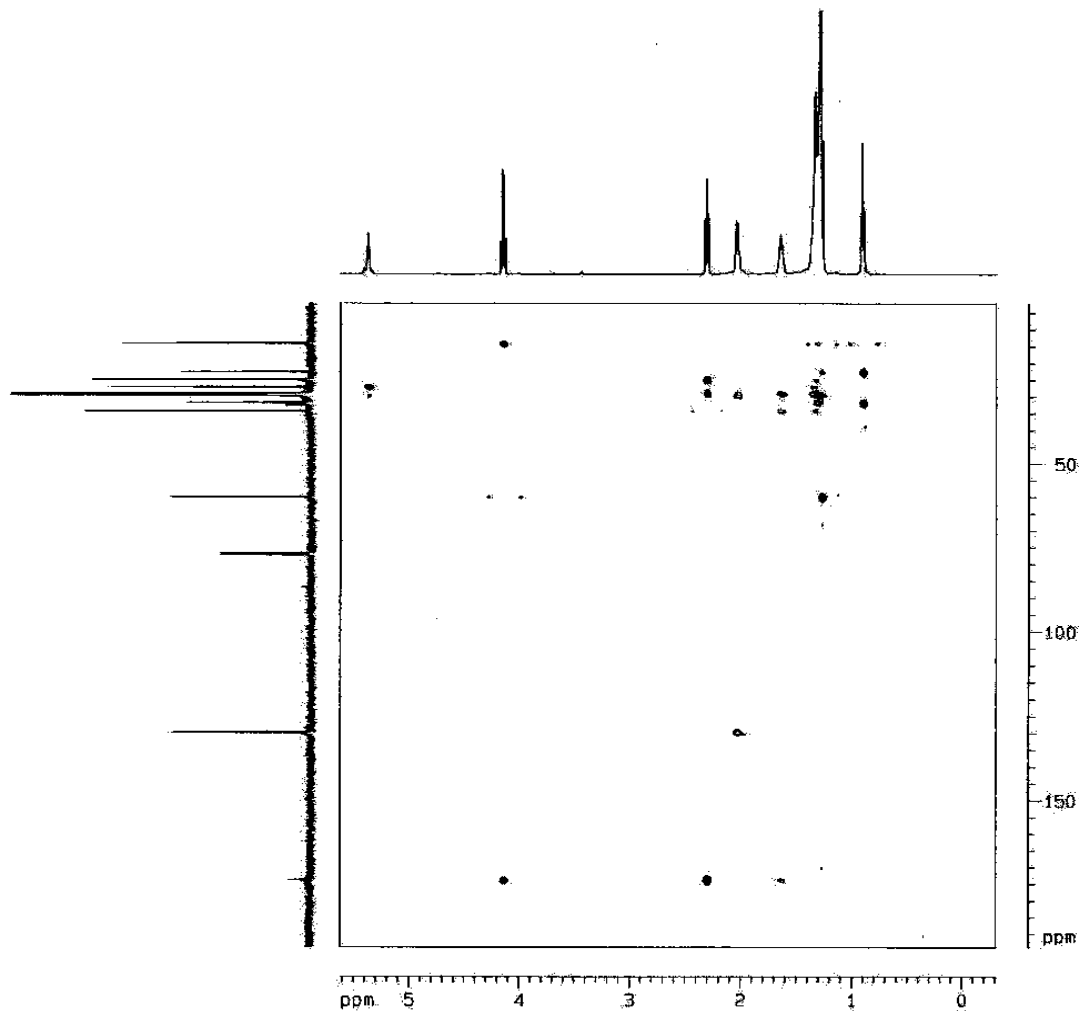
F1 - Processing parameters
SI      65536
SF      125.761000 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB       0.00 Hz
GB       0
PC       1.00

2D NMR Parameters
EXPNO   2
F2      125.761000 MHz
F1      125.761000 MHz
FIDRES  0.441900 MHz
SFO     125.761000 MHz
SFL     125.761000 MHz
P1      5.250000 MHz
P2      14.000000 MHz
PL1     0.000000 dB
PL2     0.000000 dB
PR1     0.000000 dB
PR2     0.000000 dB
PC      1.000000 MHz
PC2     1.000000 MHz
PC3     1.000000 MHz
PC4     1.000000 MHz
PC5     1.000000 MHz
PC6     1.000000 MHz
PC7     1.000000 MHz
PC8     1.000000 MHz
PC9     1.000000 MHz
PC10    1.000000 MHz
PC11    1.000000 MHz
PC12    1.000000 MHz
PC13    1.000000 MHz
PC14    1.000000 MHz
PC15    1.000000 MHz
PC16    1.000000 MHz
PC17    1.000000 MHz
PC18    1.000000 MHz
PC19    1.000000 MHz
PC20    1.000000 MHz
PC21    1.000000 MHz
PC22    1.000000 MHz
PC23    1.000000 MHz
PC24    1.000000 MHz
PC25    1.000000 MHz
PC26    1.000000 MHz
PC27    1.000000 MHz
PC28    1.000000 MHz
PC29    1.000000 MHz
PC30    1.000000 MHz
PC31    1.000000 MHz
PC32    1.000000 MHz
PC33    1.000000 MHz
PC34    1.000000 MHz
PC35    1.000000 MHz
PC36    1.000000 MHz
PC37    1.000000 MHz
PC38    1.000000 MHz
PC39    1.000000 MHz
PC40    1.000000 MHz
PC41    1.000000 MHz
PC42    1.000000 MHz
PC43    1.000000 MHz
PC44    1.000000 MHz
PC45    1.000000 MHz
PC46    1.000000 MHz
PC47    1.000000 MHz
PC48    1.000000 MHz
PC49    1.000000 MHz
PC50    1.000000 MHz
PC51    1.000000 MHz
PC52    1.000000 MHz
PC53    1.000000 MHz
PC54    1.000000 MHz
PC55    1.000000 MHz
PC56    1.000000 MHz
PC57    1.000000 MHz
PC58    1.000000 MHz
PC59    1.000000 MHz
PC60    1.000000 MHz
PC61    1.000000 MHz
PC62    1.000000 MHz
PC63    1.000000 MHz
PC64    1.000000 MHz
PC65    1.000000 MHz
PC66    1.000000 MHz
PC67    1.000000 MHz
PC68    1.000000 MHz
PC69    1.000000 MHz
PC70    1.000000 MHz
PC71    1.000000 MHz
PC72    1.000000 MHz
PC73    1.000000 MHz
PC74    1.000000 MHz
PC75    1.000000 MHz
PC76    1.000000 MHz
PC77    1.000000 MHz
PC78    1.000000 MHz
PC79    1.000000 MHz
PC80    1.000000 MHz
PC81    1.000000 MHz
PC82    1.000000 MHz
PC83    1.000000 MHz
PC84    1.000000 MHz
PC85    1.000000 MHz
PC86    1.000000 MHz
PC87    1.000000 MHz
PC88    1.000000 MHz
PC89    1.000000 MHz
PC90    1.000000 MHz
PC91    1.000000 MHz
PC92    1.000000 MHz
PC93    1.000000 MHz
PC94    1.000000 MHz
PC95    1.000000 MHz
PC96    1.000000 MHz
PC97    1.000000 MHz
PC98    1.000000 MHz
PC99    1.000000 MHz
PC100   1.000000 MHz

```

ANEXO J – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto

CARIOCA/NAIR (HMBC6PLPNOF [1H, 13C], CDCL3) OPER. JEANNY 13.02.0:

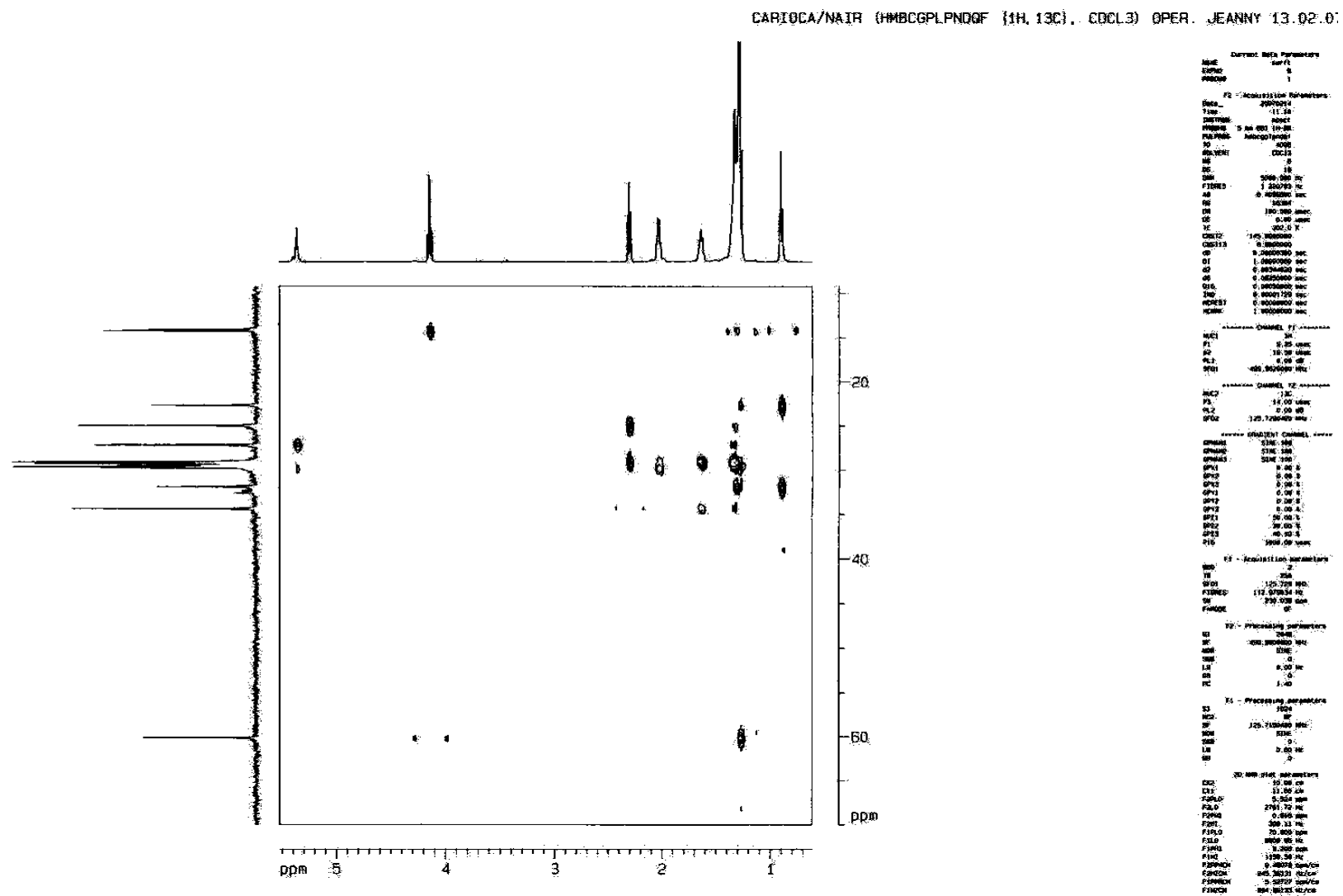


```

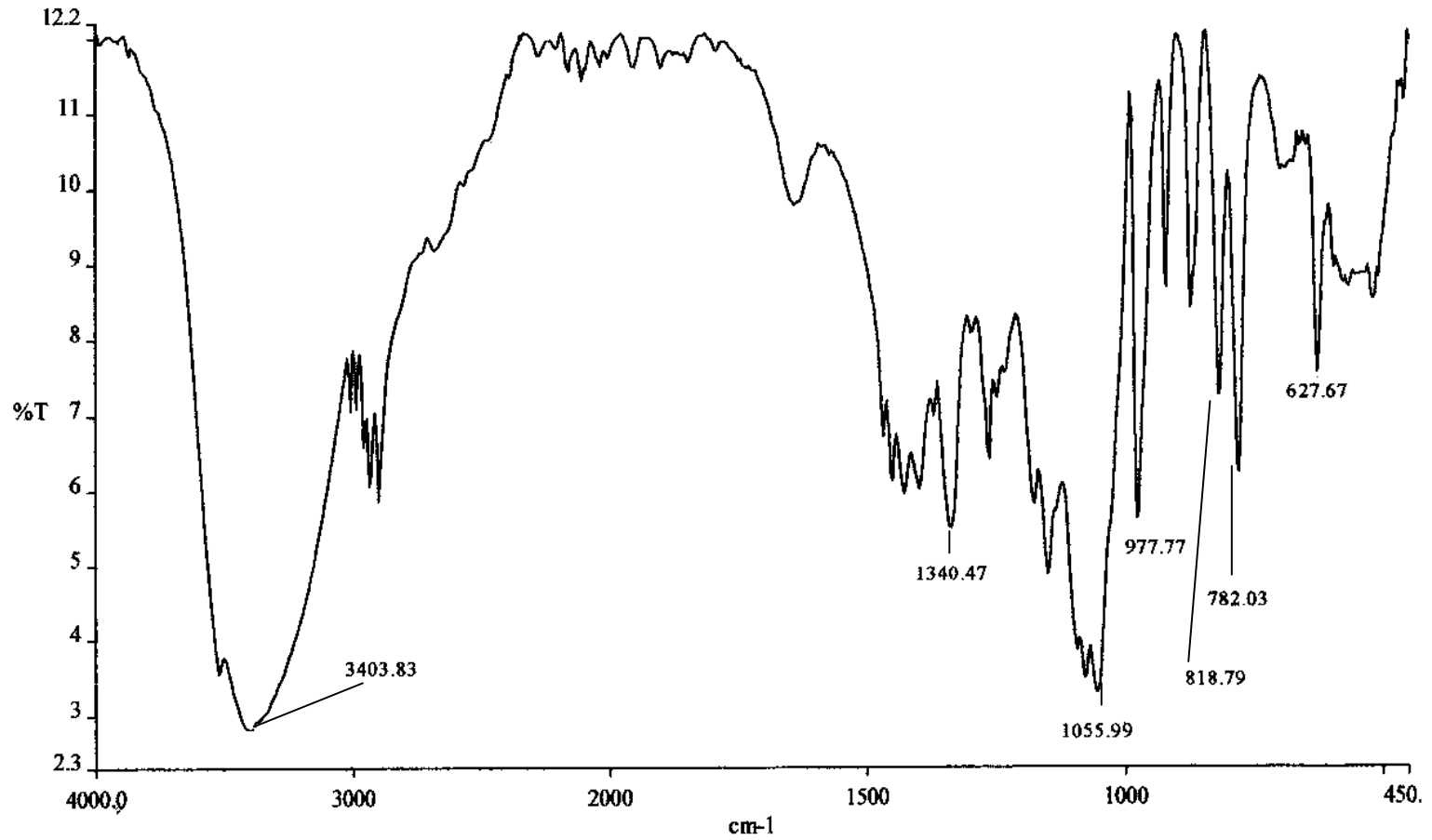
Current Data Parameters
NAME: CARIOCA
PROCNO: 2
=====
F2 - Acquisition Parameters
Date_: 20070414
Time: 11.58
INSTRUM: spect
PULPROG: zgpg30
AQ: 5.0000000 sec
RG: 655.3600000
WDW: EM
SSB: 0
LB: 13.0000000
GB: 0
PC: 1.0000000
=====
===== CHANNEL f2 =====
NUC1: 13C
P1: 12.0000000 sec
PL1: 0.0000000 dB
SFO2: 125.7600000 MHz
===== CHANNEL f1 =====
NUC2: 1H
P2: 12.0000000 sec
PL2: 0.0000000 dB
SFO1: 500.1360000 MHz
===== CHANNEL f3 =====
NUC3: 13C
P3: 12.0000000 sec
PL3: 0.0000000 dB
SFO3: 125.7600000 MHz
===== CHANNEL f4 =====
NUC4: 1H
P4: 12.0000000 sec
PL4: 0.0000000 dB
SFO4: 500.1360000 MHz
=====
F1 - Acquisition Parameters
SI: 0
SF: 500.1360000 MHz
RG: 655.3600000
WDW: EM
SSB: 0
LB: 13.0000000
GB: 0
PC: 1.0000000
=====
F2 - Processing parameters
SI: 0
SF: 500.1360000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 13.0000000
GB: 0
PC: 1.0000000
=====
F3 - Processing parameters
SI: 0
SF: 125.7600000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 13.0000000
GB: 0
PC: 1.0000000
=====
2D NMR plot parameters
SI: 0
SF: 500.1360000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
LB: 13.0000000
GB: 0
PC: 1.0000000
=====

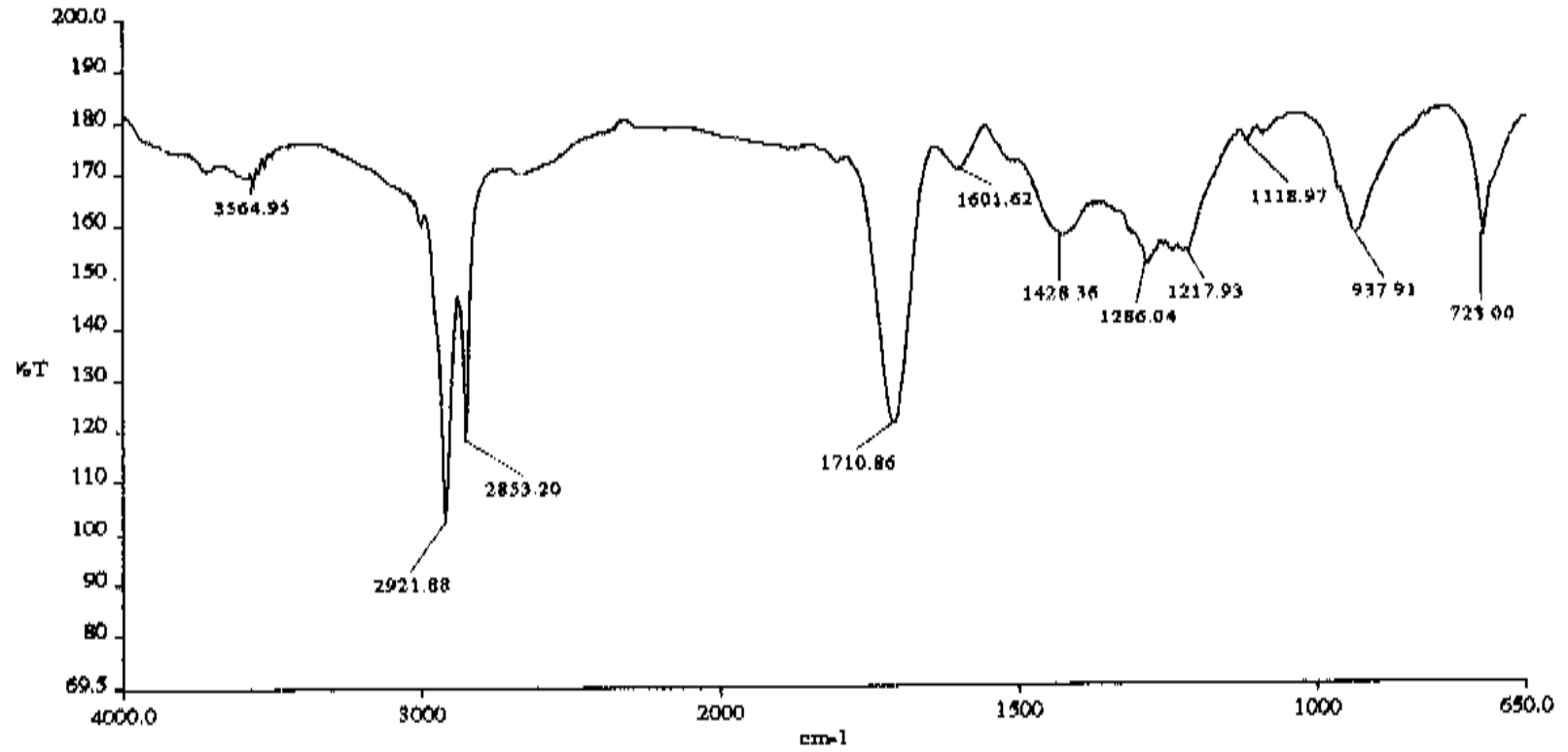
```

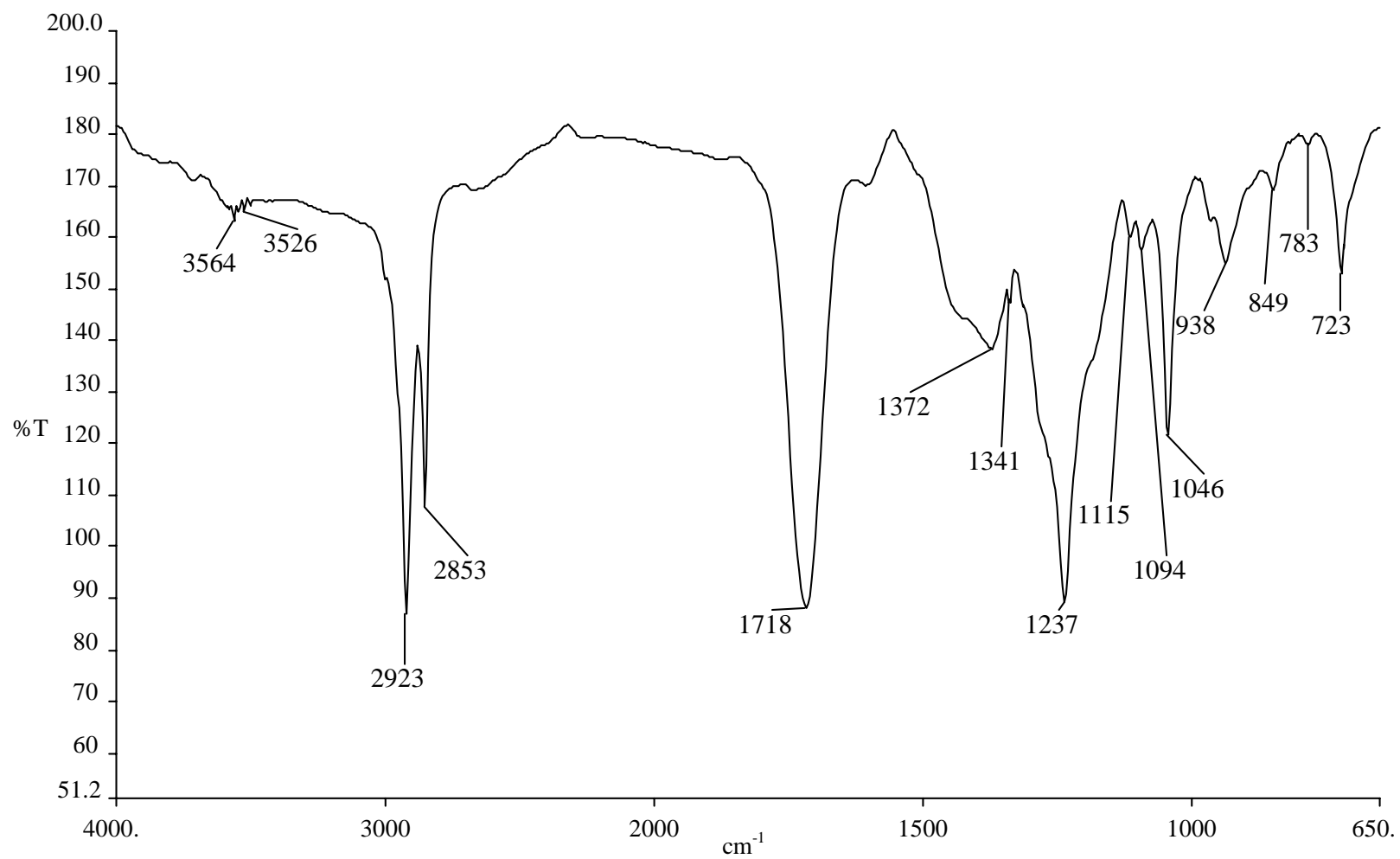
ANEXO K – Ressonância magnética nuclear correspondente à estrutura do produto



ANEXO L – Infravermelho correspondente à frutose



ANEXO M – Infravermelho correspondente ao ácido oléico

ANEXO N – Infravermelho correspondente ao produto formado em meio a acetato de etila

ANEXO O – Espectro de massa do oleato de etila

