



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ANA KARINE PESSOA BASTOS

ESTUDO DA SELETIVIDADE DE LIPASES PARA A OBTENÇÃO
DE ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

FORTALEZA

2013

ANA KARINE PESSOA BASTOS

ESTUDO DA SELETIVIDADE DE LIPASES PARA A OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE
ÁCIDOS GRAXOS

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- B326e Bastos, Ana Karine Pessoa.
Estudo da seletividade de lipases para a obtenção de ésteres de ácidos graxos / Ana Karine Pessoa Bastos. - 2013.
115 f. : il. color., enc. ; 30 cm
- Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química (DEQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Processos Hoteclógicos.
Orientação: Prof. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira.
Coorientação: Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes.
1. Enzimas. 2. Seletividade. 3. Síntese enzimática. 4. Ésteres etílicos. I. Título.

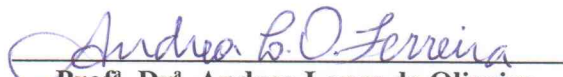
ANA KARINE PESSOA BASTOS


ESTUDO DA SELETIVIDADE DE LIPASES PARA A OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE
ÁCIDOS GRAXOS

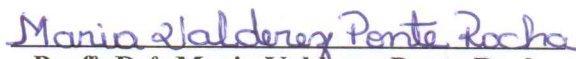
Tese apresentada ao Doutorado em Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Biotecnológicos.

Aprovada em 27/02/2013.

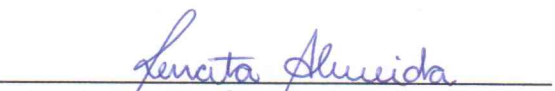
BANCA EXAMINADORA

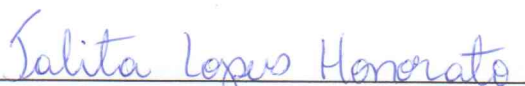

Prof.^a. Dr.^a. Andrea Lopes de Oliveira
Ferreira (Orientadora)
Instituto Federal da Bahia (IFBA)


Prof. Dr. Fabiano André Narciso
Fernandes (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof.^a. Dr.^a. Maria Valderez Ponte Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof.^a. Dr.^a. Cristiane Fernandes De Assis
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte (UFRN)


Prof.^a. Dr.^a. Renata Maria Rosas Garcia
Almeida
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)


Dr.^a. Talita Lopes Honorato
Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)

Aos meus pais, Onofre e Ana.

Aos meus irmãos, Moises e Karol.

Ao meu marido, Robson.

Pela família que somos, dedico-
lhes este trabalho com amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida.

Ao meu avô Moises Pinheiro Bastos, que mesmo em situações críticas, sempre estimulou meu pai a estudar e batalhou pela sua educação.

Ao meu pai, Onofre Teófilo Botelho Bastos, por ter compreendido a importância dos estudos para toda a vida e por ter reproduzido o estímulo dado por seu pai não somente para mim e meus irmãos, mas também para diversos alunos ao longo de sua profissão como professor/educador.

À minha mãe, Ana Lúcia Pessoa Bastos, pela minha educação, formação e pela presença constante em minhas escolhas, e ainda pelos meus dois irmãos, Moises Bastos Neto e Ana Karolina Pessoa Bastos Ximenes, pela família que formamos.

Ao meu marido, Robson da Silva Siqueira, por existir em minha vida, ser presente nas minhas decisões, amigo, companheiro, paciente e dedicar-me tempo e amor incondicionalmente.

À professora Luciana Rocha Barros Gonçalves pelo apoio e infraestrutura concedida e todo o Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO), por terem me recebido de braços abertos sempre que precisei.

À professora Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, pela oportunidade, paciência, amizade e orientações.

Ao professor Fabiano André Narciso Fernandes, por ter me acolhido, pela ajuda e pelas dicas ao longo da realização dos experimentos, bem como ao grupo que compõe o Núcleo de Análise e Desenvolvimento de Processos (NADP), por ter sempre feito do laboratório um divertido ambiente de trabalho.

À equipe de professores do IFCE - Campus Maracanaú, em especial, Rossana, Aristênio, Emília e Franklin, pelo esforço em me conceder licença das minhas atividades para que eu pudesse executar os ensaios laboratoriais necessários para a conclusão do doutorado.

Aos alunos do curso de licenciatura em química, pela compreensão e paciência. Às alunas do curso de engenharia ambiental, Janine Mesquita, Léa Pontes e, em especial, à aluna Tatiane Mesquita Freire, pela disponibilidade e ajuda nos momentos em que mais precisei.

Aos amigos: Jame's, Izabelly, Larissa e Ayla, pelas dicas e ajuda nos procedimentos experimentais.

À amiga e companheira de doutorado Elizabete Araújo Carneiro (Bete), pelas conversas, desabafos e estímulos.

À amiga e professora Maria Valderez Ponte Rocha (Val), pela ajuda constante e incondicional. Muito obrigada! Você realmente foi fundamental para a realização deste trabalho e conclusão desta importante fase da minha vida acadêmica.

À equipe do Laboratório de Referência em Biocombustíveis (LARBIO), representado por Jackson de Queiroz Malveira, por ter sempre me recebido prontamente.

RESUMO

Os ésteres de ácidos graxos representam uma das mais importantes classes de compostos orgânicos devido à diversidade de aplicações, tais como aromas, biopesticida, biodiesel e antimicrobianos. O setor industrial de óleos e gorduras, bem como as pesquisas científicas, tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos para a síntese de ésteres a partir dos ácidos graxos, por rota química ou enzimática. Nesse contexto, a lipase é a enzima mais amplamente utilizada por apresentar diversas vantagens relacionadas à sua especificidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a seletividade das lipases imobilizadas de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos graxos saturados (AGS) e insaturados (AGI), bem como a conversão destes em ésteres etílicos. A seletividade foi avaliada em relação ao ácido oleico (insaturado) e o ácido eicosanóico (saturado), obtidos na hidrólise química do óleo do peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*). Para análise da seletividade foi realizado um planejamento experimental composto central 2⁴, variando a velocidade de agitação (rpm), temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m), mantendo-se fixa a quantidade de peneira molecular – zeólita 5 Å – (5 %m) e o tempo reacional (24 h). Da mesma forma, o comportamento das enzimas em relação aos AGS foi avaliado segundo planejamento experimental composto central 2³, variando temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m), mantendo-se fixa a quantidade de peneira – zeólita 5 Å – molecular (5 %m), agitação (180 rpm) e tempo reacional (24 h), utilizando como substrato uma mistura de ácidos palmítico e esteárico. Em todas as análises estatísticas foram considerados 85% de intervalo de confiança. Em relação à esterificação dos ácidos graxos do óleo de peixe hidrolisado, ambos os catalisadores foram seletivos para o ácido saturado eicosanóico. Quase todas as variáveis estudadas influenciaram na seletividade da lipase de *R. oryzae*, enquanto quase nenhuma foi significativa para a seletividade da lipase de *C. antarctica*. Quando a resposta estudada foi a conversão, a lipase de *C. antarctica* foi responsável pelas maiores conversões de ácido oleico em oleato de etila. Quando os ensaios foram realizados utilizando lipase de *R. oryzae*, mais variáveis significativas foram encontradas para o modelo de conversão. No meio reacional contendo a mistura de AGS, ambas as lipases apresentaram maior afinidade pelo ácido palmítico. A faixa de valores selecionada para avaliar a influência na seletividade não afetou significativamente a resposta da lipase de *C. antarctica*, mas foram todas significativas para a de *R. oryzae*. Quanto à conversão, a lipase de *C. antarctica* foi responsável pelas maiores conversões de ácidos esteárico e praticamente todas as variáveis selecionadas foram significativas para o modelo da conversão quando ambas as enzimas foram utilizadas.

Palavras-chave: Ésteres de ácidos graxos. Ácidos graxos. Lipase. Seletividade. Síntese enzimática.

ABSTRACT

Esters of fatty acids represent one of the most important classes of organic compounds due to their variety of applications, such as flavoring, biopesticide, biodiesel and antimicrobials. Oils and fats industry as well as scientific researches have developed many different processes to manipulate composition of triglycerides mixtures. The aim is synthesis of esters from fatty acids by chemical or enzymatic routes. In this context, lipase is the most widely used enzyme due to several advantages related its specificity. The aim of this study was to evaluate the selectivity of immobilized lipases of *Candida antarctica* type B and *Rhizopus oryzae* compared to saturated (SFA) and unsaturated (UFA) fatty acids as well as their yield into ethyl esters. Selectivity was assessed with respect to oleic acid (unsaturated) and eicosanoic acid (saturated), obtained from chemical hydrolysis of fish oil Tilapia (*Oreochromis niloticus*), through 2^4 central composite design using agitation rate (rpm), temperature ($^{\circ}\text{C}$), molar ratio (ethanol:fatty acid) and amount of enzyme (%wt) as independent variables (design factors). The amount of molecular sieve – zeolite 5 Å – (5 %wt) and reaction time (24 h) were fixed. Likewise, the behavior of both enzymes to the SFA was evaluated according to 2^3 central composite design where temperature ($^{\circ}\text{C}$), molar ratio (ethanol:fatty acid) and amount of enzyme (%wt) were independent variables. The amount of molecular sieve – zeolite 5 Å – (5 %wt), stirring (180 rpm) and reaction time (24 h) were fixed and a mixture of palmitic and stearic acids was used as substrate. A confidence interval of 85% was considered for all statistical analyses. Regarding the esterification of fatty acids from hydrolyzed fish oil, both catalysts were selective for saturated eicosanoic acid rather than for the unsaturated acid. The design factors did not present significant effect on response variable when lipase from *C. antarctica* was used like catalyst. However all design factors presented an influence on the selectivity when lipase from *R. oryzae* was used like catalyst. In this way, lipase of *C. antarctica* lead to higher conversions of oleic acid into ethyl oleate and more significant variables have been found for the model when lipase of *R. oryzae* was used in assays. In the reaction medium containing the mixture of SFA, both lipases showed higher affinity for palmitic acid. The values range selected to evaluate the selectivity did not present significant effect on responses when lipase from *C. antarctica* was used, however that value range was significant for all assays performed using lipase from *R. oryzae*. The higher stearic acid conversions were obtained when lipase from *C. antarctica* was used like catalyst and all design factors were significant for both enzymes.

Keywords: Fatty acids esters. Fatty acids. Lipase. Selectivity. Enzymatic synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	– Estrutura química dos ácidos graxos saturados e insaturados	19
Figura 2.2	– Representação da reação reversível de esterificação	23
Figura 2.3	– Mecanismo reacional de esterificação enzimática, onde R representa o grupo alquila	26
Figura 2.4	– Aminoácidos formadores da tríade catalítica, presentes na estrutura do sítio ativo enzimático	31
Figura 3.1	– Esquema para obtenção de ácidos graxos a partir do óleo de vísceras do peixe tilápia	39
Figura 4.1	– Concentração de ácido oleico na reação de esterificação com etanol (razão molar álcool:ácido graxo 1:1), livre de solvente, a 40 °C e 200 rpm, utilizando 2 %m de catalisador, sem peneira molecular	52
Figura 4.2	– Esquema representativo da reação de esterificação do ácido oleico e etanol para a formação do oleato de etila e água e reação inversa de hidrólise	53
Figura 4.3	– Aminoácidos formadores da tríade catalítica das lipases (Ollis <i>et al.</i> , 1992) e suas respectivas abreviações	54
Figura 4.4	– Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i>	58
Figura 4.5	– Superfície de resposta para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, em função da razão molar e quantidade de enzima, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> a 50 °C, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	61
Figura 4.6	– Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	62
Figura 4.7	– Superfície de resposta para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia em função da temperatura e da quantidade de enzima, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> , razão molar 3:1, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	66
Figura 4.8	– Comparação da conversão de ácido oleico presente no óleo de peixe hidrolisado, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> , razão molar 4:1, 150 rpm, variando a temperatura: 45 e 55 °C e a quantidade de enzima: 2 e 6 (%m)	67
Figura 4.9	– Estrutura espacial dos ácidos graxos (a) ácido eicosanóico (C20:0) e (b) ácido oleico (C18:1)	70
Figura 4.10	– Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0), presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia	71

Figura 4.11 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> em função da temperatura e da quantidade de enzima, utilizando razão molar 3:1, 180 rpm, 5% de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24h, no meio reacional composto por óleo hidrolisado de peixe tilápia	72
Figura 4.12 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0), presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia	75
Figura 4.13 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em função da temperatura e agitação, utilizando 4 %m de catalisador, razão molar 3:1, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	78
Figura 4.14 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i>	82
Figura 4.15 – Superfície de resposta para a conversão de ácido esteárico em função da razão molar e da quantidade de enzima, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> a 55 °C, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	86
Figura 4.16 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	87
Figura 4.17 – Superfície de resposta para a conversão de ácido esteárico em função da quantidade de enzima e da temperatura, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> , razão molar 3:1, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular e tempo reacional de 24 h	90
Figura 4.18 – Conversão do ácido esteárico em estearato de etila pelas lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i> nos 16 ensaios de esterificação, conforme planejamento composto central 2 ³	91
Figura 4.19 – Estrutura dos ácidos graxos: (a) ácido esteárico e (b) ácido palmítico	93
Figura 4.20 – Seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> em relação ao ácido esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) nos 16 ensaios do planejamento experimental composto central 2 ³ , a 180 rpm, com 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	94
Figura 4.21 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade quando utilizado lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	95
Figura 4.22 – Valores observados <i>versus</i> valores preditos para a seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação ao ácido esteárico	99
Figura 4.23 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação ao ácido esteárico como função da razão molar e temperatura, utilizando 4 %m de lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> , 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	100
Figura 4.24 – Seletividades obtidas através das esterificações química e enzimática, com carga fixa de 200 U, em óleo hidrolisado de peixe tilápia e na mistura de ácidos graxos saturados palmítico (16:0) e esteárico (C18:0) .	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	– Ácidos graxos poliinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$	21
Tabela 2.2	– Lipídeos (g/100 g de óleo) em diferentes tipos de semente e de peixe (adaptado de Rubio-Rodríguez <i>et al.</i> , 2010 e Arruda, 2004)	22
Tabela 2.3	– Parâmetros para esterificação enzimática	28
Tabela 3.1	– Valores reais das variáveis independentes para o planejamento experimental composto central 2^4 para a reação de esterificação enzimática dos ácidos graxos provenientes do óleo das vísceras de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> como catalisadores, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	45
Tabela 3.2	– Valores reais das variáveis independentes para o planejamento experimental composto central para a reação de esterificação enzimática dos ácidos graxos esteárico e palmítico, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> como catalisadores, agitação de 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h	46
Tabela 4.1	– Composição do óleo de peixe tilápia obtida por cromatografia gasosa (Composição semelhante à obtida por Parente <i>et al.</i> , 2011)	50
Tabela 4.2	– Atividade de hidrólise e de esterificação das lipases de <i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> , obtida com a reação de ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) a 40 ° C, 200 rpm e 2 %m de catalisador. O sistema foi livre de solvente e sem a presença de peneira molecular	53
Tabela 4.3	– Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2^4 para estudo das variáveis selecionadas para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia a oleato de etila, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i>	56
Tabela 4.4	– Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> , com nível de confiança de 85%	59
Tabela 4.5	– ANOVA para o modelo da conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i>	60
Tabela 4.6	– Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> , com nível de confiança de 85%	64
Tabela 4.7	– ANOVA para o modelo da conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	65
Tabela 4.8	– Resultados do planejamento experimental composto central 2^4 para a seletividade das lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia	69

Tabela 4.9 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> para a síntese dos ésteres de ácido oleico (C18:1) e de ácido eicosanóico (C20:0), com nível de confiança de 85%	73
Tabela 4.10 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> em relação aos ácidos graxos oleico (C18:1) e eicoanóico (C20:0)	74
Tabela 4.11 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> para a síntese dos ésteres de ácido oleico (C18:1) e de ácido eicosanóico (C20:0), com nível de confiança de 85%	76
Tabela 4.12 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação aos ácidos graxos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0)	77
Tabela 4.13 – Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2 ³ para a conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	81
Tabela 4.14 – Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> , com nível de confiança de 85% .	84
Tabela 4.15 – ANOVA para o modelo de conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i>	85
Tabela 4.16 – Coeficientes de regressão do modelo da conversão da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> para a reação de esterificação do ácido esteárico, com nível de confiança de 85%	88
Tabela 4.17 – ANOVA para o modelo de conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	89
Tabela 4.18 – Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2 ³ para otimização das variáveis avaliadas para a seletividade das lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação aos ácidos esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0)	92
Tabela 4.19 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> para a reação de esterificação do ácido esteárico, com nível de confiança de 85%	97
Tabela 4.20 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em relação ao ácido esteárico	98

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AGI	Ácidos Graxos Insaturados
AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
CALB	<i>Candida antarctica Lipase type B</i> (Lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B)
CCD	<i>Central Composite Design</i> (Planejamento Compostos Central)
CG	Cromatografia Gasosa
DHA	Docosahexaenoic Acid (ácido docosahexaenóico)
DPA	Docosapentaenoic Acid (ácido docosapentaenóico)
EPA	Eicosapentaenoic Acid (ácido eicosapentaenóico)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
PM	Peneira Molecular
T _{ótima}	Temperatura ótima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos gerais	17
1.1.1	<i>Objetivos específicos</i>	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Triglicerídeos e ácidos graxos	19
2.1.1	<i>Fontes de triglicerídeos e ácidos graxos</i>	22
2.2	Ésteres de ácidos graxos	23
2.3	Esterificação enzimática de ácidos graxos	25
2.3.1	<i>Efeito do álcool na reação de esterificação enzimática</i>	28
2.3.2	<i>Efeito da água na reação de esterificação enzimática</i>	29
2.4	Lipase como catalisador	29
2.5	Seletividade dos catalisadores enzimáticos	32
2.6	Planejamento experimental: ferramenta de análise de dados	34
2.6.1	<i>Planejamento composto central</i>	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Material	37
3.1.1	<i>Enzimas</i>	37
3.1.2	<i>Substratos e solventes</i>	37
3.2	Métodos analíticos	38
3.2.1	Obtenção do óleo de vísceras de peixe tilápia	38
3.2.1.1	<i>Extração do óleo</i>	38
3.2.1.2	<i>Refino do óleo</i>	38
3.2.2	Obtenção dos ácidos graxos	39
3.2.3	Caracterização dos ácidos graxos	40
3.2.3.1	<i>Análise quali e quantitativa dos ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	40
3.2.3.2	<i>Análise quantitativa da mistura de ácidos graxos saturados</i>	40
3.2.3.3	<i>Índice de acidez (IA)</i>	40
3.2.3.4	<i>Quantificação de umidade por Karl-Fischer</i>	41
3.2.4	Determinação da atividade de esterificação das lipases	42
3.2.5	Esterificação enzimática dos ácidos graxos	42
3.2.5.1	<i>Esterificação dos ácidos graxos obtidos do óleo hidrolisado de peixe tilápia</i> .	43

3.2.5.2	<i>Esterificação da mistura de ácidos graxos saturados</i>	43
3.2.6	<i>Estudo da seletividade das lipases de <i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> e da conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos</i>	44
3.2.6.1	<i>Planejamento experimental para a esterificação enzimática dos ácidos graxos do óleo de peixe tilápia</i>	44
3.2.6.2	<i>Planejamento experimental para a esterificação dos ácidos graxos saturados</i>	46
3.3	Estudo comparativo das seletividades das lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i>	47
3.3.1	<i>Esterificação enzimática utilizando 200 U de lipase</i>	47
3.3.2	<i>Esterificação química</i>	48
3.4	Condições experimentais para análise de ácidos graxos e ésteres etílicos ..	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Caracterização dos substratos	50
4.1.1	<i>Caracterização dos ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	50
4.1.2	<i>Análises físico-químicas dos substratos</i>	51
4.2	Determinação da atividade esterificação das lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i>	51
4.3	Conversão de ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia em ésteres etílicos e seletividade das lipases de <i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizopus oryzae</i>	55
4.3.1	<i>Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	55
4.3.1.1	<i>Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i></i>	57
4.3.1.2	<i>Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia utilizando lipase de <i>Rhizopus oryzae</i></i>	61
4.3.1.3	<i>Comparação entre as conversões obtidas utilizando as lipases de <i>Candida antarctica</i> e de <i>Rhizopus oryzae</i> no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	67
4.3.2	<i>Planejamento experimental para a seletividade das lipases de <i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizopus oryzae</i> no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	68
4.3.2.1	<i>Planejamento experimental para a seletividade da lipase de <i>Candida antarctica</i> em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	71

4.3.2.2	<i>Planejamento experimental para a seletividade da lipase de Rhizopus oryzae em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	74
4.3.2.3	<i>Comparação da seletividade das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae no óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	78
4.3.3	<i>Avaliação da seletividade das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae utilizando cargas enzimáticas iguais na reação de esterificação do óleo hidrolisado de peixe tilápia</i>	79
4.4	Estudo da conversão de ácidos graxos saturados em ésteres etílicos e da seletividade das lipases de Candida antarctica e Rhizopus oryzae	80
4.4.1	<i>Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico</i>	80
4.4.1.1	<i>Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico utilizando lipase de Candida antarctica</i>	82
4.4.1.2	<i>Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico utilizando lipase de Rhizopus oryzae</i>	86
4.4.1.3	<i>Comparação entre as conversões de ácido esteárico utilizando as lipases de Candida antarctica e Rhizopus oryzae</i>	90
4.4.2	<i>Planejamento experimental para a seletividade das lipases de Candida antarctica e Rhizopus oryzae na mistura de ácidos graxos saturados</i>	91
4.4.2.1	<i>Planejamento experimental para a seletividade da lipase de Rhizopus oryzae em relação aos ácidos esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) presentes na mistura de ácidos graxos saturados</i>	95
4.4.2.2	<i>Comparação entre as seletividades das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae em relação aos ácidos esteárico e palmítico</i>	100
4.4.3	<i>Avaliação da seletividade das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae utilizando cargas enzimáticas iguais na reação de esterificação dos ácidos esteárico e palmítico</i>	101
4.5	Avaliação da seletividade das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae a partir de dados da esterificação química	101
5	CONCLUSÕES	104
6	TRABALHOS FUTUROS	106

1 INTRODUÇÃO

Os ésteres representam uma das mais importantes classes de compostos orgânicos e podem ser sintetizados por vários mecanismos, dentre eles, a reação entre ácido graxo e álcool, denominada esterificação. Ésteres de ácidos graxos possuem diversas aplicações, tais como aromas (Chang *et al.*, 2006), biopesticida (Wei *et al.*, 2010), biodiesel (Nakpong e Wootthikanokkhan, 2010). O que determinará a propriedade do produto formado será a natureza química do ácido graxo de origem, assim, a matéria prima é de fundamental importância para que o éster de interesse seja sintetizado.

A partir de óleos e gorduras, é possível sintetizar éster de ácido graxo através de duas etapas:

1. Hidrólise do óleo/gordura, na qual serão liberados os ácidos graxos;
2. Esterificação dos ácidos graxos obtidos na hidrólise, através da sua reação com um álcool.

Os óleos podem ser de origem vegetal (soja, algodão, canola, girassol, etc) ou animal, dentre estes, destacam-se os obtidos a partir dos resíduos da piscicultura. Pela sua composição, principalmente, em ácidos graxos (poli)insaturados, o óleo extraído das vísceras de peixe é considerado matéria prima abundante e econômica para a produção de ésteres com alto valor agregado. Além disso, seu aproveitamento é ecologicamente recomendável, em razão da alta carga de matéria orgânica que seria descartada no ambiente, caso esses resíduos não fossem aproveitados.

Como alternativa ao processo convencional e com o objetivo de atender às legislações nacionais de controle ambiental, é interessante substituir a síntese química por reações enzimáticas. Devido às suas excelentes propriedades funcionais (atividade, seletividade e especificidade), as enzimas são capazes de catalisar os processos químicos mais complexos sob condições ambientais e experimentais amenas, o que desperta o interesse em várias áreas da indústria química, tais como química fina, química de alimentos e de análises (Wong e Whitesides, 1994). No entanto, também possuem algumas características que não são muito adequadas para aplicações industriais: são catalisadores solúveis, geralmente muito instáveis; podem ser fortemente inibidas pelos substratos e produtos; funcionam bem somente em substratos naturais e sob condições fisiológicas. Portanto, a utilização de enzimas em larga-escala como catalisadores industriais requer, por exemplo, a melhoria das suas

propriedades através de técnicas de imobilização (Fernández-Lafuente *et al.*, 2001 e Betancor *et al.*, 2003), o que pode aumentar sua eficiência, capacidade de reciclo, bem como sua termoestabilidade (Akoh *et al.*, 2007). Em suma, as enzimas são catalisadores naturais e as reações em que atuam são consideradas "verdes" (Akoh *et al.*, 2007), caracteristicamente menos agressivas ao meio ambiente.

Dentre a ampla variedade de enzimas, destaca-se a lipase (Triacilglicerol éster hidrolases E.C 3.1.1.3), a qual naturalmente catalisa a hidrólise de ligações éster presentes em triglicerídeos/acilgliceróis, liberando ácidos graxos, glicerol e água. A reação é reversível, podendo ocorrer em ambientes não aquosos. Além disso, podem catalisar reações de esterificação, epoxidação, aminólise, dentre outras (Reyes e Hill, 1994; Paiva *et al.*, 2000; Gotor-Fernández e Gotor, 2006). Devido à sua versatilidade, ou seja, a essa capacidade de reconhecer diferentes substratos e portanto, de catalisar uma série de reações, as lipases ainda são objetos de estudo de diversas pesquisas científicas (Sharma *et al.*, 2001; Calleri *et al.*, 2003; Akanbi *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2013).

1.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo foi avaliar a seletividade das lipases imobilizadas de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae* em relação à ácidos graxos saturados e insaturados, bem como a conversão destes em ésteres etílicos. A seletividade foi avaliada em dois meios, um consistindo dos ácidos graxos, saturados e insaturados, presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia e o outro de uma mistura comercial de ácidos graxos saturados (ácido palmítico e ácido esteárico).

1.1.1 Objetivos específicos

- a) extração do óleo das vísceras de peixe tilápia;
- b) hidrólise do óleo das vísceras de peixe tilápia e caracterização dos ácidos graxos obtidos;
- c) estudo da seletividade das lipases imobilizadas comercialmente de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae* por ácidos graxos saturado e insaturado obtidos do óleo hidrolisado de peixe tilápia;

- análise da influência dos parâmetros: velocidade de agitação (rpm), temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m);
- d) estudo da conversão de ácido oleico obtido do óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando as lipases imobilizadas comercialmente de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae*;
 - análise da influência dos parâmetros: velocidade de agitação (rpm), temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m);
- e) estudo da seletividade das lipases imobilizadas comercialmente de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae* pelos ácidos graxos saturados palmítico e esteárico obtidos de uma mistura comercial;
 - análise da influência dos parâmetros: temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m);
- f) estudo da conversão de ácido esteárico obtido de uma mistura comercial, utilizando as lipases imobilizadas comercialmente de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae*;
 - análise da influência dos parâmetros: temperatura (°C), razão molar (etanol:ácido graxo) e quantidade de enzima (%m);
- g) análise da seletividade enzimática, utilizando carga fixa de 200 U das lipases imobilizadas comercialmente de *Candida antarctica* tipo B e de *Rhizopus oryzae*;
- h) comparação da relação entre ésteres etílicos obtidos através da esterificação enzimática com carga fixa (200 U) e da esterificação química;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordadas algumas propriedades dos ésteres de ácidos graxos, bem como alguns estudos realizados que envolvem a sua síntese para diversas aplicações comerciais.

2.1 Triglicerídeos e ácidos graxos

Os triglicerídeos pertencem à classe dos lipídeos de cadeia aberta e, em animais, são acumulados no tecido adiposo e utilizados como fonte de energia alternativa nos processos metabólicos. São os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras e podem ser obtidos através da esterificação de uma molécula de glicerol e três moléculas, iguais ou distintas, de ácidos graxos (Campbell e Farrell, 2007, v. 3).

Conforme Figura 2.1, ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas que contêm números pares de carbonos, podendo ser classificados como saturados (sem ligações duplas) ou insaturados (com ligações duplas carbono-carbono) (Taylor, 1973). Ácidos graxos com números ímpares de carbonos e com estrutura ramificada são raros, mas também podem ser encontrados em pequenas quantidades na natureza (Patterson, 1989).

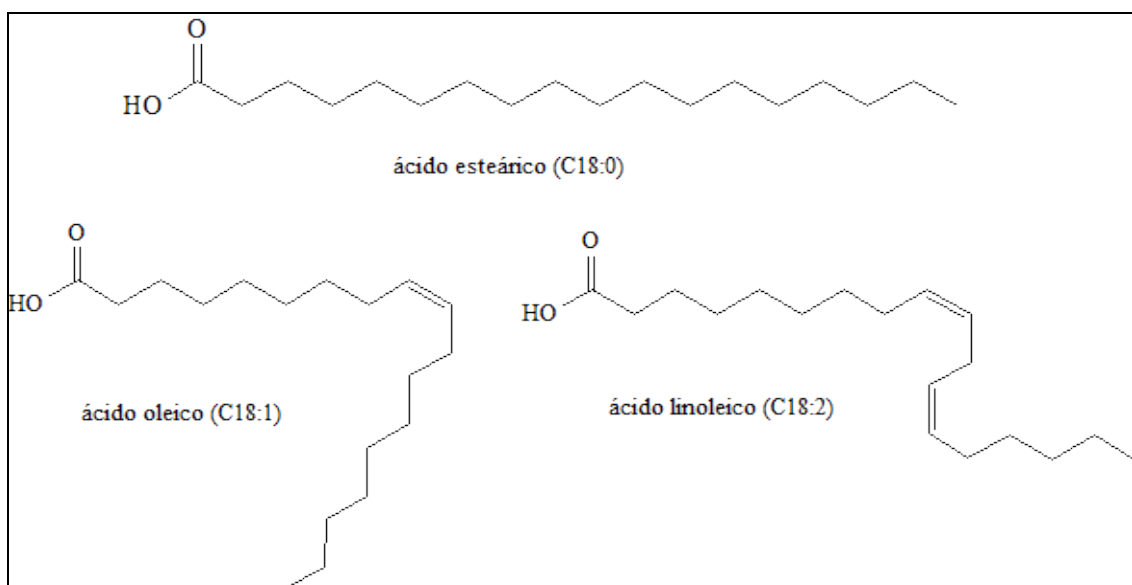


Figura 2.1 – Estrutura química dos ácidos graxos saturados e insaturados.

Os ácidos graxos saturados são mais estáveis, quer no estado livre, quer na forma de triglicérido, empacotando-se mais facilmente no estado sólido, o que favorece um aumento no ponto de ebulição da gordura. À medida que a cadeia carbônica aumenta, aumenta-se também o ponto de ebulição do material (Patterson, 1989). Fisiologicamente, os AGS representam fatores de risco no aumento do nível sanguíneo de colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein* - Lipoproteína de Baixa Densidade), um dos responsáveis pela formação de placa aterosclerótica, e proteína C reativa (indicador de processos inflamatórios), sendo os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) os principais responsáveis por esses efeitos maléficos (Hunter *et al.*, 2010), os quais são ocasionados pelo acúmulo desses ácidos e não unicamente pela sua presença. Mas esse ácidos não apresentam apenas desvantagens, fazem parte da estrutura celular e são integrantes de importantes fontes de nutrientes, tais como leite, incluindo o materno, e derivados, carne bovina, chocolates, óleo de coco, dentre outros (Marounek *et al.*, 2012; Mohamed, 2012).

Ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados, quando apresentam apenas uma ligação dupla, ou poliinsaturados (AGPI), quando apresentam duas ou mais ligações duplas em sua estrutura. Na natureza, apresentam predominantemente isomeria *cis* (Patterson, 1989) e, do ponto de vista metabólico e patológico, é importante identificar a posição da sua última ligação dupla, tendo em vista que o tipo e a configuração dos ácidos graxos são os responsáveis pelas diferenças no sabor, textura, ponto de fusão, absorção e atividade que irão desempenhar no nosso organismo. São essenciais para a manutenção da integridade estrutural e funcional das membranas celulares (Sargent e La Mcevoy, 1997), apresentam grande influência no metabolismo dos triglicéridos, nos níveis de colesterol LDL e interferem na agregação plaquetária, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (Grundy, 1994 e Stansby, 1990), depressão, artrite reumatoide, câncer, diabetes, dentre outras (Puwastien *et al.*, 1999).

Além disso, no mercado mundial, uma ampla variedade de suplementos alimentares de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente $\omega 3$ e $\omega 6$, são incorporados em leite e derivados, fórmulas lácteas infantis, pães, ovos, massas e sucos de frutas (Ward & Singh, 2005).

Os AGPI podem ser divididos em famílias ou séries, dependendo da localização da última ligação dupla em relação ao seu grupamento metílico terminal: família ômega-6 ($\omega 6$) representada pelo ácido linoleico, e a família ômega-3 ($\omega 3$), cujos principais representantes são os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA). Essas duas

classes fazem parte dos ácidos graxos essenciais porque não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser obtidos através da dieta (Campbell e Farrell, 2007, v. 8).

A fonte natural mais importante da série $\omega 3$ está concentrada nos organismos marinhos (peixes, frutos do mar, algas, etc.), pois sua alimentação consiste de fitoplâncton e zooplâncton, ricos em ácidos graxos poliinsaturados (Bergé e Barnathan, 2005), podendo representar cerca de 30% dos ácidos graxos presentes em óleos de peixe.

Na série ômega 3, a primeira ligação dupla está localizada entre o terceiro e o quarto átomo de carbono na cadeia do ácido graxo. Por sua vez, a série ômega 6 apresenta a primeira ligação dupla entre o sexto e o sétimo átomo de carbono na cadeia do ácido graxo. É válido salientar que a nomenclatura completa compõe, além da quantidade de carbonos e de duplas ligações, uma indicação de posição da última ligação dupla, com a letra 'n' ou a letra grega ω (ômega), até o grupo metila terminal. Como mostra a Tabela 2.1, o ácido linoleico contém 18 carbonos, 2 insaturações e a última insaturação está no 6º carbono a partir da metila terminal (C18:2n-6), portanto, é integrante da série $\omega 6$ (Campbell e Farrell, 2007, v. 8).

Tabela 2.1 – Ácidos graxos poliinsaturados das séries $\omega 3$ e $\omega 6$.

Série	Ácido graxo	Fórmula molecular	Representação
$\omega 3$	ácido eicosapentaenóico – EPA	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	C20:5n-3
	ácido <i>alfa</i> -linolênico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C18:3n-3
	ácido docosahexaenóico – DHA	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	C22:6n-3
$\omega 6$	ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C18:2n-6
	ácido <i>gama</i> -linolênico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C18:3n-6
	ácido araquidônico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	C20:4n-6

O ácido araquidônico, da série $\omega 6$, pode ser sintetizado pelo homem a partir do ácido linoleico, considerando essencial. Já os da série $\omega 3$: eicosapentaenóico (EPA), docosapentaenóico (DPA) e docosahexaenóico (DHA), podem ser obtidos a partir do ácido α -linolênico, também considerado essencial, mas devido à baixa conversão, EPA, DPA e DHA são considerados essenciais (Leaf e Weber, 1988).

2.1.1 Fontes de triglicerídeos e ácidos graxos

Os triglicerídeos e, conseqüentemente, os ácidos graxos, são componentes de óleos e gorduras. Conforme apresenta a Tabela 2.2, óleos vegetais como o de soja, girassol e milho, bem como os provenientes de peixes, são ricos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, o que justifica sua grande utilização em nutrição humana. (Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010)

Tabela 2.2 – Lipídeos (g/100 g de óleo) em diferentes tipos de semente e de peixe (adaptado de Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010 e Arruda, 2004).

Óleo	AGMI*	AGPI**	$\omega 3$	$\omega 6$
Girassol	20,5	67,5	0,1	63,2
Milho	29,9	55,6	0,9	50,4
Oliva	73,0	12,7	0,7	7,8
Palma	37,1	15,1	0,3	10,1
Soja	21,2	63,2	7,3	51,5
Bacalhau (fígado)	20,7	56,8	19,8	0,9
Salmão	17,0	63,1	35,3	1,06
Sardinha	14,5	55,1	28,1	2,2
Tilápia	41,41	19,50	3,08	16,11

* Ácidos graxos monoinsaturados

** Ácidos graxos polinsaturados

Efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos à óleos de origem marinha que contêm todos os *cis*-5,8,11,14,17- ácidos EPA e todos os *cis*-4,7,10,13,16,19- ácidos DHA (Stansby, 1979 e Ackman, 1988).

No Brasil, a tilápia é a espécie de peixe de água doce mais industrializada. Segundo o boletim do Ministério da Pesca e Aquicultura, 132.957,8 toneladas desta espécie foram produzidas somente no ano de 2010, sendo a mais consolidada em relação à criação em cativeiro. Nas diferentes etapas da cadeia produtiva da piscicultura, desde a produção até a comercialização no varejo, é gerada uma quantidade significativa de resíduos orgânicos. O rendimento médio em filé é de aproximadamente 30% e os 70% de resíduos incluem: cabeça, carcaça, vísceras, pele e escamas.

No Ceará, a produção de tilápia em 2012 atingiu 30 mil toneladas, o que corresponde a um aumento de 10% em relação ao ano de 2011 (Velooso, 2012). E, se atingidas as metas estabelecidas no plano Safra do Ministério da Pesca e Aquicultura, no final de 2014, o País terá produzido dois milhões de toneladas do pescado. Isso seria motivo de comemoração, caso não houvesse descarte de 3 mil toneladas de vísceras no solo, pois além de causarem mau cheiro, contaminam o lençol freático. Em virtude desse danoso impacto ambiental, Velooso (2012) apresenta em sua matéria publicada na revista *Isto É Independente*, o projeto montado pela Petrobras em parceria com o Ministério da Pesca, que visa intensificar os estudos para extrair óleo a partir das vísceras do peixe tilápia. Com isso, pretende-se integrar o subproduto do pescado no grupo de produtos que o País transforma em combustível limpo.

As vísceras de peixe geralmente têm uma grande quantidade de lipídeos e o óleo extraído dessas partes pode fornecer uma abundante e econômica fonte de matéria prima para produção de ésteres com alto valor agregado, pois sua composição inclui os AGPI das séries $\omega 3$ e $\omega 6$ (Arruda, 2004). Segundo Rubio-Rodríguez *et al.* (2010) o óleo de tilápia pode fornecer cerca de 61% de AGI, o que pode incluir as séries $\omega 3$ e $\omega 6$.

2.2 Ésteres de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos são compostos orgânicos formados pela reação de um ácido graxo e um álcool, com conseqüente liberação de água. Como apresentado na Figura 2.2, trata-se de uma reação reversível, na qual o equilíbrio reacional pode ser deslocado para a esquerda, favorecendo a hidrólise do éster, quando a água está em grande quantidade no meio (Pandey *et al.*, 1999).

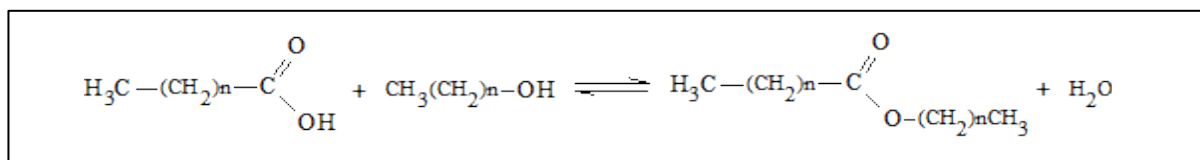


Figura 2.2 – Representação da reação reversível de esterificação.

Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto, entretanto, em alguns casos torna-se necessário modificar as características desses materiais com o intuito de adequá-los a determinadas aplicações, quais sejam, cosmética, alimentícia, dentre outras.

O setor industrial de óleos e gorduras, por exemplo, tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de triglicerídeos (Castro *et al.*, 2004; Ward & Singh, 2005), seja para a obtenção dos ácidos graxos constituintes da sua estrutura ou para a síntese de ésteres a partir destes ácidos graxos.

Industrialmente, ésteres de ácidos graxos saturados são sintetizados visando diversas aplicações, dentre elas, aromas; sabões; medicamentos, perfumes e cosméticos; para a produção e modificações de componentes alimentares; biopesticidas e também como biocombustíveis (Chang *et al.*, 2006; Aravindan *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010; Nakpong e Wootthikanokkhan, 2010; Marounek *et al.* 2012; Bu *et al.*, 2012). Além disso, ácidos graxos, geralmente saturados, esterificados com um álcool de cadeia longa, são denominados ceras e também possuem interesse industrial devido às suas propriedades lubrificante e antiespumante.

Lipases atuam naturalmente como enzimas hidrolíticas (Reyes e Hill, 1994), portanto, utilizando ésteres ou triglicerídeos como substratos para a obtenção de ácidos graxos. A partir de ésteres de ácidos graxos insaturados, os AGI liberados pela hidrólise durante o metabolismo celular, são importantes não apenas para a manutenção da integridade estrutural e funcional da membrana (Sargent e la Mcevoy, 1997), mas também para a redução de riscos de doenças cardiovasculares (Grundy, 1994), tratamento de artrite reumatóide (Puwastien, 1999), bem como para a redução dos níveis de colesterol LDL (Stansby, 1990), como já mencionado.

Srinivas (2011) citou as rotas mais comuns para a síntese de éster de ácido graxo, no caso, para utilização como biodiesel. Tais rotas podem ser utilizadas para a obtenção de ésteres de ácidos graxos de uma forma geral e são elas:

- a) transesterificação: indicada para óleos com baixo índice de acidez;
 - No processo catalisado por base, é importante que o glicerol seja removido, para evitar a produção de sabão. Para as reações que utilizarem tanto ácido como base como catalisadores, a neutralização deverá ser feita. Esse método tem seus produtos mais facilmente recuperados, quando um catalisador enzimático é utilizado;
- b) esterificação dos ácidos graxos livres e transesterificação dos glicerídeos de ácidos graxos, simultaneamente: indicado para óleos com alto índice de acidez;

- c) hidrólise seguida de esterificação;
 - Trata-se da hidrólise de óleos/gorduras residuais para a liberação dos ácidos graxos presentes nesses compostos, seguida da sua esterificação a éster alquílico de ácido graxo;

2.3 Esterificação enzimática de ácidos graxos

Segundo Srinivas (2011), as rotas mais comuns para a síntese de éster de ácido graxo podem ser catalisadas por ácidos, bases ou enzimas (lipases). Intenso esforço de pesquisa acadêmica e industrial vem sendo atribuído para a busca de rotas alternativas de produção dessas moléculas, de modo a atender às crescentes restrições das legislações nacionais de controle ambiental. Para isso, procura-se substituir a síntese química por reações enzimáticas, pois além da sua alta especificidade, enzimas trabalham em condições amenas de temperatura e pH. Processos “limpos”, fundamentados na catálise enzimática, são caracteristicamente menos agressivos ao ambiente.

Como alternativa à rota química convencional, processos de conversão enzimática têm sido bem explorados para sintetizar ésteres de ácidos graxos a partir de óleos (Watanabe *et al.*, 2007 A e B). Um desses processos consiste na transesterificação, um processo útil, mas que apresenta algumas desvantagens, tais como bloqueio da enzima imobilizada pelo subproduto glicerol e redução da capacidade catalítica pela presença de solvente orgânico, tal como o n-hexano (Tan *et al.*, 2006), bem como elevado tempo reacional.

Para superar esses inconvenientes, a conversão pode ser realizada em duas etapas: Hidrólise do óleo seguida de esterificação, ambas por rota enzimática (Meng *et al.*, 2011). Dessa forma, o glicerol, que pode inibir a ação da lipase, não estará presente na etapa de esterificação, favorecendo um aumento na conversão. Porém, como as lipases possuem especificidade pelas posições 1,3 do triglicerídeo (Akoh *et al.*, 2007), o rendimento de ácidos graxos livres no final da hidrólise seria reduzido.

A hidrólise alcalina com KOH assistida por ultrassom, como descrito por Lima (2009) é uma técnica que vem sendo utilizada até recentemente e que tem gerado resultados satisfatórios no final do procedimento reacional (Fiametti *et al.*, 2011; Lerin *et al.*, 2011). Trata-se de uma rota inespecífica, capaz de retirar os ácidos graxos presentes na estrutura do triglicerídeo, sem distinguir as posições nas quais se encontram, aumentando o rendimento em ácidos graxos livres ao final da hidrólise.

Com o intuito de sintetizar ésteres metílicos de ácidos graxos, através de hidrólise seguida de esterificação, Watanabe *et al.* (2007A) utilizaram lipase imobilizada de *Candida antarctica* na ausência de solvente orgânico. Meng *et al* (2011) realizaram o mesmo procedimento, também livre de solvente orgânico, utilizando lipase imobilizada de *Yarrowia lipolytica* para ambas as etapas.

Como apresentado na Figura 2.3, na esterificação enzimática, inicialmente ocorre uma adição nucleofílica a partir da enzima, para formar o complexo enzima-substrato (ES). O nucleófilo é o oxigênio da hidroxila da enzima, o qual ataca o carbono carbonílico do ácido graxo. Nesse momento, o par de elétrons do grupamento amino da enzima captura o hidrogênio da hidroxila.

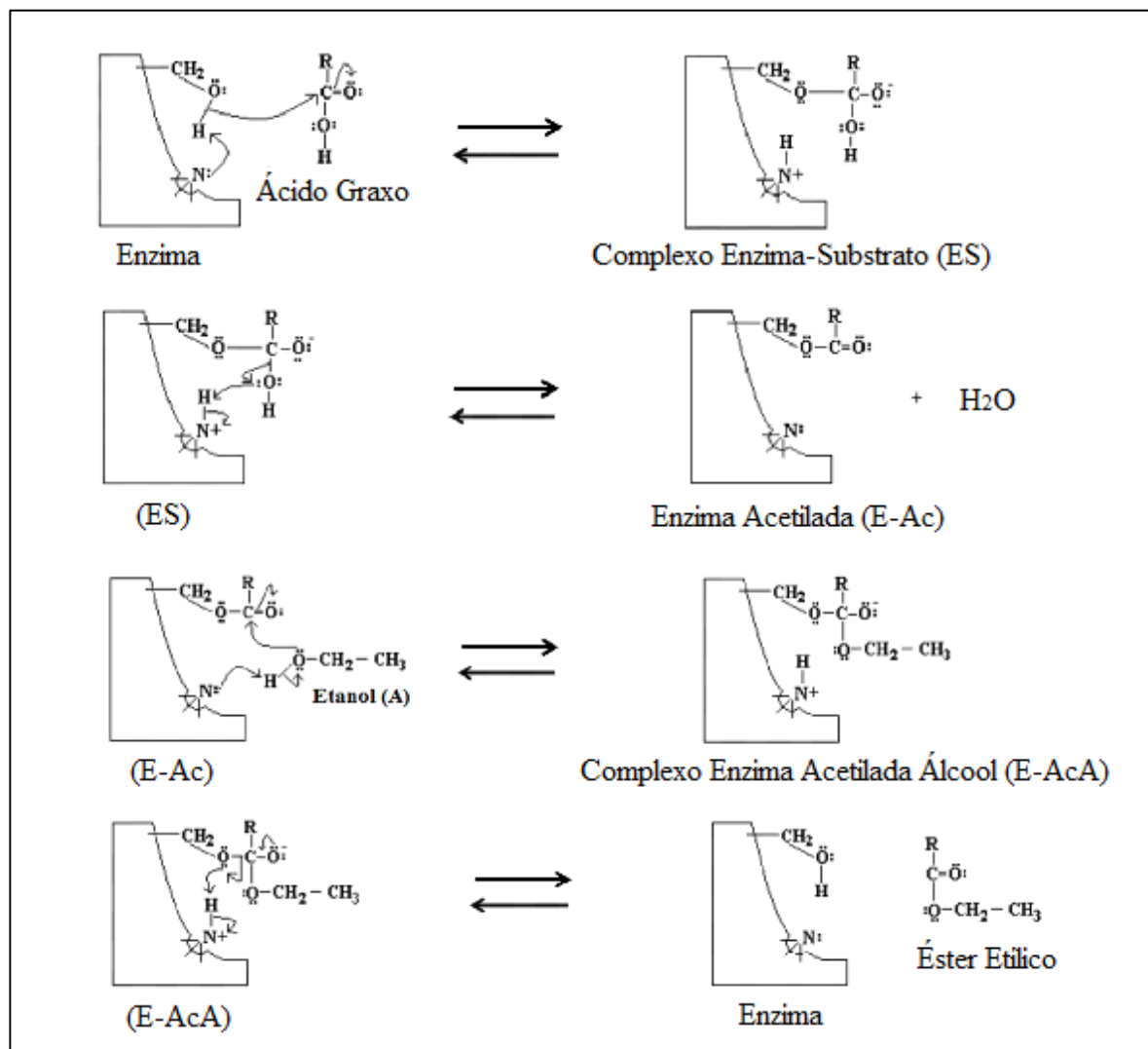


Figura 2.3 – Mecanismo reacional de esterificação enzimática, onde R representa grupo alquila.

O par de elétrons do oxigênio do ácido graxo no complexo enzima-substrato captura o hidrogênio do grupamento amino, liberando uma molécula de água (grupo abandonador) e formando um composto intermediário enzima acetilada (E-Ac). Esse composto intermediário sofre o ataque do átomo de oxigênio do álcool, sendo adicionado ao átomo de carbono da carbonila do composto intermediário (E-Ac).

Em seguida, o par de elétrons do nitrogênio captura o hidrogênio da hidroxila do álcool, formando o complexo enzima-acetilada-álcool (E-AcA). Finalmente, o próton é transferido do ácido conjugado da amina ($-\text{NH}_3^+$) para o átomo de oxigênio do complexo, reconstituindo a enzima e liberando o éster alquílico (adaptado de Al-Zuhair *et al.*, 2007).

Kuo *et al.* (2012) obtiveram alto rendimento de síntese de ceras a partir do álcool cetílico e ácido octanóico, utilizando duas lipases comerciais - de *Candida antarctica* (Novozyme 435) e de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme) em hexano. Ao final, concluíram que a Novozyme 435 foi o melhor biocatalisador.

Vários catalisadores sólidos (ácidos, básicos e protéicos – enzimas) foram relatados para a produção de biodiesel. Berrios *et al.* (2007) utilizaram catalisador ácido para sintetizar ésteres metílicos e os fizeram com razões molares ácido:álcool elevadas, na faixa de 1:10 a 1:80, obtendo melhor resultado com temperatura de 60 °C. O processo enzimático, como alternativa, apresenta vantagens que o torna aplicável à indústria, inclusive, utilizando razões molares pequenas (Watanabe *et al.*, 2007 A e B).

Com o objetivo de aumentar o rendimento de síntese desse mesmo éster de ácido graxo (biodiesel), Kim *et al.* (2013) avaliaram vários óleos vegetais, de peixe, bem como óleos residuais como substratos, utilizando lipase de *Staphylococcus haemolyticus* L62 (HC-L62). Em geral, a enzima converteu de forma eficiente quando foi utilizado óleos vegetais que continham ácidos palmítico (C16:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) como principais componentes de ácidos graxos. Por outro lado, o rendimento foi ligeiramente baixo quando utilizado óleo de peixe savelha, rico em DHA (C22:6) e EPA (C20:5). Ademais, HC-L62 foi capaz de produzir biodiesel usando óleos residuais com rendimento semelhante ao obtido com óleo de peixe.

Como apresentado na Tabela 2.3, diversos fatores devem ser considerados para a obtenção de ésteres de ácidos graxos por catálise enzimática, dentre eles: temperatura, tipo e quantidade de catalisador, solvente, peneira molecular, agitação, razão molar ácido:álcool, etc.

Tabela 2.3 – Parâmetros para esterificação enzimática.

Autor	T (°C)	Razão molar ácido:álcool	Catalisador	Catalisador (%)	Peneira molecular
Watanabe <i>et al.</i> , 2007B	30	1:1 – 1:5	Lipase imobilizada de <i>C. antarctica</i>	1% (m/m _T)	
Royon, 2007	25 - 50	1:1,5 – 1:6	NOVOZYME 435	1,7% (m/m _{AG})	
Duan <i>et al.</i> , 2010	45 -65	1:1,5 – 1:3,5	NOVOZYME 435	5 – 15% (m/m _{AG})	6,4% (m/m _{ácido graxo})
Meng <i>et al.</i> , 2011	30	1:1 – 1:3	Lipase imobilizada de <i>Y. lipolítica</i>	0 – 18% (m/v _{AG})	0 – 27% (m/v _{reacional})
Kiriliauskaitė <i>et al.</i> , 2011	37 - 60	1:3,5 – 1:4,5	LIPOPRIME 50T	40% (m/m _T)	

Em suma, a atividade de esterificação da lipase está intrinsecamente relacionada com as condições estabelecidas para a reação, podendo converter eficientemente os substratos em diferentes situações.

2.3.1 Efeito do álcool na reação de esterificação enzimática

Meng *et al.* (2011) citaram que o etanol é essencial para a reação de esterificação, mas que, em grande quantidade, desnatura proteínas, o que inclui as enzimas. Devido à isso, adicionaram esse substrato em várias etapas e observam que o rendimento da esterificação aumentou de 50% para 81,6%, quando comparado à metodologia de adição única do mesmo volume de etanol em uma reação teste. Com a adição desse substrato em mais de uma etapa, houve aumento considerável no grau de esterificação, com valor de aproximadamente 82%. Nesse mesmo estudo, avaliaram razões molares entre ácido:álcool (1:1-1:3) e obtiveram maiores rendimentos de esterificação com a menor proporção (1:1), resultado semelhante ao observado por Watanabe *et al.* (2007A), os quais obtiveram aproximadamente 90% de conversão utilizando razão molar ácido:álcool 1:1, em 24 h de reação.

Wang *et al.* (2012) utilizaram razão molar ácido graxo:etanol de 1:1, justificando que acima dessa razão de álcool, este pode causar efeito negativo na enzima, inibindo sua ação e, conseqüentemente, diminuir o rendimento de esterificação.

No que diz respeito à síntese de ésteres de ácidos graxos a partir de álcoois de cadeias curtas, apesar de o etanol ser menos reativo do que o metanol, ele tem a vantagem de ser menos tóxico e de evitar a adição de solvente orgânico em reações enzimáticas, o que viabiliza o processo de obtenção de ésteres de ácidos graxos, com redução de custos com

solventes e com consumo de energia (Urioste, 2004). Devido à elevada hidrofiliabilidade do metanol, ao se utilizar esse álcool, as reações enzimáticas devem ser efetuadas em meio à solvente orgânico para evitar sua desativação (Al-Zuhair *et al.*, 2006).

2.3.2 Efeito da água na reação de esterificação enzimática

A presença de água no meio reacional é necessária para promover a conformação correta da enzima, permitindo que o sítio catalítico fique ativo. Entretanto, em uma reação de síntese, a água em grande quantidade na mistura reacional pode causar o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da hidrólise do éster (Villeneuve, 2000). Dessa forma, é evidente que a água tem papel importante e duplo no processo de esterificação: 1) é essencial para a manutenção da conformação da lipase e da sua atividade catalítica e 2) é um produto da esterificação, o qual pode alterar o estado de equilíbrio reacional. Contudo, é importante estabelecer a quantidade ideal para que se obtenha o máximo de conversão possível.

Meng *et al.* (2011) obtiveram 90% de conversão em biodiesel utilizando 9 % (m/v) de peneira molecular, sendo essa, adicionada após 1 h de reação. Neste trabalho, os autores sugeriram que a água não possui efeito na atividade enzimática, mas apenas no equilíbrio da esterificação.

2.4 Lipase como catalisador

Com exceção de alguns RNAs, conhecidos como ribozimas, que são catalisadores durante o seu próprio processamento, todas as enzimas são proteínas, as quais aumentam a velocidade reacional por um fator de 10^{14} mais do que uma reação não catalisada (Voet *et al.*, 2000). São catalisadores versáteis, capazes de atuar em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis em altas temperaturas e apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (Pandey *et al.*, 1999), propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

Segundo Gubta *et al.* (2003), a modificação de alguns alimentos utilizando o catalizador enzimático lipase, apresenta diversas vantagens devido à sua seletividade, o que contribui para a produção de óleos com composições desejadas, além de reduzir significativamente a quantidade de produtos secundários, facilitando o processo de *downstream*.

Segundo Sharma *et al.* (2001), existem mais de 4000 enzimas catalogadas, sendo apenas 200 utilizadas comercialmente, das quais, a maioria é de origem microbiana.

As lipases são triacilglicerol éster hidrolases - E.C.3.1.1.3, que catalisam a hidrólise de óleos e gorduras, liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Villeneuve *et al.*, 2000). Entretanto, não reconhecem apenas óleos e gorduras como substratos, são as enzimas mais largamente utilizadas em tecnologia enzimática, porque catalisam a reação de uma ampla variedade de reações: hidrólise ou síntese de ligações éster, alcoólise, aminólise, peroxidações, epoxidações, interesterificação, dentre outras. Essa versatilidade torna as lipases catalisadores vantajosos úteis para aplicação em indústrias farmacêuticas, na produção de biodiesel, em modificação de alimentos, etc (Reyes e Hill, 1994; Gotor-Fernández e Gotor, 2006; Paiva *et al.*, 2000; Salum, 2010).

No entanto, as enzimas, de uma forma geral, estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou mesmo durante o uso (Richetti, 2009). Para que a sua utilização seja economicamente viável e eficiente, as lipases devem ser recuperadas após as reações e reutilizadas múltiplas vezes, procedimento inviável quando esta encontra-se na forma livre. Portanto, na maioria dos casos, as enzimas devem ser melhoradas antes da sua utilização em processos industriais, por exemplo, através de técnicas de imobilização (Fernández-Lafuente *et al.*, 2001 e Betancor *et al.*, 2003). Segundo Akoh *et al.* (2007), imobilizadas, podem melhorar sua eficiência. Em seu estudo para a síntese de ésteres alquílicos (biodiesel), verificaram que a lipase imobilizada de *Candida antarctica* foi estável por 100 dias e afirmaram que pode ser reciclada por mais de 50 vezes sem que haja perda significativa de atividade.

Contudo, o meio reacional não é o único fator que pode interferir na atividade enzimática. A estrutura tridimensional que os aminoácidos assumem também é importante para o funcionamento da enzima. A mudança nessa estrutura da lipase em interfaces água-óleo foi descrito em 1936 por Holwerda *et al.* Esse fenômeno se caracteriza por uma maior atividade enzimática na presença de substratos pouco solúveis. A maioria das lipases apresenta uma tampa polipeptídica com uma curta α -hélice. O lado da tampa que fica voltado para o sítio catalítico é composto principalmente por cadeias laterais hidrofóbicas. Em ambientes aquosos na ausência de uma interface água-óleo, a tampa polipeptídica cobre o sítio catalítico, tornando a lipase inativa. Quando na presença de substratos hidrofóbicos, a tampa é aberta, dando a forma da enzima ativa.

No entanto, algumas lipases de origem microbiana (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica B*) e uma lipase pancreática não específica apresentam a tampa anfifílica cobrindo os sítios catalíticos, mas não mostraram ativação interfacial (Castro *et al.*, 2004).

O mecanismo de catálise da lipase é complexo e a estrutura do sítio ativo varia significativamente de lipase para lipase. Contudo, a tríade catalítica, constituída por resíduos de serina, histidina e ácido aspártico (Ser-His-Asp), é comum em todas as lipases (Jaeger *et al.*, 1994) ou, segundo Ollis *et al.* (1992), serina, histidina e ácido aspártico/ácido glutâmico (Ser-His-Asp/Glu), conforme ilustrado na Figura 2.4.

Nas proteínas, portanto, nas enzimas, os grupos α -carboxila e α -amina dos aminoácidos que as compõem não estão livres porque formaram a ligação peptídica. Assim, os grupos reativos são aqueles da cadeia lateral. Dentre os grupos funcionais que podem ter função catalítica, incluem, o grupo hidroxila do aminoácido serina e o grupo ácido carboxílico dos ácidos aspártico e glutâmico.

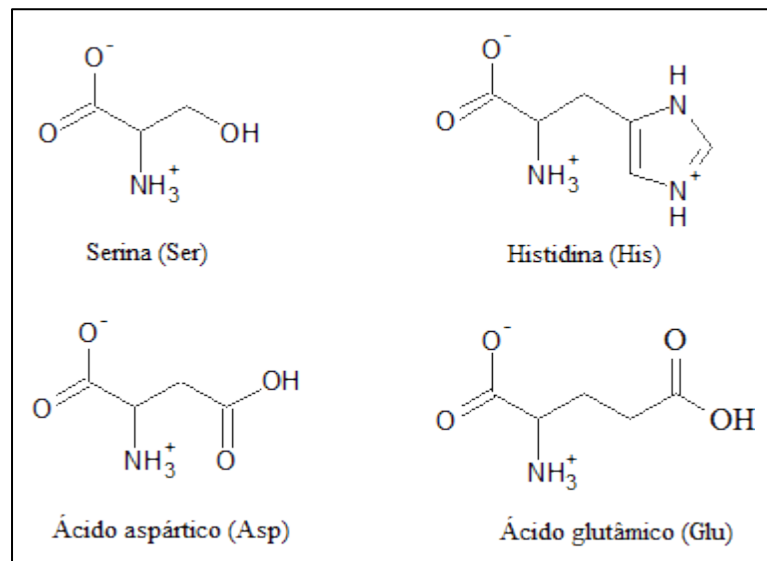


Figura 2.4 – Aminoácidos formadores da tríade catalítica, presentes na estrutura do sítio ativo enzimático.

Segundo Uppenberg *et al.* (1994), a estrutura da lipase de *Candida antarctica B* mostra que o seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica serina, histinina e ácido aspártico (Ser-His-Asp). A estrutura parece ser uma conformação "aberta", com uma entrada bastante restrita ao sítio ativo, o que provavelmente explica a especificidade de substrato e elevado grau de estereoespecificidade desta lipase.

Entretanto, Schrag *et al.* (1991) verificaram que o fungo *Geotrichum candidum* produz diversas formas de lipases, dentre elas, uma que possui a tríade catalítica composta por Ser-His-Glu. Até o presente momento, não se tem elucidada a estrutura polipeptídica do sítio ativo, bem como dos resíduos formadores da tampa de algumas lipases, o que inclui a de *Rhizopus oryzae*.

2.5 Seletividade dos catalisadores enzimáticos

Diversos esforços vêm sendo dirigidos com o intuito de separar componentes reacionais visando seu melhor aproveitamento comercial. Nesse contexto, inclui-se estudo a cerca da separação de enantiômeros, bem como de ácidos graxos saturados e (poli)insaturados, tendo em vista que cada um desses grupos possui benefícios específicos e, portanto, melhor desempenho, quando isolados.

A técnica mais simples e eficiente para a obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados $\omega 3$ é a complexação com ureia, sendo bem estabelecida para a eliminação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Iverson e Weik, 1967; Strocchi & Bonaga, 1975). Wanasundara (1999) utilizou essa técnica e obteve 88,2% de ácidos graxos $\omega 3$ totais.

Entretanto, a complexação com ureia não é a única rota para produzir concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Outros métodos incluem (Guerrero *et al.* 2003; Madrid e Guerrero, 2002; Martínez *et al.*, 2004):

- a) destilação fracionada;
- b) cromatografia líquida de alta eficiência;
- c) extração com líquidos iônicos hidrofóbicos contendo sais de prata (Li, 2009A);
- d) cromatografia em coluna com sílica gel impregnada com prata (Sajilata, 2008) e cromatografia gasosa com coluna impregnada de íons prata (Goto *et al.*, 2012).

Andreão *et al.* (2010) citaram que a sílica gel é uma das principais fases estacionárias empregadas na cromatografia em fase líquida para o isolamento e a purificação de substâncias orgânicas de baixa ou média polaridade e que, impregnada com nitrato de prata, tem uma longa história de uso como suporte cromatográfico, tendo sido Eberz *et al.* (1937), os primeiros a reportar que íons prata poderiam se complexar com alcenos.

Diante de todos esses métodos, é possível separar ácidos graxos saturados dos insaturados, porém, não se tem seletividade. Nesse contexto, as enzimas aparecem como catalisadores biológicos altamente específicos, inclusive, capazes de reconhecer estereoisômeros. É o caso da lipase de *Candida antarctica* tipo B, a qual possui alta estereoseletividade por determinados alcoóis secundários (Uppenberg *et al.*, 1995). Essa alta especificidade foi o que tornou as lipases, alvo de diversos estudos. Dentre eles, pode-se destacar o trabalhos de Meng *et al.* (2011) e Giua *et al.* (2012), com o objetivo de fracionar e concentrar ácidos graxos de alto valor agregado, utilizando lipase como catalisador.

Segundo Derr *et al.* (1993), a maioria dos ácidos graxos saturados presentes nos óleos mais comumente consumidos correspondem ao esteárico e ao palmítico (constituindo 11% dos ácidos graxos no óleo de soja e 4% no óleo de canola). Em relação aos ácidos graxos insaturados, Rubio-Rodríguez *et al.* (2010) verificaram que o óleo de soja, bem como o óleo obtido do peixe salmão, é composto em mais de 60% por ácidos graxos poliinsaturados. Tendo em vista os diferentes substratos presentes nos óleos vegetais e animais, é importante conhecer a preferência, portanto, a seletividade da lipase, para que o produto desejado seja obtido com o maior rendimento possível.

Com o objetivo de avaliar o comportamento da lipase de *Candida antarctica* tipo B, Ong *et al.* (2006) utilizaram-na em uma reação de esterificação enantioseletiva da mistura racêmica do antiinflamatório não-esteroidal cetoprofeno em meio orgânico. Li *et al.* (2009B) estudaram a seletividade das lipases de *Candida antarctica* tipo B e de *Candida rugosa* frente ao substrato ácido linoleico conjugado, o qual consiste de uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico com ligações duplas conjugadas. Nesse estudo, verificaram que as duas ligações de hidrogênio relacionadas aos grupo histidina e serina do sítio ativo, bem como o número de moléculas de água entre o substrato e o sítio de ligação, foram correlacionados com a seletividade do substrato. Finalmente, afirmaram que a seletividade da lipase de *Candida antarctica* pode ser inferior a de *Candida rugosa*, devido à estrutura que compõe o seu sítio de ligação ao substrato.

Meng *et al.* (2010, 2011) observaram a preferência da lipase de *Yarrowia lipolytica* pelo substrato ácido graxo insaturado, ressaltando que a proporção de etil éster de ácido graxo saturado e insaturado formados foi de 19,8% e 80,2%, respectivamente. Da Rós *et al.* (2012) verificaram que a lipase de *Candida antarctica* não foi seletiva para os ácidos graxos saturados e insaturados. Em seu estudo, observaram que, independente do solvente utilizado, as reações apresentaram o mesmo perfil cinético e a enzima foi capaz de formar etil ésteres de todos os ácidos graxos presentes nas duas matérias-primas, mais especialmente etil

oleato e etil palmitato, cujos ácidos graxos estavam em maiores proporções nas duas fontes (óleo de palma e lipídeo de cianobactérias).

No entanto, a seletividade também foi avaliada utilizando outros substratos em outros tipos de reação envolvendo as lipases. Foi o caso de Karabulut *et al.* (2009A) que observaram a seletividade da CALB durante acidólise de um triglicerídeo com ácido oleico em meio contendo solvente, enquanto Duan *et al.* (2010) avaliaram o efeito do solvente na posição de seletividade da CALB durante a síntese de 1,3-dioleína (diacilglicerol) por esterificação e Perignon *et al.* (2012), que realizaram estudo do comportamento da lipase de *Rhizopus oryzae* na hidrólise de triacilglicerol contendo ácidos graxos de cadeia média.

Já Karabulut *et al.* (2009B) avaliaram a seletividade da CALB em relação aos ácidos graxos saturados, os quais variaram do ácido capróico (C6:0) ao behênico (C22:0), durante reação de acidólise entre esses e a trioleína.

2.6 Planejamento experimental: ferramenta de análise de dados

Um experimento é executado com o intuito de se determinar as variáveis experimentais e as interações entre elas que possuem influência significativa sobre as diferentes respostas de interesse (Lundstedt *et al.*, 1998).

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), o planejamento consciente dos experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas, é indispensável para que resultados confiáveis sejam obtidos e para que análises estatísticas consistentes possam ser realizadas.

Dessa forma, é possível aprimorar metodologias analíticas, tais como a performance de análises de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), minimizar a utilização de reagentes de alto custo, otimizar o rendimento de processos e de formulações que conduzam à maior aceitação do produto, tais como, cor desejada, pureza na recuperação de uma enzima, maior extração de um produto, dentre outros.

Como vantagens, os autores (Rodrigues e Iemma, 2009) apontam que a utilização de planejamento experimental reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados, o que implica numa sensível redução do trabalho e, conseqüentemente, do tempo e do custo final.

Nesse contexto, inicialmente deve-se selecionar as variáveis que provavelmente irão interferir no sistema e fixar as demais durante todo o ensaio. Em seguida, avalia-se a metodologia experimental, visando estimar o efeito das diferentes variáveis no resultado. Para a compreensão do comportamento do sistema, alguns planejamentos podem ser utilizados, dentre eles, Fatorial Completo, Fatorial Fracionário, Fatorial com Ponto Central, Composto Central, dentre outros (Teófilo e Ferreira, 2006).

2.6.1 Planejamento composto central

Os Planejamentos Compostos Centrais (CCD) foram representados por Box e Wilson em 1951, como uma evolução do planejamento 3^3 , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários. Outras vantagens, como rotabilidade e blocagem ortogonal, além do pouco número de ensaios, foram obtidas devido à presença das seguintes partes no planejamento (Myers, 2002 e Box, 1987):

- a) um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;
- b) experimentos no ponto central, isto é, $x_i = 0$ para todo i ;
- c) experimentos nos pontos axiais em que $x_i = \pm \alpha$, com $x_j \neq x_i$, e $\alpha = 2^{k/4}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento.

Segundo Teófilo e Ferreira (2006), representa uma das classes de planejamentos mais utilizada para encontrar modelos de resposta para as variáveis selecionadas de um determinado estudo. Para a construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (k), qual planejamento fatorial será empregado (completo 2^k ou fracionário 2^{k-b}) e quantos experimentos serão realizados no ponto central (2^k). O número de experimentos a ser realizado é dado por $2^k + 2k + 1$.

A avaliação da estimativa dos erros para os coeficientes a partir das replicatas no ponto central, bem como os efeitos e coeficientes significativos, pode ser realizada por diferentes métodos, dentre os mais utilizados, destaca-se a análise de variância (ANOVA) (Box *et al.*, 1978).

Já as avaliações de significância para a decisão estatística, tanto para efeitos como para coeficientes de modelos, podem ser realizadas empregando o teste t (distribuição de Student), através do valor p (Schervish, 1996 e Christensen, 2000), o qual representa a probabilidade de validade do erro envolvido no resultado observado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais realizados durante a fase experimental deste trabalho, relacionado à síntese enzimática de ésteres etílicos a partir do óleo hidrolisado do peixe tilápia, bem como dos ácidos graxos saturados palmítico e esteárico, em meio livre de solvente.

3.1 Material

3.1.1 Enzimas

Foram utilizadas as preparações comerciais de lipase de *Candida antarctica* tipo B (CALB) (recombinante do micro-organismo *Aspergillus oryzae*) e lipase de *Rhizopus oryzae*, adquiridas da Sigma-Aldrich (São Paulo - SP), ambas na forma imobilizada em copolímero de metacrilato, reticulado e carregado com grupos oxiranos.

3.1.2 Substratos e solventes

Para a reação de esterificação enzimática visando a obtenção de ésteres etílicos, foram utilizados o óleo de vísceras de peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*), extraído no próprio laboratório, e ácido esteárico (53% de pureza), adquirido da Vetec (Rio de Janeiro - RJ). Além disso, álcool etílico (99,8% de pureza) da Vetec (Rio de Janeiro - RJ) e peneira molecular (PM) 5 Å ativada (Supelco - USA), adquirida pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

As reações para a medida da atividade de esterificação das lipases selecionadas ocorreram com os substratos ácido oleico, grau analítico, adquirido da Synth (Labsynth, Diadema - SP) e álcool etílico (99,8% de pureza) da Vetec (Rio de Janeiro - RJ). O solvente utilizado para diluição em ambos os casos foi o hexano, adquirido da Synth (Labsynth, Diadema - SP).

Todos os reagentes foram empregados sem nenhum tratamento adicional.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Obtenção do óleo de vísceras de peixe tilápia

A metodologia de obtenção (extração e refino) do óleo das vísceras do peixe tilápia foi adaptada de Dias (2009) e segue as seguintes etapas:

3.2.1.1 Extração do óleo

As vísceras de peixe tilápia foram adicionadas em um béquer sob agitação constante com aquecimento entre 70 e 80 °C, sob pressão atmosférica, por 45 minutos. Dessa etapa, foram obtidas três fases, sendo elas: 1) fase sólida, composta por órgãos e pedaços de peixe; 2) fase borra, composta de um líquido aquoso; 3) fase oleosa, representada por aproximadamente $50,3 \pm 3,3\%$ em relação a massa total de vísceras.

As duas primeiras foram descartadas e a fase oleosa foi aquecida a 80 °C, com agitação constante, durante cerca de 30 minutos. Com o intuito de separar o restante de resíduos que possam ter ficado com o óleo, foi realizada uma filtração. Ao final, foi deixado em repouso por aproximadamente 40 minutos para que a borra decantasse e o óleo bruto fosse separado por filtração, o qual foi submetido à etapa de refino.

3.2.1.2 Refino do óleo

O óleo bruto foi submetido à degomagem, a qual consiste na adição de 5% de água aquecida (± 65 °C) em relação à massa de óleo, ao óleo bruto aquecido (± 55 °C), sob agitação constante, por 20 minutos. Neste caso, a temperatura de aquecimento do óleo foi para homogeneizá-lo, uma vez que é composto por ácidos graxos saturados e insaturados, o que acarreta aspecto heterogêneo quando está a temperatura ambiente.

Em seguida, o meio foi deixado em repouso, ainda sob aquecimento, durante aproximadamente 25 minutos, para decantação de ácidos biliares, compostos fosfóricos e partículas sólidas oriundas de etapas anteriores.

3.2.2 Obtenção dos ácidos graxos

Conforme apresentado na Figura 3.1, para a obtenção dos ácidos graxos do óleo de peixe, o óleo bruto foi saponificado e, em seguida, hidrolisado conforme procedimento adaptado de Lima (2009), no qual uma solução alcoólica (álcool etílico) de KOH – 180 mL ($v/m_{\text{óleo}}$) de etanol e 18 g ($m/m_{\text{óleo}}$) de KOH, foi adicionada à 60 g de óleo em um balão de fundo redondo de 500 mL, sob agitação, por 2 h. Após o término da reação, o material foi transferido para um béquer e 360 mL de água ($\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram adicionados, misturando-se com cuidado para não formar espuma. Depois de dissolvido todo o sabão, acrescentou-se uma solução de 12 mL de ácido sulfúrico P.A. em 40 mL de água para que houvesse a total liberação do ácido orgânico do seu sal. A mistura foi transferida para um funil de decantação e depois a camada aquosa foi separada da massa do ácido sobrenadante, a qual foi lavada três vezes com água a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitando-se cautelosamente em movimentos circulares. A massa de ácido graxo obtida foi aquecida até chegar aos $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ para retirar a umidade.

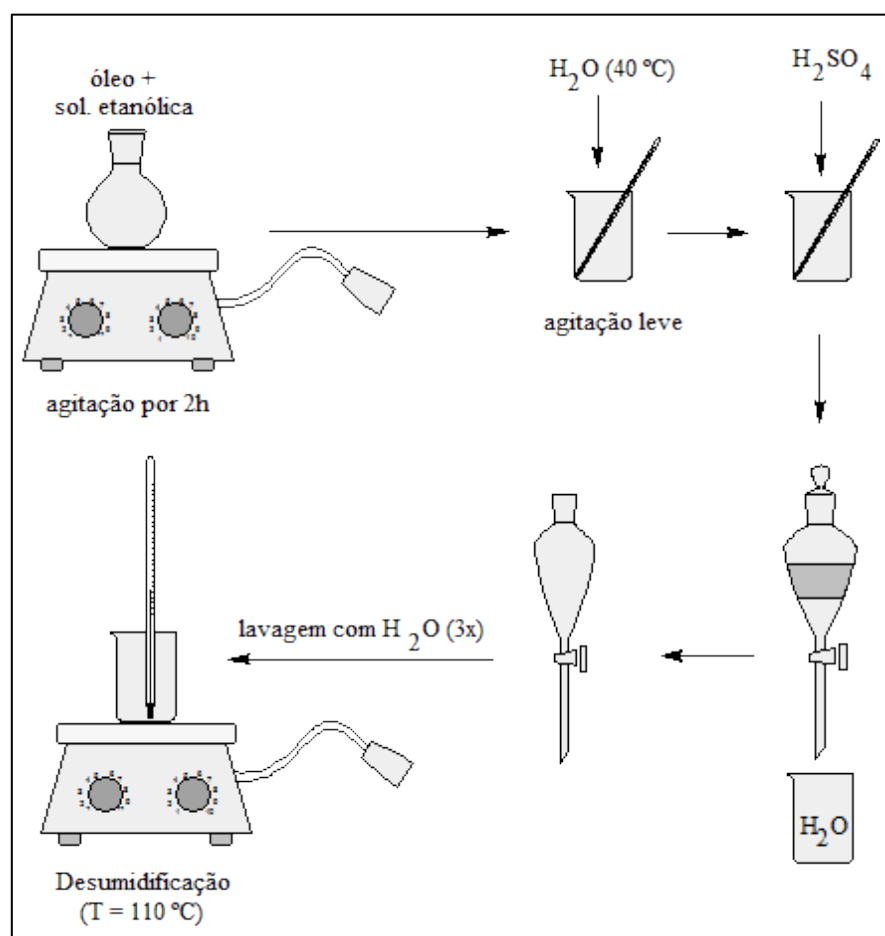


Figura 3.1 – Esquema para obtenção de ácidos graxos a partir do óleo de vísceras do peixe tilápia.

3.2.3 Caracterização dos ácidos graxos

Antes da reação de esterificação, foi feita análise dos substratos selecionados para avaliar a composição qualitativa e quantitativa, no caso do óleo hidrolisado das vísceras do peixe tilápia, bem como para avaliar a pureza, no caso do ácido esteárico comercial.

3.2.3.1 Análise quali e quantitativa dos ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia

Para caracterizar o óleo hidrolisado de peixe tilápia, realizou-se a análise química por cromatografia gasosa (CG), descrita no item 3.4. A solução de análise consistiu de 20 µL de óleo hidrolisado de peixe tilápia diluído em 2 mL de hexano. A identificação dos principais picos das amostras foi feita com base no banco de dados da biblioteca do equipamento e o cálculo dos teores de cada substância (X) foi determinado correlacionado as áreas relativas de cada pico característico com a área total de picos do cromatograma, segundo a Equação 3.1.

$$A(\%) = \frac{\text{Área do pico}_{\text{substância}}}{\text{Área total}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.2 Análise quantitativa da mistura de ácidos graxos saturados

O ácido esteárico comercial foi analisado quanto à sua real composição, através de análise química por CG, descrita no item 3.4. A solução de análise consistiu de uma alíquota de 20 µL de uma solução de ácido esteárico (0,8 g/mL), diluída em 1 mL de hexano. A identificação dos principais picos das amostras foi feita com base no banco de dados da biblioteca do equipamento e o cálculo dos teores de cada substância (X) foi determinado correlacionado as áreas relativas de cada pico característico com a área total de picos do cromatograma, segundo a Equação 3.1.

3.2.3.3 Índice de acidez (IA)

Para que a quantidade de ácidos graxos fosse mensurada, também foi realizado índice de acidez da amostra correspondente ao óleo hidrolisado de peixe. Esse índice corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessário para

neutralizar os ácidos graxos livres de um grama de gordura (em mg KOH/g). O método de análise do índice de acidez empregado neste trabalho foi o Cd 3d-63, descrito pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.).

Inicialmente neutralizou-se o solvente (álcool etílico comercial) com uma solução alcoólica de hidróxido de sódio (NaOH) 0,25 N, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína 1% em álcool. Em seguida, pesou-se cerca de 1 g da amostra a ser analisada em um erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 50 mL de etanol neutralizado, juntamente com 2 a 3 gotas de fenolftaleína. A partir de então, a titulação foi realizada com a solução alcoólica de NaOH 0,25 N, até que uma coloração levemente rósea persistisse por 15 segundos. A Equação 3.2 foi utilizada para a obtenção do valor referente ao índice de acidez, cujo resultado é obtido em mg de KOH/g de óleo.

$$IA = \frac{V \cdot f \cdot N \cdot 56,11}{m} \quad (3.2)$$

onde V é o volume do titulante (NaOH 0,25 M), f é o fator de correção da concentração da solução de NaOH; N é a normalidade da solução titulante e m a massa de óleo de vísceras de peixe e 56,11 é a massa molar do KOH.

3.2.3.4 Quantificação de umidade por Karl-Fischer

A quantidade de água presente nos óleos hidrolisados de peixe foi medida através de analisador de traços de umidade Karl-Fisher WS-3, modelo 831 KF Coulometer, fabricante: Metrohm, segundo norma ASTM D 6304-07.

A metodologia consiste na injeção de uma alíquota dentro do recipiente de titulação de um aparelho coulométrico de Karl Fischer, o qual utiliza uma solução metanólica de iodo, dióxido de enxofre e um tampão. O iodo reage quantitativa e estequiometricamente com a água. Quando toda a água é titulada, o iodo em excesso é detectado e a titulação é terminada. Com base na estequiometria da reação, onde 1 mol de iodo reage com 1 mol de água, a quantidade da água é proporcional à corrente total, de acordo com a Lei de Faraday.

3.2.4 Determinação da atividade de esterificação das lipases

A atividade de esterificação das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* foi determinada através da conversão de ácido oleico em oleato de etila e está representada pela Equação 3.3. O sistema reacional consistiu em etanol e ácido oleico (razão molar 1:1) e lipase (2 %m), livre de solvente. A mistura de ácido oleico e lipase foi incubada a 40 °C por 10 minutos a 200 rpm. Em seguida, a reação de esterificação teve início com a adição de álcool ao meio reacional, de acordo com metodologia descrita por Soares *et. al.*, (1999), com adaptações. Após 24 h de reação, alíquota de 20 µL foi retirada e diluída com 1 mL de hexano. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

O consumo de ácido oleico e a formação do éster oleato de etila foi determinado através de CG, nas condições apresentadas no item 3.4.

$$A(U / g) = \frac{(n_{a(i)} - n_{a(t)}) \cdot 100 \cdot n_s \cdot 10^6}{n_{a(i)} \cdot m_{cat}} \quad (3.3)$$

onde A é a atividade enzimática (U/g), definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido oleico por minuto (1U) por grama de catalisador, nas condições reacionais; $n_{a(i)}$ é o número de mol inicial de ácido oleico na alíquota; $n_{a(t)}$ o número de mol de ácido oleico na alíquota após 24 h de reação; n_s o número de mol de ácido oleico na solução total; 10^6 o fator para a conversão de mol em µmol e m_{cat} , a massa de catalisador.

3.2.5 Esterificação enzimática dos ácidos graxos

As reações de esterificação para os óleo hidrolisado de peixe, bem como para a mistura dos ácidos graxos saturados, incluíram estudo das variáveis temperatura, razão molar álcool:ácido graxo, agitação e quantidade de enzima. As faixas analisadas foram de acordo com dados da literatura referentes à síntese de ésteres de ácidos graxos para aplicações como biodiesel, lubrificantes, dentre outros (Akoh *et al.*, 2007; Kiriliauskaitè *et al.*, 2011; Meng *et al.*, 2011).

3.2.5.1 Esterificação dos ácidos graxos obtidos do óleo hidrolisado de peixe tilápia

A metodologia para esterificação dos ácidos graxos foi adaptada de Meng *et. al.* (2011) e consistiu no aquecimento prévio da enzima imobilizada e do óleo hidrolisado de peixe, à temperatura desejada, por 10 minutos. A reação foi realizada sem a presença de solvente e iniciou-se com a adição de etanol, realizada em 3 etapas, a cada 1 h de reação, em diferentes razões molares, conforme planejamento experimental, as quais foram consideradas em relação ao ácido graxo que estava em maior porcentagem no óleo hidrolisado. A peneira molecular 5 Å (5 %m) foi adicionada após 1 h do início da reação com o objetivo de reduzir o efeito da reação reversa de hidrólise.

Todas as reações foram realizadas em Erlenmeyers de 50 mL, em um agitador rotativo, com controle digital de temperatura e agitação, utilizando agitador modelo Tecnal TE-420. Decorrido o tempo reacional de 24 h, alíquotas de 20 µL foram diluídas em 2 mL do solvente hexano para análise dos ésteres formados através de CG, conforme item 3.4.

3.2.5.2 Esterificação da mistura de ácidos graxos saturados

Os ácidos graxos saturados esteárico e palmítico são sólidos a temperatura de 30 °C. Na faixa de temperatura estudada (46 a 63 °C), só foi possível alcançar o estado líquido com a adição do volume total de etanol, motivo pelo qual a metodologia de esterificação teve que ser adaptada. Assim, a reação de esterificação desses ácidos consistiu no aquecimento prévio da mistura dos ácidos esteárico e palmítico com o volume total de etanol, por 10 minutos, 180 rpm, à temperatura desejada. A enzima foi adicionada somente após 10 minutos e para reduzir o efeito da reação reversa de hidrólise, peneira molecular 5 Å (5 %m) foi adicionada após 1 h do início da reação. As razões molares foram consideradas em relação ao ácido graxo que estava em maior porcentagem no óleo hidrolisado.

Todas as reações foram realizadas em Erlenmeyers de 50 mL, livre de solvente, em um agitador rotativo, com controle digital de temperatura e agitação (agitador orbital Tecnal TE-420). Decorrido o tempo reacional de 24 h, alíquotas de 20 µL foram diluídas em 1 mL do solvente hexano para análise dos ésteres através de CG, conforme item 3.4.

3.2.6 Estudo da seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* e da conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos

Por se tratar de uma resposta muito importante para a análise das reações, além da seletividade das lipases utilizadas para as reações de esterificação, a conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos também foi avaliada, segundo planejamento experimental composto central, com o intuito de observar a influência de variáveis tais como a quantidade de catalisador, temperatura, razão molar e agitação.

3.2.6.1 Planejamento experimental para a esterificação enzimática dos ácidos graxos do óleo de peixe tilápia

As reações de esterificação dos ácidos graxos obtidos do óleo de peixe tilápia seguiram o planejamento experimental composto central 2⁴, utilizando as lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* como catalisadores.

As variáveis independentes foram: temperatura (X₁), agitação (X₂), razão molar álcool:ácido graxo (X₃) e quantidade de enzima (X₄). No total, 26 experimentos, incluindo 8 pontos axiais e 2 pontos centrais foram gerados utilizando o software STATISTICA 10, conforme apresentado na Tabela 3.1. As variáveis dependentes foram conversão e seletividade.

As Equações 3.4 e 3.5 representam, respectivamente, as duas variáveis dependentes selecionadas para o estudo da reação de esterificação dos ácidos graxos obtidos do óleo hidrolisado de peixe tilápia. A conversão foi determinada com base no ácido oleico e seu respectivo éster etílico após 24 h de reação. A seletividade foi determinada com a finalidade de observar a preferência das lipases analisadas pelo ácido insaturado ou saturado, através da relação entre o éster do ácido oleico (insaturado - C18:1) e o éster ácido eicosanóico (saturado - C20:0), após 24 h de reação. Gráficos de superfícies de resposta foram obtidos de modo a facilitar a análise das variáveis nos ensaios realizados, considerando 85% de nível de confiança.

$$\text{Conversão}(\%) = \frac{\text{Área}_{\text{ác. C18:1}} - \text{Área}_{\text{éster C18:1}}}{\text{Área}_{\text{ác. C18:1}}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Seletividade} = \frac{\text{Área}_{\text{éster C18:1}}}{\text{Área}_{\text{éster C20:0}}} \quad (3.5)$$

Tabela 3.1 – Valores reais das variáveis independentes para o planejamento experimental composto central 2⁴ para a reação de esterificação enzimática dos ácidos graxos provenientes do óleo das vísceras de peixe tilápia, utilizando lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Rhizopus oryzae* como catalisadores, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

Exp	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ Agitação (rpm)	X ₃ Razão molar (álcool:ácido graxo)	X ₄ Enzima (% m/m)
1	45	150	2:1	2
2	45	150	2:1	6
3	45	150	4:1	2
4	45	150	4:1	6
5	45	210	2:1	2
6	45	210	2:1	6
7	45	210	4:1	2
8	45	210	4:1	6
9	55	150	2:1	2
10	55	150	2:1	6
11	55	150	4:1	2
12	55	150	4:1	6
13	55	210	2:1	2
14	55	210	2:1	6
15	55	210	4:1	2
16	55	210	4:1	6
17	40	180	3:1	4
18	60	180	3:1	4
19	50	120	3:1	4
20	50	240	3:1	4
21	50	180	1:1	4
22	50	180	5:1	4
23	50	180	3:1	0
24	50	180	3:1	8
25(C)	50	180	3:1	4
26(C)	50	180	3:1	4

3.2.6.2 Planejamento experimental para a esterificação dos ácidos graxos saturados

As reações de esterificação dos ácidos graxos esteárico e palmítico seguiram o planejamento experimental composto central 2³, utilizando as lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* como catalisadores.

As variáveis independentes foram: quantidade de enzima (X_1), razão molar álcool:ácido graxo (X_2) e temperatura (X_3). No total, 16 experimentos, incluindo 6 pontos axiais e 2 pontos centrais foram gerados utilizando o software STATISTICA 10, conforme apresentado na Tabela 3.2. As variáveis dependentes foram conversão e seletividade.

Tabela 3.2 – Valores reais das variáveis independentes para o planejamento experimental composto central para a reação de esterificação enzimática dos ácidos graxos esteárico e palmítico, utilizando lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Rhizopus oryzae* como catalisadores, agitação de 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

Exp	X_1 Enzima (%m/m)	X_2 Razão molar (álcool:ácido graxo)	X_3 Temperatura (°C)
1	2	1,5	50
2	2	1,5	60
3	2	4,5	50
4	2	4,5	60
5	6	1,5	50
6	6	1,5	60
7	6	4,5	50
8	6	4,5	60
9	0,64	3	55
10	7,6	3	55
11	4	0,48	55
12	4	5,52	55
13	4	3	46,60
14	4	3	63,40
15(C)	4	3	55
16(C)	4	3	55

As Equações 3.6 e 3.7 representam, respectivamente, as duas variáveis dependentes selecionadas para o estudo da reação de esterificação dos ácidos graxos saturados. A conversão foi determinada com base no ácido esteárico e seu respectivo éster etílico após 24 h de reação. A seletividade foi determinada com a finalidade de observar a preferência das lipases analisadas pelo ácido esteárico ou ácido palmítico, através da relação entre os seus ésteres, após 24 h de reação. Gráficos de superfícies de resposta foram obtidos de modo a facilitar a análise das variáveis nos ensaios realizados, considerando 85% de nível de confiança.

$$\text{Convers\~{a}o}(\%) = \frac{\text{Área}_{\text{ác. C18:0}} - \text{Área}_{\text{éster C18:0}}}{\text{Área}_{\text{ác. C18:0}}} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Seletividade} = \frac{\text{Área}_{(\text{éster C18:0})}}{\text{Área}_{(\text{éster C16:0})}} \quad (3.7)$$

3.3 Estudo comparativo das seletividades das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*

Nos ensaios anteriores, a quantidade de enzima adicionada nas reações foi determinada apenas em percentual de sua massa em relação à massa total, ou seja, não foi considerado o valor da sua atividade de esterificação em termos de U/g de catalisador.

Com o intuito de comparar a seletividade obtida nos planejamentos descritos nos itens 3.2.6.1 e 3.2.6.2, foram realizados dois ensaios, ambos em duplicata: 1) Esterificação enzimática fixando-se a quantidade de enzima em 200 U; 2) Esterificação química.

3.3.1 Esterificação enzimática utilizando 200 U de lipase

A seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* também foi avaliada fixando-se a unidade de enzima fornecida para a reação. Foi selecionado atividade de 200 U, porque a massa correspondente a esse valor para as duas enzimas não afetava o volume reacional. O procedimento experimental foi o mesmo adotado para todas as reações de esterificação enzimática, conforme descrito nos itens 3.2.5.1 e 3.2.5.2.

No caso do substrato composto pelos ácidos graxos do óleo de peixe, a metodologia foi adaptada de Meng *et al.* (2011) e consistiu no aquecimento prévio de 200 U de enzima imobilizada e do óleo hidrolisado de peixe, a temperatura de 50 °C e 180 rpm, por 10 minutos. A reação foi realizada sem a presença de solvente e iniciou-se com a adição de etanol, realizada em 3 etapas, a cada 1 h de reação, na razão molar álcool:ácido graxo de 3:1, considerando o ácido graxo que estava em maior porcentagem no óleo hidrolisado, no caso, ácido oleico. A peneira molecular 5 Å (5 %m) foi adicionada após 1 h do início da reação.

Para os substratos ácidos graxos saturados, também adaptada de Meng *et al.* (2011), consistiu no aquecimento prévio da mistura dos ácidos esteárico e palmítico com o volume total de etanol (razão molar álcool: ácido graxo de 3:1), por 10 minutos, a temperatura desejada. 200 U de lipase foram adicionadas somente após 10 minutos de reação e para reduzir a hidrólise do éster formado, peneira molecular 5 Å (5 %m) foi adicionada após 1h do início da reação, que aconteceu a 50 °C e 180 rpm, por 24 h.

Todas as reações, com óleo hidrolisado de peixe tilápia e com mistura de ácidos graxos saturados, foram realizadas em Erlenmeyers de 50 mL, livre de solvente, em um agitador rotativo, com controle digital de temperatura e agitação (agitador orbital Tecnal TE-420). Decorrido o tempo reacional de 24 h, alíquotas de 20 µL foram diluídas em 2 e em 1 mL do solvente hexano para análise dos ésteres do ácido oleico (C18:1) e do ácido esteárico (C18:0), respectivamente, e analisado em cromatógrafo gasoso, conforme descrito no item 3.4.

3.3.2 Esterificação química

A esterificação química acontece de forma inespecífica, sem que haja a preferência entre um substrato e outro por parte do catalisador. Assim, através dessa reação, foi estabelecido um padrão que representasse a relação entre os ésteres do ácido oleico (C18:1) e do ácido eicosanóico (C20:0), bem como entre os ésteres do ácido esteárico (C18:0) e do ácido palmítico (C16:0), conforme Equações 3.5 e 3.7, respectivamente.

A metodologia para esterificação química foi adaptada de Aranda *et al.* (2008) e consistiu de 10 g de substrato (óleo hidrolisado de peixe tilápia ou mistura de ácidos graxos saturados), razão molar álcool:ácido graxo de 3:1, 1% (m/m_{Ác. graxos livres}) do catalisador ácido sulfúrico, a 50 °C e 180 rpm.

No caso do óleo hidrolisado de peixe tilápia, é importante ressaltar que foi aquecido a 110 °C por 15 minutos, para que a água que tenha permanecido do processo de hidrólise fosse eliminada. Decorrido o tempo reacional de 2 h, alíquotas de 20 µL foram diluídas em 2 e em 1 mL do solvente hexano para análise dos ésteres do ácido oleico (C18:1) e do ácido esteárico (C18:0), respectivamente, e analisado em cromatógrafo gasoso, conforme descrito no item 3.4.

3.4 Condições experimentais para análise de ácidos graxos e ésteres etílicos

O consumo de ácidos graxos e a síntese de ésteres etílicos foram acompanhados através de cromatógrafo gasoso (CG), marca Thermo Focus GC, acoplado a um espectrômetro de massa, com uma coluna adsorvedora Column Capillary OV-1. As dimensões da coluna eram 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme líquido. O fluxo da coluna foi de 1,0 mL/min, a temperatura do detector e do injetor, 250 °C e 230 °C, respectivamente. Já a do forno, iniciou em 50 °C, mantendo-se por 2 minutos, quando passou a aumentar 20 °C/min até atingir 240 °C. O gás de arraste foi o hélio e o volume de amostra injetado foi de 1 µL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos substratos

Com o intuito de avaliar o comportamento das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*, foi utilizado uma mistura de ácidos graxos saturados como substrato para a reação de esterificação. Segundo análise, a mistura continha 47 %m de ácido palmítico e 53 %m de ácido esteárico. Além deste, óleo hidrolisado de peixe tilápia também foi utilizado como substrato para a ação das referidas lipases.

4.1.1 Caracterização dos ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia

A composição em ácidos graxos do óleo hidrolisado de peixe foi obtida através da análise química por cromatografia gasosa e o resultado está exposto na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Composição em ácidos graxos do óleo hidrolisado de peixe tilápia obtida por cromatografia gasosa. (Composição semelhante à obtida por Parente *et al.*, 2011).

Ácidos graxos	%m
ácido mirístico (C14:0)	2,6
ácido palmítico (C16:0)	3,4
ácido linoleico (C18:2)	31,9
ácido oleico (C18:1)	32,4
ácido esteárico (C18:0)	22,2
ácido eicosanóico (C20:0)	7,5

Segundo análise dos dados apresentados na Tabela 4.1, a referida matéria-prima possui os ácidos graxos mirístico, palmítico, linoleico, oleico, esteárico e eicosanóico, sendo os ácidos oleico e linoleico, os predominantes na amostra analisada.

4.1.2 Análises físico-químicas dos substratos

Quanto ao óleo de peixe tilápia, após hidrólise, foi caracterizado através de análises físico-químicas, as quais consistiram no índice de acidez ($190 \pm 0,09$ mg KOH/g de óleo), porcentagem de ácidos graxos livres ($96 \pm 0,04\%$) e umidade ($1183 \pm 20,5$ µL/L).

O índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres são propriedades importantes para o cálculo da quantidade de álcool a ser adicionada na reação, considerando as razões molares selecionadas para estudo. Tendo em vista que a água tem papel fundamental na esterificação enzimática, tanto na conformação do sítio ativo da enzima, como pelo efeito de promover a reação inversa de hidrólise (Tan *et al.*, 2006), sua quantificação através da umidade do óleo é importante para que seja estabelecido a porcentagem de peneira molecular a ser adicionada no meio reacional.

Os meios reacionais contendo álcool etílico e mistura de ácidos graxos saturados, bem como álcool etílico e óleo hidrolisado de peixe, apresentaram pH em torno de 5,5.

4.2 Determinação da atividade de esterificação das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*

A atividade de esterificação das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* foi medida a partir do consumo de ácido oleico. Conforme Figura 4.1, a concentração deste ácido foi acompanhada durante 72 h e os dados para cálculo do valor da atividade foram retirados do ponto referente a 24 h de reação.

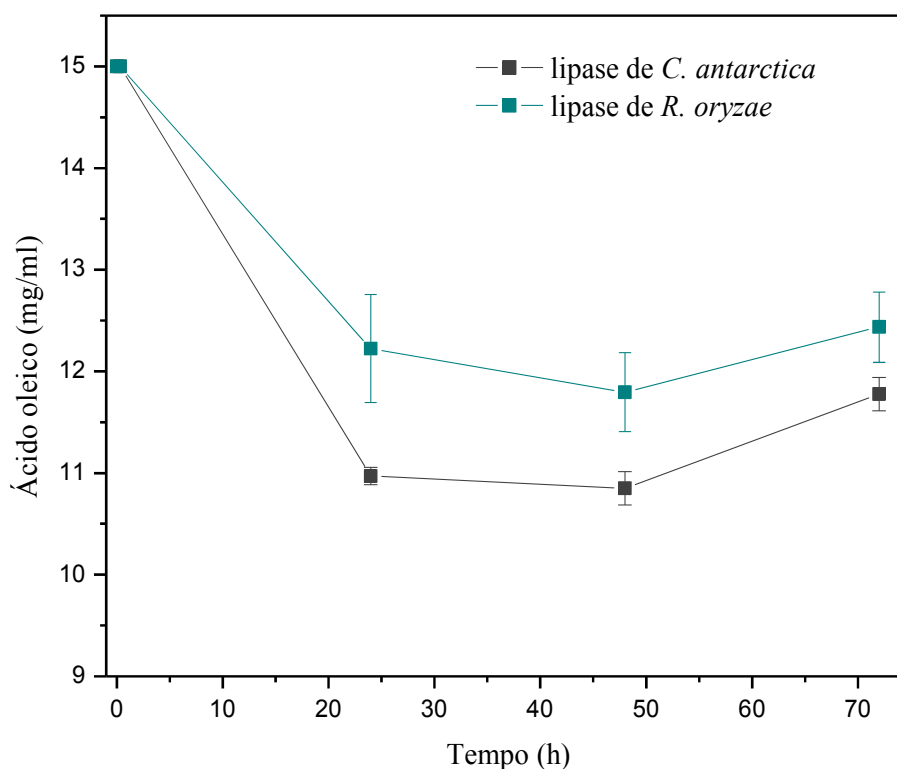


Figura 4.1 – Concentração de ácido oleico na reação de esterificação com etanol (razão molar álcool:ácido graxo 1:1), livre de solvente, a 40 °C e 200 rpm, utilizando 2 %m de catalisador, sem peneira molecular.

Inicialmente a concentração de ácido oleico decresce significativamente, resultado do consumo deste substrato pelo catalisador para a formação do éster oleato de etila. Como a reação de esterificação do ácido graxo com álcool envolve um equilíbrio, conforme Figura 4.2, a reação inversa de hidrólise do éster formado torna-se possível devido à presença de água, motivo pelo qual, é observado o aumento da concentração do ácido oleico a partir de um determinado tempo, o que torna evidente a ação das lipases utilizadas tanto na reação direta como na reação inversa (Meng *et al.*, 2011).

Como pode ser observado, é nítida a maior reatividade da lipase de *Candida antarctica*, a qual reduziu 26,9% a concentração de ácido oleico, enquanto que a lipase de *Rhizopus oryzae*, reduziu 18,5%, com 24 h de reação.

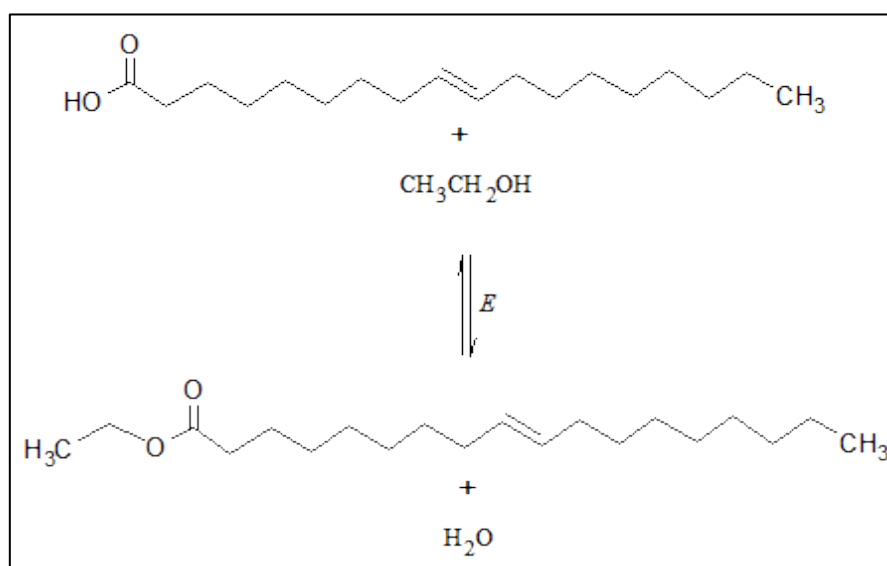


Figura 4.2 – Esquema representativo da reação de esterificação do ácido oleico e etanol para a formação do oleato de etila e água e reação inversa de hidrólise.

Um ponto importante a se destacar é que houve ausência de peneira molecular nas reações para determinação da atividade de esterificação, o que facilitou a reação inversa de hidrólise. Esse resultado mostrou a necessidade de ser utilizada peneira molecular para reduzir o efeito da água no meio reacional e, conseqüentemente, aumentar o rendimento de síntese do éster. Além disso, vale ressaltar que a água é originada não apenas da reação de esterificação, mas também é substância normalmente presente nos substratos utilizados (ácido oleico e álcool etílico).

A partir dos dados de consumo de ácido oleico com o tempo reacional, foi possível determinar a atividade de esterificação das lipases estudadas. A Tabela 4.2 apresenta tanto a atividade de esterificação obtida com 24 h de reação, bem como a atividade hidrolítica, informada pelo fornecedor.

Tabela 4.2 – Atividade de hidrólise e de esterificação das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*, obtida com a reação de ácido oleico e etanol (razão molar 1:1) a 40 ° C, 200 rpm e 2 %m de catalisador. O sistema foi livre de solvente e sem a presença de peneira molecular.

Enzima	Atividade hidrolítica* (U/g)	Atividade de esterificação (U/g)
lipase de <i>Candida antarctica</i> tipo B	2370	2855 ± 45
lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	367	1967 ± 386

* Dados fornecidos pela Sigma-Aldrich, utilizando glicerol tributirato como substrato a 40 ° C e pH 7,5.

De acordo com os dados apresentados, é possível observar a diferença no comportamento das lipases avaliadas, sendo a de *Candida antarctica* tipo B (CALB), a mais rápida no consumo de ácido oleico. Um fator que pode contribuir para a maior atividade desta enzima pode estar relacionado à tríade catalítica e à presença de um canal polipeptídico, denominado 'tampa'. Até o momento, essas informações só constam para a lipase de *Candida antarctica*, o que torna as explicações em torno da maior atividade desta, hipóteses a serem confirmadas.

Segundo Ollis *et al.* (1992), os aminoácidos serina, histidina, ácido aspártico/ácido glutâmico (Ser-His-Asp/Glu), conforme ilustrado na Figura 4.3, parecem ser comuns a todas as lipases. No caso da CALB, correspondem aos aminoácidos Ser-His-Asp (Jaeger *et al.*, 1994). Caso a lipase de *Rhizopus oryzae* seja diferente e possua ácido glutâmico ao invés de ácido aspártico, ou seja, possua a tríade Ser-His-Glu, não seria suficiente para uma variação tão considerável na atividade, tendo em vista que a diferença entre os respectivos ácidos é de apenas um carbono, o que não afeta o seu caráter ácido e, conseqüentemente, a sua reatividade. Dessa forma, a explicação pode estar em torno da estrutura da 'tampa' dessas lipases. Não se tem dados disponíveis para a lipase de *Rhizopus oryzae* até o momento, mas segundo Schrag *et al.* (1991), a tampa de CALB possui conformação aberta, bem pequena, e não isola o seu sítio ativo quando está na forma fechada.

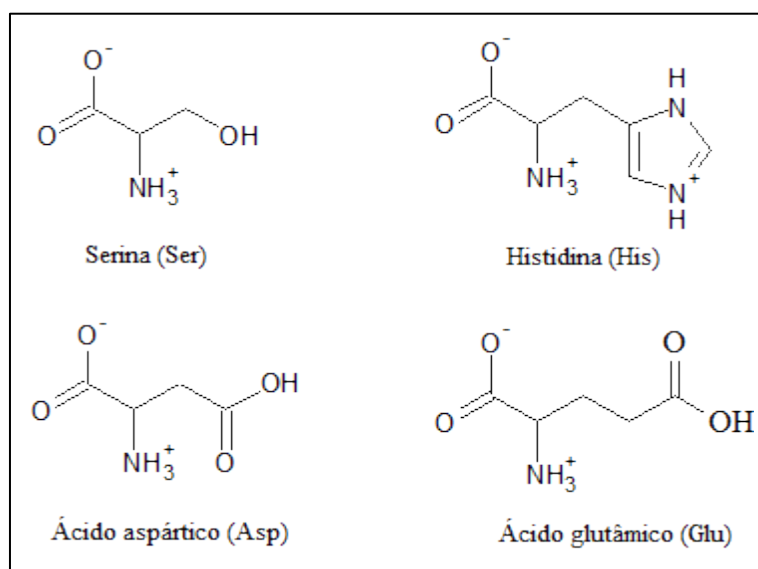


Figura 4.3 – Aminoácidos formadores da tríade catalítica das lipases (Ollis *et al.*, 1992) e suas respectivas abreviações.

4.3 Conversão de ácidos graxos presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia em ésteres etílicos e seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*

A análise da conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos, bem como a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* foi realizada através de estudo de variáveis importantes para o processo de esterificação enzimática. Todas as reações ocorreram por 24 h. No que diz respeito ao óleo hidrolisado de peixe tilápia, não foi possível detectar a presença dos ésteres etílicos dos ácidos mirístico e palmítico nas condições utilizadas para análise, provavelmente por representarem pequenas porcentagens. Da mesma forma, a quantificação dos ésteres etílicos linoleato e estearato, provavelmente presentes no meio reacional após 24 h de esterificação, não foi possível. Devido às semelhanças destes produtos em termos das propriedades físicas, as condições de análise não permitiram a visualização nos cromatogramas.

4.3.1 Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia

A faixa das variáveis selecionadas (temperatura, agitação, razão molar e quantidade de enzima) para a síntese de oleato de etila a partir do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe, está representada na Tabela 4.3. É válido ressaltar que as variáveis avaliadas estão incluídas nas que mais afetam a eficiência na síntese de ésteres etílicos (Silva *et al.*, 2011). Em destaque, pode-se observar as maiores conversões obtidas quando lipase tanto de *Candida antarctica* quanto de *Rhizopus oryzae* foram utilizadas.

De maneira geral, as conversões não ultrapassaram 55%, fato que pode ser explicado pela reversibilidade da reação de esterificação. Nesse ponto, a água tem papel duplamente importante: é essencial para a manutenção da conformação da lipase e da sua atividade catalítica (Tan *et al.*, 2006), porém, pode alterar o estado do equilíbrio reacional. Meng *et al.* (2011) discordaram e sugeriram que a água não possui efeito na atividade enzimática, mas apenas no equilíbrio da esterificação; no estudo, obtiveram 90% de conversão em ésteres etílicos, utilizando 9% (m/v) de peneira molecular.

Neste trabalho, vale salientar que a peneira molecular utilizada foi de 5 Å e que sua quantidade foi fixada em 5 %m para todos os ensaios de esterificação. Contudo, é importante estabelecer a quantidade ideal para que se obtenha o máximo de conversão,

evitando a possível perda de atividade enzimática pela falta de água, bem como o favorecimento da reação de hidrólise causada pela sua abundância.

Tabela 4.3 – Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2⁴ para estudo das variáveis selecionadas para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia a oleato de etila, utilizando lipase de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*.

Exp	T (°C)	Agitação (rpm)	Razão molar (álcool:ácido graxo)	Enzima (%m)	Conversão (%)	
					<i>C. antarctica</i>	<i>R. oryzae</i>
1	45	150	2:1	2	55,0	20,2
2	45	150	2:1	6	32,7	41,1
3	45	150	4:1	2	36,4	22,4
4	45	150	4:1	6	24,4	33,0
5	45	210	2:1	2	31,7	30,7
6	45	210	2:1	6	30,6	20,5
7	45	210	4:1	2	40,0	20,0
8	45	210	4:1	6	45,0	25,5
9	55	150	2:1	2	39,5	44,3
10	55	150	2:1	6	21,0	15,9
11	55	150	4:1	2	46,2	28,4
12	55	150	4:1	6	29,6	38,2
13	55	210	2:1	2	37,7	32,6
14	55	210	2:1	6	29,8	34,3
15	55	210	4:1	2	36,6	23,0
16	55	210	4:1	6	29,0	30,4
17	40	180	3:1	4	37,1	33,10
18	60	180	3:1	4	28,0	28,0
19	50	120	3:1	4	33,0	26,8
20	50	240	3:1	4	46,2	34,2
21	50	180	1:1	4	16,1	31,1
22	50	180	5:1	4	36,1	26,0
23	50	180	3:1	0	0,0	0,0
24	50	180	3:1	8	7,0	6,0
25(C)	50	180	3:1	4	40,3	28,8
26(C)	50	180	3:1	4	37,1	29,7

* Em negrito, consta a maior conversão obtida para cada lipase utilizada.

Dos 26 resultados obtidos, 58% dos maiores valores de conversão pertenceram à lipase de *Candida antarctica*, 23% à de *Rhizopus oryzae* e 19% representaram valores semelhantes para os dois biocatalisadores. É importante ressaltar que a quantidade de enzima em cada reação foi calculada em termos de massa/massa. Tomando como exemplo o experimento 1 da Tabela 4.3, a mesma quantidade em massa, tanto de lipase de *Candida antarctica* como de *Rhizopus oryzae*, foi adicionada ao meio, porém, a atividade em U/g variou no meio reacional. Como apresentado na Tabela 4.2, a primeira enzima é aproximadamente 145% mais ativa frente à esterificação, o que explica seus melhores valores de conversão observados nesse planejamento.

4.3.1.1 Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia utilizando lipase de *Candida antarctica*

De acordo com a Figura 4.4, a quantidade de enzima (Q) é a variável mais significativa para a conversão do ácido oleico a oleato de etila (efeito - 13,13), seguido da interação entre agitação (L) e quantidade de enzima (L) (efeito + 6,31), quantidade de enzima (L) (efeito - 6,0) e razão molar (L) (efeito + 4,41), onde (L) representa a interação linear e (Q) a interação quadrática das variáveis. Na presença dos efeitos de interação, as variáveis não podem ser avaliadas separadamente.

Com nível de significância de 85%, o efeito quadrático da quantidade de enzima foi o mais relevante (- 13,13). Seu resultado negativo implica que a conversão de ácidos graxos em ésteres etílicos é crescente com o aumento da quantidade de catalisador, mas que a partir de um determinado ponto, se esta quantidade aumentar, a conversão decrescerá. Uma provável explicação está fundamentada na dificuldade de acesso aos sítios ativos, devido ao aglomerado de enzimas, ou seja, considerando que os substratos precisam estar orientados adequadamente no sítio ativo para que a reação inicie, é provável que, nas condições avaliadas, a orientação dos grupos reativos enzimáticos e dos reagentes não favoreceram a interação.

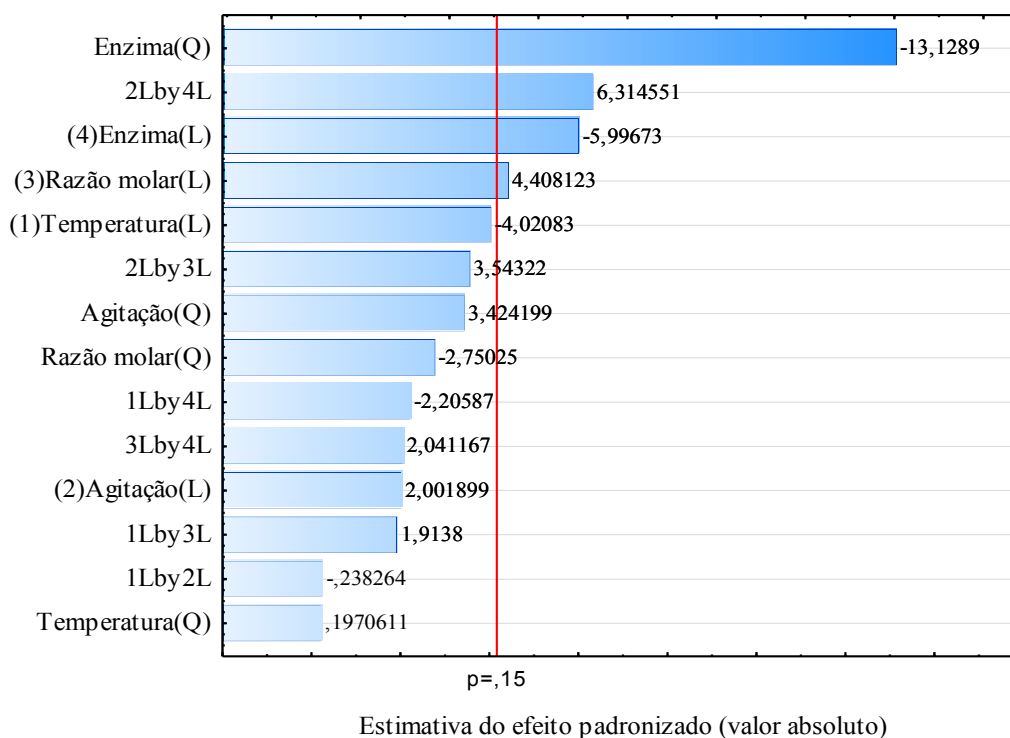


Figura 4.4– Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão do ácido oleico presente no óleo de peixe utilizando lipase de *Candida antarctica*.

Uma outra possível explicação consiste no fato de que a reação de esterificação tenha ocorrido com conversões crescentes até enquanto a quantidade de éster formado não foi o suficiente para competir com os substratos ácido oleico e etanol pelo sítio ativo da enzima. Mas, a partir do momento em que o éster se acumulou e começou a interagir com a água (originada tanto da reação de esterificação como da composição do óleo: $1183 \pm 20,5 \mu\text{L/L}$), a reação de hidrólise reduziu os valores de conversão do ácido oleico em oleato de etila.

Antes da reação de esterificação, Meng *et al.* (2011) avaliaram a composição em água da mistura: óleo hidrolisado de soja e etanol, obtendo 147 a 153 $\mu\text{L/L}$, com a qual atingiram conversões acima de 80%, variando a quantidade de peneira molecular em relação ao volume reacional. Portanto, como a reação analisada é reversível e considerando a presença de água na composição do óleo hidrolisado de peixe tilápia, além da que é gerada na reação de esterificação, justifica-se a redução na conversão quando a quantidade de enzima foi elevada, pois a reação de hidrólise foi favorecida.

Outro efeito significativo quando considerado 85% de confiança foi a razão molar (L). Seu efeito positivo (4,41) pode estar associado à maior disponibilização do substrato álcool para o ataque ao complexo enzima acetilada (E-Ac), favorecendo a reação em cadeia

de esterificação do ácido oleico, conforme descrito no capítulo 2 - seção 2.4. Assim, a conversão tendeu a aumentar com o aumento da quantidade de etanol no meio reacional.

Além disso, agitação (L) e (Q), razão molar (Q), temperatura (Q) e todas as interações, com exceção daquela entre agitação e quantidade de enzima, não foram significativas para a síntese do éster de ácido oleico nos limites avaliados, como também pode ser visualizado na Tabela 4.4. Nesta, os efeitos significativos foram destacados em negrito.

Tabela 4.4 – Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Candida antarctica*, com nível de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	p
Média das interações	38,70	1,61	0,03
(1) Temperatura (L)	- 1,87	0,46	0,15
Temperatura (Q)	0,11	0,54	0,88
(2) Agitação (L)	0,93	0,46	0,29
Agitação (Q)	1,87	0,54	0,18
(3) Razão molar (L)	2,05	0,46	0,14
Razão molar (Q)	- 1,50	0,54	0,22
(4) Quantidade de Enzima (L)	- 2,79	0,46	0,10
Quantidade de Enzima (Q)	- 7,15	0,54	0,05
1 x 2	- 0,13	0,57	0,85
1 x 3	1,09	0,57	0,31
1 x 4	- 1,25	0,57	0,27
2 x 3	2,02	0,57	0,17
2 x 4	3,59	0,57	0,10
3 x 4	1,16	0,57	0,29

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

A Tabela 4.5 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo da conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Candida antarctica*.

Um bom modelo precisa ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa, com valores de F_{tab} inferiores ao do F_{calc} . Este estudo indicou que o modelo não é estatisticamente significativo, pois o F obtido do modelo (F_{calc}) para 85% de intervalo de confiança não foi superior ao F_{tab} . Uma outra forma de observar a variação em torno da média é explicada pelo coeficiente de correlação R^2 , o qual representa a fração da variação que é

explicada pela falta de ajuste do modelo, ou seja, quanto mais próximo do valor 1 o coeficiente estiver, melhor estará o ajuste do modelo às respostas avaliadas (Teófilo e Ferreira, 2006).

Tabela 4.5 – ANOVA para o modelo da conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Candida antarctica*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{cal}
Regressão	2982,29	24	124,26	23,97
Resíduo	1264,02	11	114,91	
Falta de ajuste (FA)	1258,83	10	125,88	
Erro Puro (EP)	5,18	1	5,18	
Total	3541	25		
R²	0,64			
F_{tab}				^a F _(24,1) = 27,36
(85% de confiança)				

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

A superfície de resposta da conversão em função da razão molar e da quantidade de enzima está representada na Figura 4.5. Nesta, pode-se observar que as variáveis não apresentam efeitos lineares para a resposta conversão, ou seja, a obtenção de oleato de etila a partir do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Candida antarctica*, não pode ser avaliada de forma linear e direta.

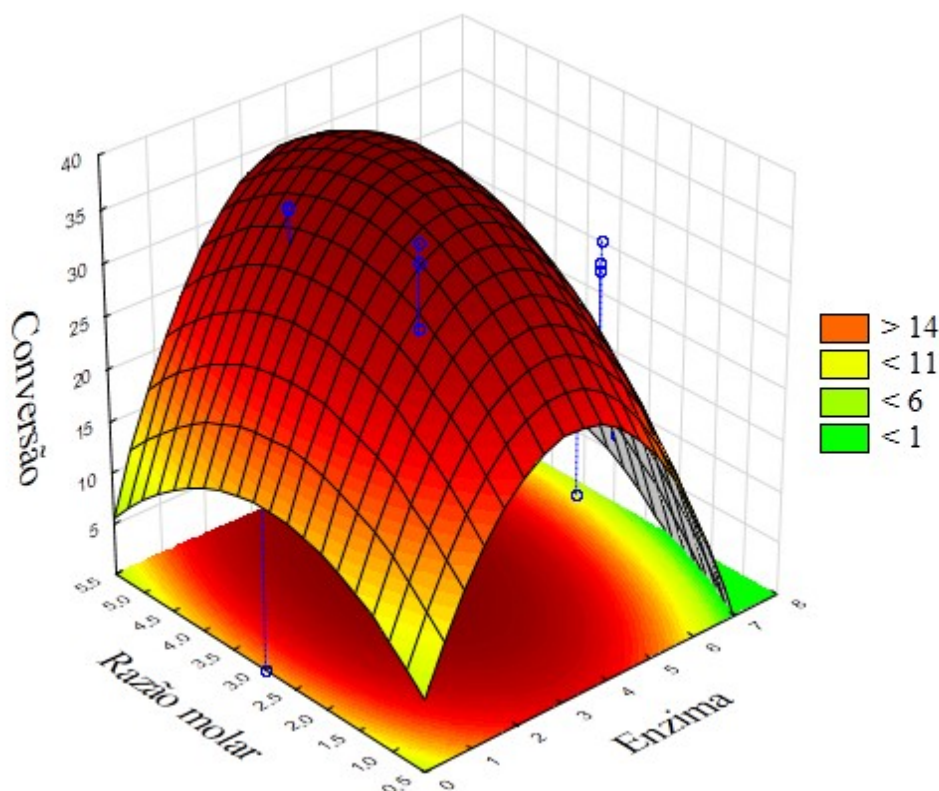


Figura 4.5 – Superfície de resposta para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, em função da razão molar e quantidade de enzima, utilizando lipase de *Candida antarctica* a 50 °C, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

Considerando a faixa de condições selecionada para este estudo, a superfície de resposta indicou que a conversão de ácido oleico aumentou enquanto se utilizou até 4 %m de enzima. Quando sua porcentagem ultrapassou 4 %m, mais água foi acumulada no meio reacional e juntamente com o éster oleato de etila, competiu com os substratos ácido oleico e etanol pelo sítio ativo da lipase de *Candida antarctica*, favorecendo a reação inversa de hidrólise. Além disso, em razões molares álcool:ácido graxo 3:1, a conversão aumentou aproximadamente cinco vezes quando a quantidade de catalisador diminuiu de 8 para 4 %m, a 50 °C e 180 rpm.

4.3.1.2 Planejamento experimental para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*

A Figura 4.6 apresenta o gráfico de Pareto para os efeitos padronizados com 85% de confiança ($p < 0,15$). A quantidade de enzima (Q) foi a variável mais significativa para a conversão do ácido oleico a oleato de etila, possuindo efeito negativo (37,89). Da mesma

forma, também possuíram efeito negativo a interação entre temperatura (L) e quantidade de enzima (L) (14,54), razão molar (L) (9,62) e interação entre agitação e razão molar (7,96).

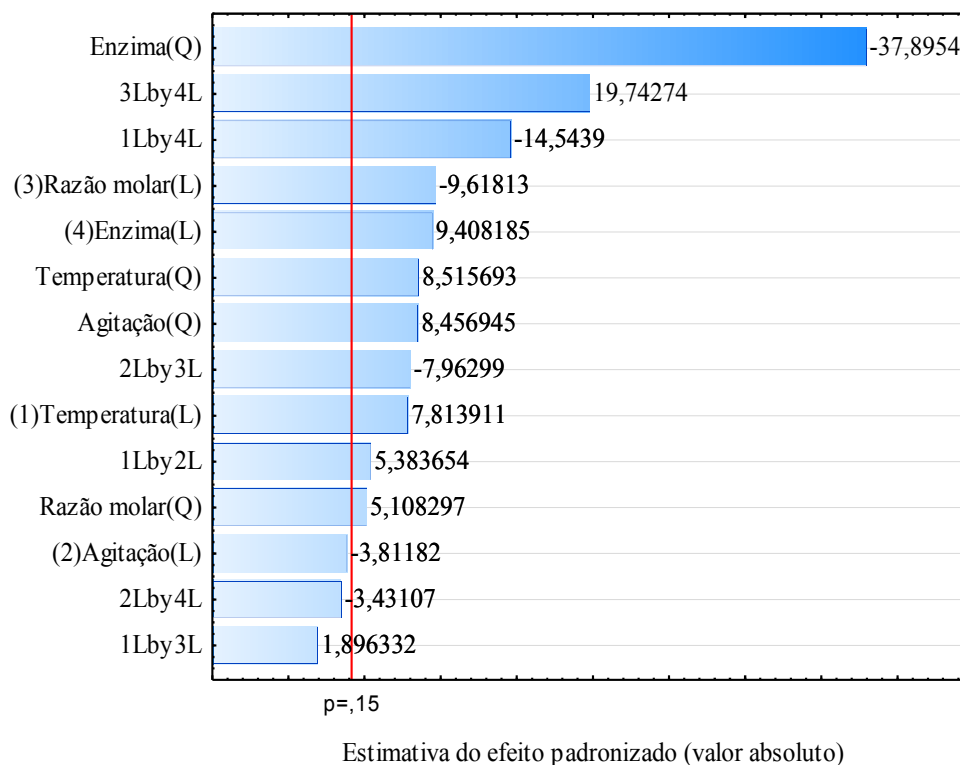


Figura 4.6 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Assim como foi observado quando as mesmas condições de síntese foram aplicadas à lipase de *Candida antarctica*, a quantidade de enzima apresentou efeito quadrático negativo (37,89). Nas condições avaliadas, a síntese de éster aumentou com o aumento da quantidade de enzima até um determinado percentual no meio reacional, depois desse valor, a conversão decresceu. Como mencionado anteriormente, esse resultado pode estar relacionado a dois fatores:

- a) grande quantidade de água e conseqüente hidrólise;
- b) orientação inadequada dos reagentes no sítio ativo enzimático.

À medida que a quantidade de etanol no meio reacional aumentou, a conversão diminuiu. É o que está implícito no efeito linear negativo da razão molar. A proporção entre etanol:ácido graxo é de fundamental importância para a reação de esterificação e ainda é amplamente estudada (Kuo *et al.*, 2012; Pan *et al.* 2012; Vazquez *et al.* 2012), nesse contexto, deve-se encontrar a proporção adequada, tendo em vista que em pequenas quantidades pode desfavorecer a reação de esterificação, devido à pequena interação com o complexo enzima-acetilada (Capítulo 2 - Figura 2.3), importante para a finalização do processo reacional, e em grande quantidade, pode desnaturar proteínas, portanto, enzimas (Meng *et al.*, 2011).

Entretanto, a interação entre razão molar e quantidade de enzima apresentou efeito positivo (19,74), indicando que a redução da conversão causada pela hidrólise pode ser reduzida se a quantidade de etanol aumentar proporcionalmente em relação à quantidade de enzima. Isso pode ter ocorrido porque em maior quantidade, o álcool compete com mais vantagem do que o éster recém formado pelo sítio ativo da enzima, favorecendo a reação direta de esterificação, uma vez que sua molécula é menor e mais fácil de se encaixar no sítio ativo da enzima do que a molécula de éster.

Efeito negativo também foi observado na interação entre temperatura (L) e quantidade de enzima (L) (14,54), o que sinaliza a sensibilidade das proteínas em relação ao calor. As proteínas, portanto, as enzimas, são formadas por cadeias polipeptídicas, as quais mantêm sua estabilidade graças a interações intra e intercadeia, tais como, ponte dissulfeto, interação hidrofóbica e ponte de hidrogênio, que podem ser rompidas com o calor. Apesar de a estabilidade térmica de enzimas imobilizadas ser superior a de enzimas livres (Rodrigues *et al.*, 2008), não se pode descartar a hipótese de que a lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae* utilizada, tenha sido sensível à faixa de temperatura selecionada para esse estudo.

Com 85% de intervalo de confiança, apenas o efeito da agitação (L), a interação entre temperatura e razão molar, bem como entre agitação e quantidade de enzima não foram significativas para a conversão do ácido oleico obtido do óleo hidrolisado de peixe tilápia, nos limites avaliados, conforme Tabela 4.6. Os efeitos significativos foram destacados na Tabela para melhor visualização.

Tabela 4.6 – Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, com nível de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	<i>p</i>
Média das interações	29,26	0,44	0,01
(1) Temperatura (L)	0,99	0,13	0,08
Temperatura (Q)	1,27	0,15	0,07
(2) Agitação (L)	-0,48	0,13	0,16
Agitação (Q)	1,26	0,15	0,07
(3) Razão molar (L)	-1,22	0,13	0,06
Razão molar (Q)	0,76	0,15	0,12
(4) Quantidade de Enzima (L)	1,19	0,13	0,07
Quantidade de Enzima (Q)	-5,64	0,15	0,02
1 x 2	0,84	0,15	0,12
1 x 3	0,29	0,15	0,31
1 x 4	-2,26	0,15	0,04
2 x 3	-1,24	0,15	0,08
2 x 4	-0,53	0,15	0,18
3 x 4	3,07	0,15	0,03

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

A Tabela 4.7 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo da síntese do oleato de etila, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*. Nesse caso, o valor de F_{tab} foi bem inferior ao do F_{calc} . Este estudo indica que o modelo é estatisticamente significativo, de acordo com o F_{tab} para 85% de confiança, porém, o valor de R^2 foi de 0,62, o que implica na falta de ajuste do modelo às respostas avaliadas. Devido à isso, a equação não foi construída.

Tabela 4.7 – ANOVA para o modelo da conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}
Regressão	1882,69	24	78,44	202,60
Resíduo	887,26	11	80,66	
Falta de ajuste (FA)	886,90	10	88,69	
Erro Puro (EP)	0,39	1	0,39	
Total	2367,21	25		
R²	0,62			
F_{tab} (85% de confiança)				^a F _(24,1) = 27,36

$$^a F_{calc} \text{ para a falta de ajuste} = MQ_{FA}/MQ_{EP}$$

A Figura 4.7 apresenta a superfície de resposta em função da temperatura e da quantidade de enzima, as quais apresentaram efeitos significativos quando considerado 85% de confiança ($p < 0,15$).

Como era esperado, as conversões mais baixas foram obtidas quando pequena quantidade de enzima foi utilizada a baixas temperaturas, ou seja, temperatura mais baixa implica em menos energia no sistema e quanto menos catalisador no meio reacional, menor a velocidade das reações realizadas. Utilizando 2 %m de catalisador e mantendo-se fixas a agitação em 150 rpm e razão molar álcool:ácido graxo 2:1, a conversão aumentou aproximadamente 119% quando a temperatura aumentou de 45 para 55 °C.

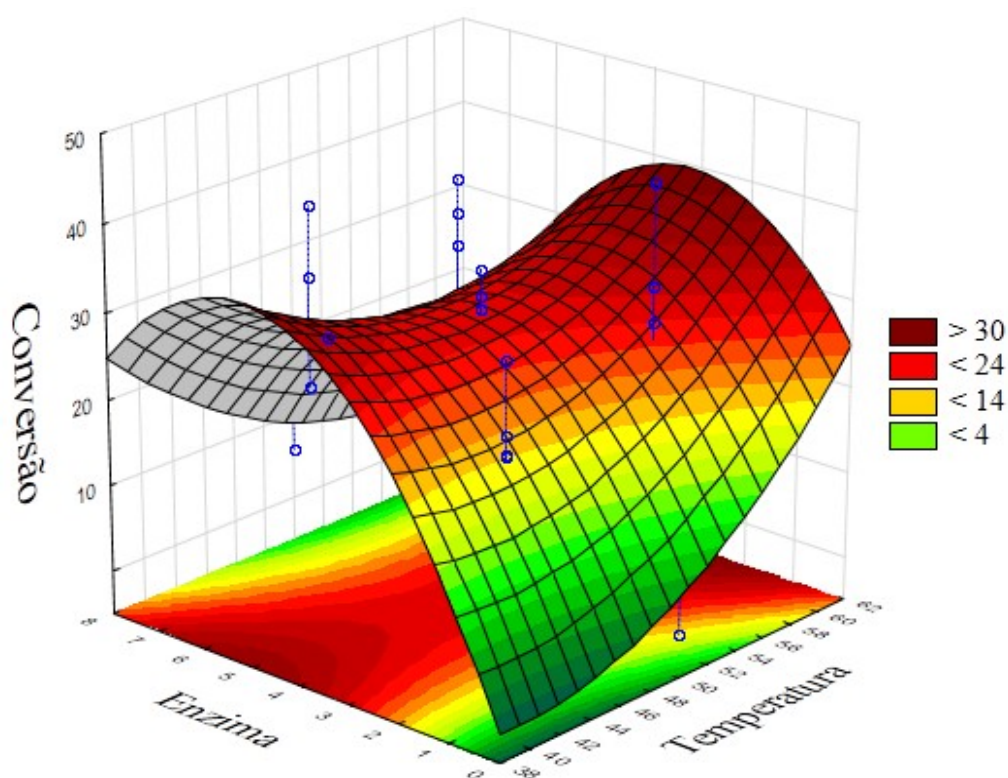


Figura 4.7 – Superfície de resposta para a conversão de ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia em função da temperatura e da quantidade de enzima, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, razão molar 3:1, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

Na temperatura de 50 °C e com 180 rpm de agitação, a síntese de éster etílico foi dificultada quando grande quantidade de enzima foi associada a pequena razão molar. Nestas condições, a síntese de éster etílico atingiu apenas 6% de conversão, valor proporcional à quantidade de interações enzima acetilada-álcool. Também houve redução da conversão quando pequenas proporções enzimáticas foram estudadas com razões molares altas, situação inversa, na qual a saturação enzimática ocorreu ou a quantidade de álcool foi suficiente para inibir a lipase. Isso explica os melhores resultados quando razão molar e quantidade de enzima foram aumentadas simultaneamente, convertendo quatro vezes mais ácido oleico em oleato de etila.

4.3.1.3 Comparação entre as conversões obtidas utilizando as lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* no óleo hidrolisado de peixe tilápia

Um dado interessante foi observado fixando-se a razão molar em 4:1 e a agitação em 150 rpm. Para uma determinada temperatura, a maior conversão foi obtida com a lipase de *Candida antarctica* quando utilizado 2 %m de catalisador, mas quando a quantidade de enzima foi aumentada para 6 %m, a maior conversão obtida foi com a lipase de *Rhizopus oryzae*, conforme apresenta a Figura 4.8.

A 45 °C, a lipase de *Candida antarctica* reduziu a conversão em aproximadamente 32%, quando a sua porcentagem (%m) foi aumentada de 2 para 6%. Já a lipase de *Rhizopus oryzae* aumentou a síntese de oleato de etila em 31%, quando a porcentagem foi alterada da mesma forma. A 55 °C, a tendência foi mantida e a conversão decresceu 21% quando a quantidade de lipase de *Candida antarctica* foi aumentada de 2 para 6 %m, bem como aumentou de 27% seguindo o mesmo crescimento percentual de enzima, quando utilizada a lipase de *Rhizopus oryzae*.

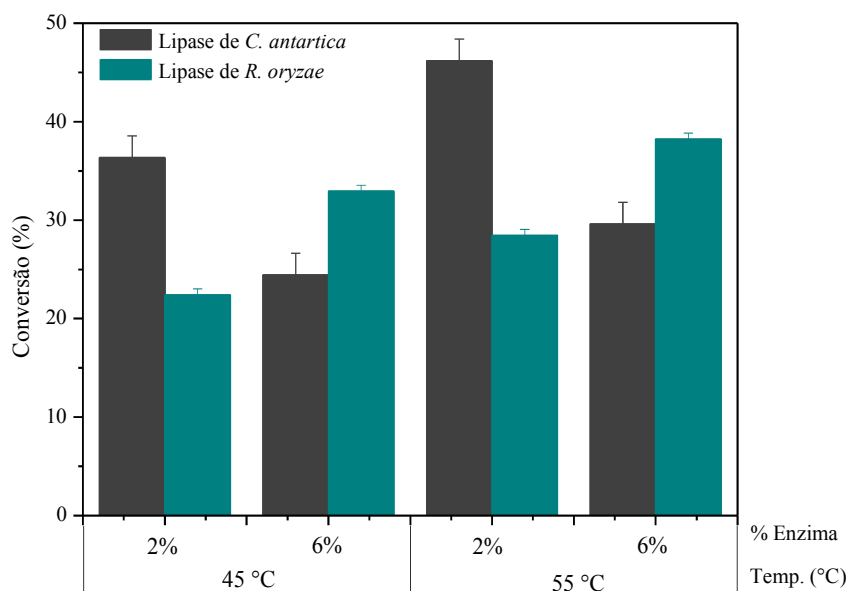


Figura 4.8 – Comparação da conversão de ácido oleico presente no óleo de peixe hidrolisado, utilizando lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Rhizopus oryzae*, razão molar 4:1, 150 rpm, variando a temperatura: 45 e 55 °C e a quantidade de enzima: 2 e 6 (%m).

A lipase de *Rhizopus oryzae* agiu de acordo com o esperado, ou seja, quando sua quantidade foi aumentada no meio reacional, a conversão seguiu proporcionalmente. Se o catalisador foi a lipase de *Candida antarctica*, aumentando-se a sua quantidade, a conversão diminuiu. Uma explicação consiste no favorecimento da reação inversa, na qual o éster formado é hidrolisado, diminuindo as taxas de conversão.

Diante disso, é válido relembrar os dados de atividade de esterificação e de hidrólise expostos na Tabela 4.2, a qual mostra que a lipase de *Candida antarctica* possui atividades de esterificação e de hidrólise maiores do que a lipase de *Rhizopus oryzae*.

Tendo em vista que a lipase de *Rhizopus oryzae* esterifica o ácido oleico mais lentamente do que a lipase de *Candida antarctica*, no tempo avaliado, a quantidade de éster formado com o aumento da quantidade de enzima não foi o suficiente para reverter significativamente a reação, o que não acarretou em redução dos valores de conversão. Já a lipase de *Candida antarctica*, por ser mais ativa, com o mesmo tempo de reação, formou mais éster etílico do que a lipase de *Rhizopus oryzae* quando a sua quantidade foi aumentada no meio reacional. Isso a fez reagir tanto com o ácido como com o éster, o que reduziu os valores de conversão.

Contudo, mesmo reagindo na reação direta e inversa, de forma geral, a lipase de *Candida antarctica* ainda conseguiu converter mais ácido oleico em oleato de etila do que a lipase de *Rhizopus oryzae*, resultado que pode ser visualizado nos maiores valores de conversão, expostos na Tabela 4.3.

Dentro dos limites estudados e considerando 85% de intervalo de confiança, mais variáveis significativas foram encontradas para o modelo de conversão da lipase de *Rhizopus oryzae* (Tabelas 4.4 e 4.6). Esse dado pode revelar que esta lipase pode ser mais sensível do que a lipase de *Candida antarctica* às alterações do meio reacional.

4.3.2 Planejamento experimental para a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* no óleo hidrolisado de peixe tilápia

A Tabela 4.8 apresenta o planejamento experimental para o estudo das variáveis selecionadas para avaliar a seletividade em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0).

Neste estudo, seletividade maior do que 1 implicou que a enzima preferiu o ácido graxo insaturado, C18:1 (ácido oleico), ao ácido graxo saturado C20:0 (ácido eicosanóico). Seletividade igual a 1 significa que não houve diferença na preferência pelos ácidos

mencionados e finalmente, seletividade inferior a 1 implica na maior concentração de éster do ácido C20:0, ou seja, seletividade maior para o ácido eicosanóico. Em destaque, pode-se observar os maiores valores de seletividade obtidos para as lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*.

Tabela 4.8– Resultados do planejamento experimental composto central 2⁴ para a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia.

Exp	T (°C)	Agitação (rpm)	Razão molar (álcool:ácido graxo)	Enzima (%m)	Seletividade <i>C. antarctica</i>	Seletividade <i>R. oryzae</i>
1	45	150	2:1	2	1,09	0,61
2	45	150	2:1	6	0,82	0,95
3	45	150	4:1	2	0,82	0,48
4	45	150	4:1	6	0,76	0,54
5	45	210	2:1	2	0,80	0,65
6	45	210	2:1	6	0,85	0,68
7	45	210	4:1	2	0,81	0,67
8	45	210	4:1	6	1,17	0,62
9	55	150	2:1	2	0,67	1,39
10	55	150	2:1	6	0,53	0,56
11	55	150	4:1	2	0,85	0,45
12	55	150	4:1	6	0,82	0,85
13	55	210	2:1	2	0,47	0,29
14	55	210	2:1	6	0,57	0,70
15	55	210	4:1	2	0,84	0,26
16	55	210	4:1	6	0,50	0,57
17	40	180	3:1	4	0,73	0,74
18	60	180	3:1	4	0,74	0,47
19	50	120	3:1	4	0,44	0,85
20	50	240	3:1	4	0,57	0,79
21	50	180	1:1	4	0,61	0,45
22	50	180	5:1	4	0,86	0,48
23	50	180	3:1	0	0,00	0,00
24	50	180	3:1	8	0,75	0,40
25(C)	50	180	3:1	4	0,76	0,52
26(C)	50	180	3:1	4	0,61	0,53

* Em negrito, consta o maior valor de seletividade obtido para cada lipase utilizada.

É válido lembrar que a composição em ácidos graxos do óleo hidrolisado de peixe tilápia é de 32,4% de ácido oleico e 7,5% de ácido eicosanóico (Tabela 4.1) e que mesmo o ácido insaturado prevalecendo no meio, dos 26 ensaios, a lipase de *Candida antarctica* apresentou 92,3% dos seus resultados inferiores a 1, enquanto a de *Rhizopus oryzae*, 96,1%, o que caracteriza a preferência de ambas as enzimas pelo ácido saturado (C20:0). Esse resultado contraria o resultado obtido por Da Rós *et al.* (2012), em seu estudo de síntese enzimática de biodiesel, que também é um éster de ácido graxo, no qual afirmaram que a lipase de *Candida antarctica* converte igualmente ácidos graxos saturados e insaturados nos respectivos ésteres. Nesse caso, é preciso avaliar as condições utilizadas, tendo em vista que todas as variáveis são importantes e influenciam diretamente no funcionamento da enzima. Portanto, não é possível fazer uma comparação direta com os referidos autores, uma vez que eles utilizaram solvente em seu meio reacional, enquanto que neste trabalho, todos os sistemas reacionais foram livres desse componente.

Uma explicação para a preferência das enzimas pelo ácido eicosanóico está relacionado à geometria espacial dos ácidos envolvidos. Na Figura 4.9 é possível observar que o ácido eicosanóico possui menor impedimento estérico do que o ácido oleico, o qual apresenta angulosidade na sua estrutura devido à insaturação. Dessa forma, o grupo funcional do ácido saturado pode alcançar o sítio ativo enzimático mais facilmente, mesmo estando em menor proporção, formando mais complexo enzima-acetilada e, conseqüentemente, diminuindo a seletividade.

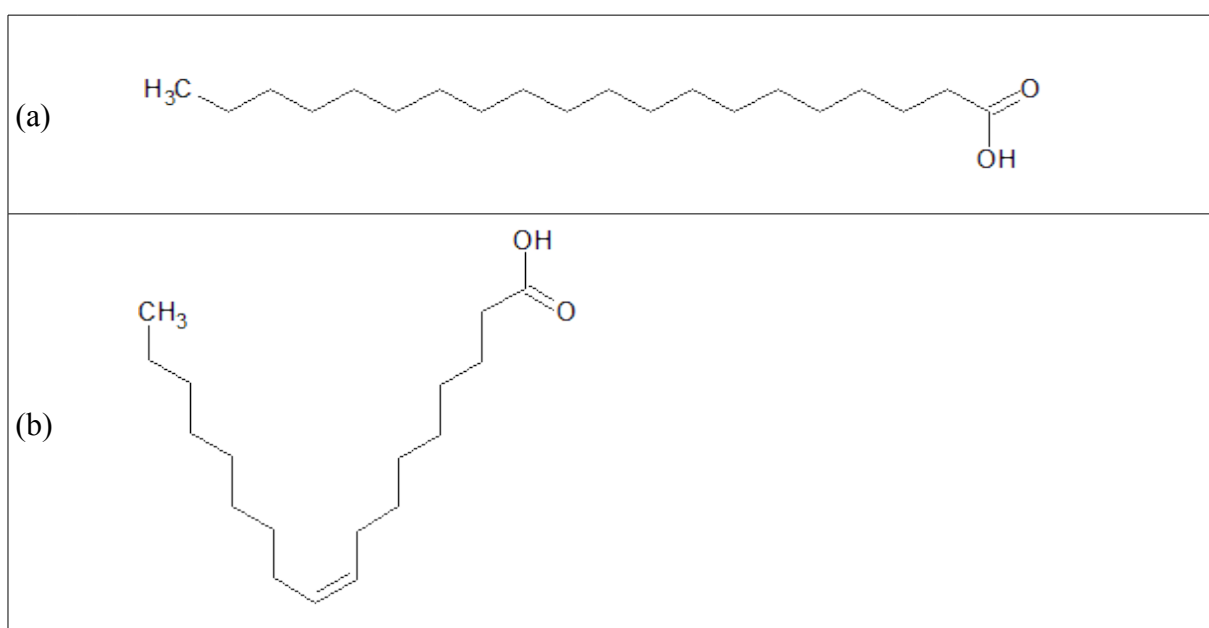
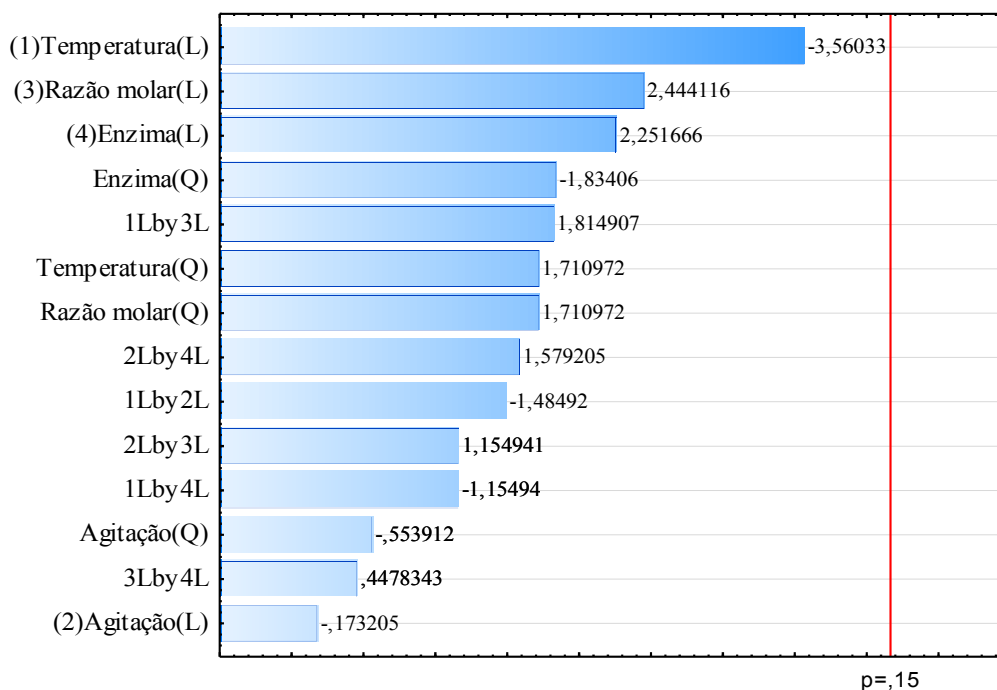


Figura 4.9 – Estrutura espacial dos ácidos graxos (a) ácido eicosanóico (C20:0) e (b) ácido oleico (C18:1).

No entanto, é possível observar que, nas condições avaliadas, 61,6% dos valores de seletividade foram maiores para a lipase de *Candida antarctica*, 19,2% para a de *Rhizopus oryzae* e 19,2% foi praticamente o mesmo valor para as duas enzimas. Ou seja, mesmo que ambos os catalisadores tenham preferência pelo ácido saturado eicosanóico, a lipase de *Rhizopus oryzae* preferiu mais.

4.3.2.1 Planejamento experimental para a seletividade da lipase de *Candida antarctica* em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia

De acordo com a Figura 4.10, com nível de significância de 85% ($p < 0,15$), nenhuma variável foi significativa nas condições selecionadas para este estudo. Dentro da faixa avaliada, não houve sensibilidade por parte da lipase de *Candida antarctica* para detectar as alterações do meio.



Estimativa do efeito padronizado (valor absoluto)

Figura 4.10 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade da lipase de *Candida antarctica* em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0), presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia.

Embora não tenha havido muita influência das condições operacionais para a atividade enzimática frente aos diferentes ácidos avaliados, foi mostrado que é possível aumentar ou diminuir a seletividade para ácidos graxos específicos. Conforme Figura 4.11, a lipase de *Candida antarctica* tende a preferir o ácido insaturado (ácido oleico - C18:1), quando temperaturas em torno de 40 °C são associadas a quantidade de enzimas a partir de 2 %m no meio reacional.

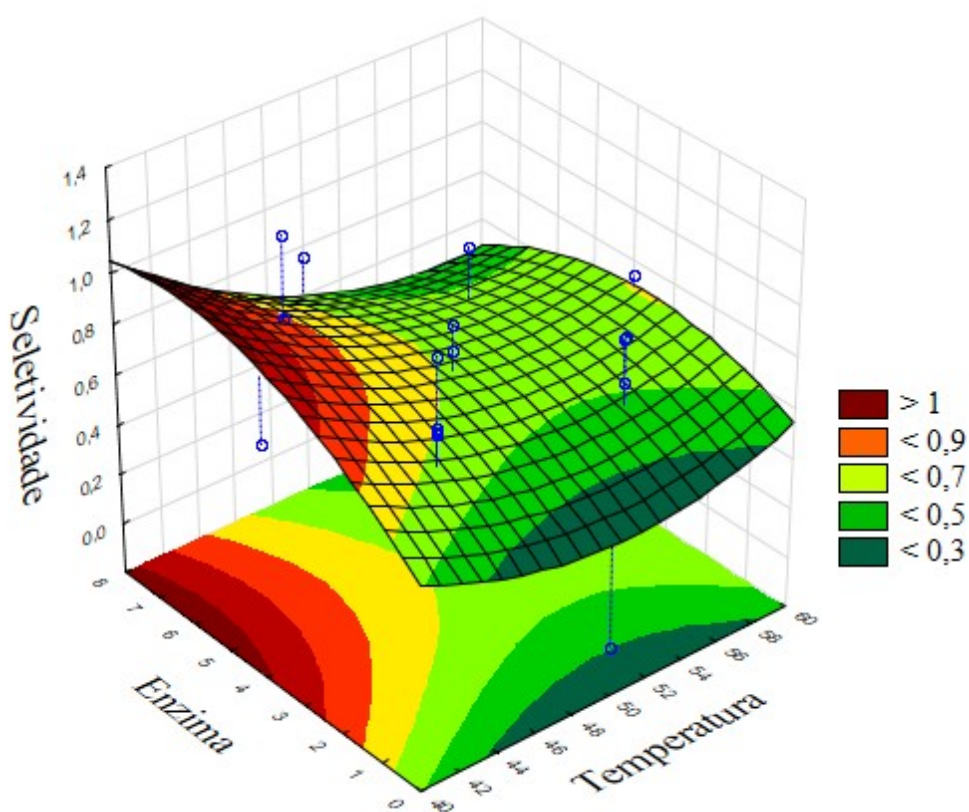


Figura 4.11 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de *Candida antarctica* em função da temperatura e da quantidade de enzima, utilizando razão molar 3:1, 180 rpm, 5% de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24h, no meio reacional composto por óleo hidrolisado de peixe tilápia.

A Tabela 4.9 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo quadrático da seletividade da lipase de *Candida antarctica* para a síntese de oleato de etila e do éster de ácido eicosanóico (C20:0). Em destaque, os efeitos significativos com 85% de intervalo de confiança.

Tabela 4.9 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de *Candida antarctica* para a síntese dos ésteres de ácido oleico (C18:1) e de ácido eicosanóico (C20:0), com nível de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	<i>p</i>
Média das interações	0,68	0,07	0,07
(1) Temperatura (L)	- 0,08	0,02	0,17
Temperatura (Q)	0,04	0,02	0,34
(2) Agitação (L)	- 0,003	0,02	0,89
Agitação (Q)	- 0,01	0,02	0,68
(3) Razão molar (L)	0,05	0,02	0,24
Razão molar (Q)	0,04	0,02	0,34
(4) Quantidade de Enzima (L)	0,05	0,02	0,27
Quantidade de Enzima (Q)	- 0,05	0,02	0,32
1 x 2	- 0,04	0,03	0,38
1 x 3	0,05	0,03	0,32
1 x 4	- 0,03	0,03	0,45
2 x 3	0,03	0,03	0,45
2 x 4	0,04	0,03	0,36
3 x 4	0,01	0,03	0,73

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

A Tabela 4.10 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo da seletividade da lipase de *Candida antarctica*. O valor de F da regressão calculado foi bem menor do que o F_{tab} , podendo-se considerar o modelo estatisticamente insignificante para a apresentação do modelo matemático, considerando 85% de intervalo de confiança. Nas condições avaliadas, o valor de R^2 foi de 0,46, o que implica na falta de ajuste do modelo às respostas avaliadas.

Tabela 4.10 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de *Candida antarctica* em relação aos ácidos graxos oleico (C18:1) e eicoanóico (C20:0).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}
Regressão	1,17	24	0,05	4,34
Resíduo	0,69	11	0,06	
Falta de ajuste (FA)	0,67	10	0,067	
Erro Puro (EP)	0,01	1	5,18	
Total	1,27	25		
R²	0,46			
F_{tab} (85% de confiança)				^a F _(24,1) = 27,36

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

4.3.2.2 Planejamento experimental para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0) presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia

A Figura 4.12 apresenta o gráfico de Pareto para os efeitos padronizados com 85% de intervalo de confiança ($p < 0,15$). A agitação (Q) foi a variável mais significativa para a seletividade, possuindo efeito positivo (55,33), seguida da interação entre temperatura e agitação, a qual apresentou efeito negativo (51,97).

Da mesma forma, também possuem efeito positivo a quantidade de enzima (L) (42,43), interação entre agitação e razão molar (35,00), razão molar e quantidade de enzima (27,22), agitação e quantidade de enzima (25,81) e temperatura (Q) (23,57). Com o mesmo nível de confiança, apenas a interação entre temperatura e quantidade de enzima, bem como a razão molar (Q) não foram significativos nas condições avaliadas.

É válido ressaltar que neste estudo, a seletividade foi dada pela relação entre o éster do ácido oleico e o éster do ácido eicosanóico, portanto, quanto maior o seu valor, mais a enzima preferiu o ácido oleico, ou seja, o ácido insaturado.

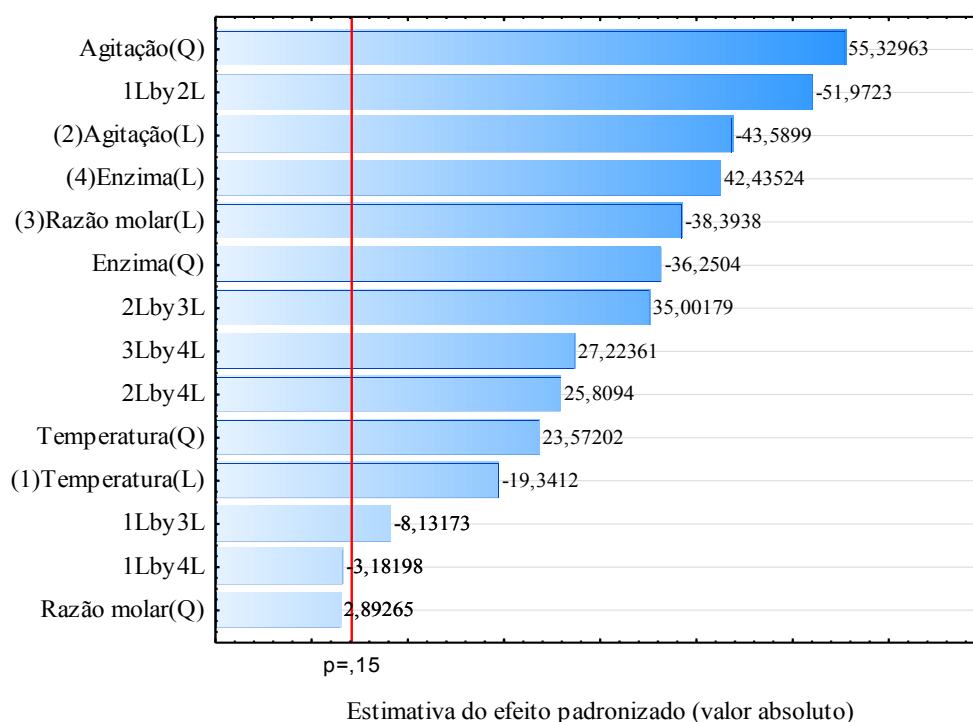


Figura 4.12 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0), presentes no óleo hidrolisado de peixe tilápia.

Quanto aos resultados observados no gráfico de Pareto da Figura 4.12, a agitação possuiu efeito quadrático positivo na seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae*. Ou seja, mesmo possuindo afinidade maior pelo ácido eicosanóico, conforme Tabela 4.8, a agitação contribuiu para maior contato do ácido insaturado com o sítio ativo da lipase de *Rhizopus oryzae*, o que pode ser explicado pelo efeito que ela tem de proporcionar maior interação entre as moléculas do substrato e do catalisador, favorecendo a escolha daquele que está em maior quantidade, no caso, o ácido oleico.

A quantidade de enzima apresentou efeito linear positivo (42,43), ou seja, quanto mais enzima no meio, maior foi a preferência da lipase de *Rhizopus oryzae* pelo ácido oleico, o que pode ser explicado pela prevalência desse ácido em relação ao eicosanóico (C20:0).

Resultado inverso foi observado com a razão molar, a qual apresentou efeito linear negativo (38,39), ou seja, a ligação entre ácido oleico e enzima para formar o complexo enzima-acetila diminuiu à medida que a quantidade de etanol aumentou no meio reacional. Conforme já mencionado, o ácido eicosanóico possui maior acessibilidade ao sítio ativo enzimático devido à sua geometria molecular.

O aumento na quantidade de etanol no meio reacional não alterou essa condição e foi importante apenas para etapa seguinte, de formação do complexo enzima-acetilada-álcool. Como mais complexo é formado entre enzima-ácido eicosanóico, certamente mais do seu éster será formado, o que diminui o valor da seletividade.

Já a temperatura possuiu efeito quadrático positivo (23,57). Sabendo que essa variável é responsável por diminuir a energia de ativação da reação, seu baixo valor implica em menos interação enzima-ácido graxo, fazendo o catalisador reagir com aquele substrato que primeiro entra em contato. Com temperaturas maiores é o inverso, pois mais interações ocorrem, momento em que a seleção pelo substrato poderá ser facilitada para aquele que estiver em maior quantidade (ácido oleico). Dentre os fatores que contribuem para a atividade catalítica, destaca-se a orientação apropriada entre as moléculas dos substratos e as dos grupos reativos do sítio ativo enzimático (Velikodvorskaya *et al.*, 1990).

A Tabela 4.11 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo quadrático da seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação ao éster de C18:1 e o éster de C20:0.

Tabela 4.11 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* para a síntese dos ésteres de ácido oleico (C18:1) e de ácido eicosanóico (C20:0), com nível de intervalo de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	p
Média das interações	0,52	0,005	0,006
(1) Temperatura (L)	- 0,03	0,001	0,03
Temperatura (Q)	0,04	0,002	0,02
(2) Agitação (L)	-0,06	0,001	0,01
Agitação (Q)	0,09	0,002	0,01
(3) Razão molar (L)	- 0,05	0,001	0,01
Razão molar (Q)	0,005	0,002	0,21
(4) Quantidade de Enzima (L)	0,06	0,001	0,01
Quantidade de Enzima (Q)	- 0,06	0,002	0,02
1 x 2	-0,09	0,002	0,01
1 x 3	-0,01	0,002	0,08
1 x 4	-0,005	0,002	0,19
2 x 3	0,06	0,002	0,02
2 x 4	0,04	0,002	0,02
3 x 4	0,05	0,002	0,02

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

Diferentemente dos resultados de seletividade da lipase de *Candida antarctica*, nas condições estudadas, a lipase de *Rhizopus oryzae* foi mais sensível a diversas variáveis e combinações dessas. Ressaltando que valores baixos de seletividade implicam em preferência pelo ácido saturado eicosanóico (C20:0), é perceptível a sua preferência por esse composto, o que pode ser observado nos valores de seletividade de acordo com a Tabela 4.8.

A Tabela 4.12 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo da seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae*. Nesse caso, o valor de F_{tab} foi muito inferior quando comparado ao F_{calc} , indicando que o modelo é estatisticamente significativo, de acordo com o F_{tab} para 85% de intervalo de confiança. No entanto, a equação do modelo não foi construída porque a variação em torno da média, medida através da análise do coeficiente de correlação R^2 , não foi próximo de 1. Nas condições avaliadas, o R^2 foi 0,58, o que implicou na falta de ajuste do modelo às respostas avaliadas, porém não invalidando a análise estatística dos fatores para a seletividade.

Tabela 4.12 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos graxos oleico (C18:1) e eicosanóico (C20:0).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{cal}
Regressão	1,50	24	0,06	1251,43
Resíduo	0,71	11	0,06	
Falta de ajuste (FA)	0,71	10	0,07	
Erro Puro (EP)	0,00005	1	0,00005	
Total	1,67	25		
R^2	0,58			
F_{tab} (85% de confiança)				${}^a F_{(24,1)} = 27,36$

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

A Figura 4.13 apresenta a superfície de resposta em função da temperatura e da agitação, cuja interação representa o segundo maior fator significativo para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae*.

O maior valor de seletividade foi obtido quando baixa agitação foi associada à alta temperatura ou na condição inversa, quando alta agitação foi associada a baixas temperaturas. Como ambas aumentam o contato da enzima com o substrato, associadas em altos valores,

reduzem o tempo mínimo necessário para que ocorra o contato entre os substratos e a enzima, reduzindo a seletividade.

Não obstante, quando estão simultaneamente em maior valor, podem ter desfavorecido a orientação apropriada dos reagentes no sítio ativo, condição necessária para que a reação tenha início. Na agitação de 150 rpm, a seletividade aumentou aproximadamente 128% quando a temperatura foi alterada de 45 para 55 °C, fixando-se a razão molar álcool;ácido graxo em 2:1 e a quantidade de enzima em 2 %m.

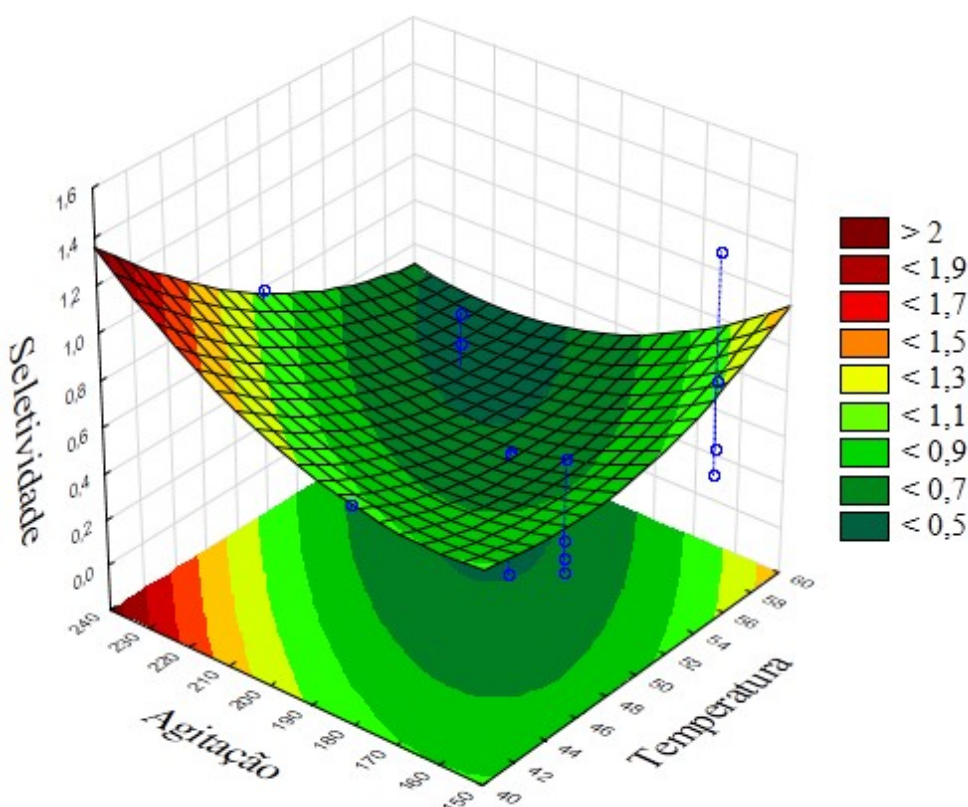


Figura 4.13 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em função da temperatura e agitação, utilizando 4 %m de catalisador, razão molar 3:1, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

4.3.2.3 Comparação da seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* no óleo hidrolisado de peixe tilápia

Nas condições avaliadas, ambas as lipases foram majoritariamente seletivas para o ácido graxo saturado (ácido eicosanóico - C_{20:0}), no entanto, a lipase de *Rhizopus oryzae* foi levemente mais seletiva por este ácido, tendo em vista que em aproximadamente 96% dos ensaios, esterificou mais ácido eicosanóico do que ácido oleico, enquanto que a lipase de *Candida antarctica* teve esse comportamento em 92% dos ensaios.

Diante dos resultados expostos para os dados de conversão e seletividade utilizando o óleo hidrolisado de peixe tilápia, a faixa de condições selecionada para estudo foi mais significativa para a lipase de *Rhizopus oryzae*, fato que está comprovado nas significâncias obtidas na grande maioria das variáveis estudadas.

Com isso, pode-se concluir que esta lipase possuiu maior sensibilidade às mudanças conduzidas nos ensaios de esterificação. Quanto à lipase de *Candida antarctica*, de maneira geral, ela não conseguiu distinguir as alterações dentro da faixa selecionada neste estudo e as variáveis selecionadas não foram significativas, considerando 85% de intervalo de confiança.

4.3.3 Avaliação da seletividade das lipases de Candida antarctica e de Rhizopus oryzae utilizando cargas enzimáticas iguais na reação de esterificação do óleo hidrolisado de peixe tilápia

Nas reações de esterificação do óleo hidrolisado de peixe tilápia comentadas anteriormente, a quantidade de catalisador utilizado foi dada em termos de massa/massa, dessa forma, levando em consideração que as duas enzimas estudadas possuem diferentes atividades de esterificação, conforme Tabela 4.2, para uma mesma reação, a quantidade de massa de lipase foi a mesma, mas a carga variou, sendo a da *Candida antarctica* sempre superior a da *Rhizopus oryzae*.

Para descartar a hipótese de que as lipases estariam obtendo resultados distintos de seletividade devido à diferença das suas cargas, foram realizadas reações fixando-se a carga enzimática em 200 U. Nessas condições, a seletividade da lipase de *Candida antarctica* foi 1,0 e a de *Rhizopus oryzae* foi 0,57. De acordo com o que foi obtido no planejamento experimental, ambas foram majoritariamente seletivas para o ácido saturado (ácido eicosanóico - C20:0). Neste ensaio com carga enzimática fixa, a lipase de *Rhizopus oryzae* confirmou sua preferência pelo referido ácido saturado e a lipase de *Candida antarctica* esterificou igualmente os ácidos saturado e insaturado, o que está de acordo com Da Rós *et al.* (2012), os quais afirmaram que a lipase de *Candida antarctica* não apresentava distinção de seletividade para ácidos saturado e insaturado.

Dessa forma, é possível afirmar que diante das condições avaliadas, a lipase de *Rhizopus oryzae* é a mais indicada para a obtenção de ésteres de ácidos graxos saturados, tais como biodiesel, componentes de creme rejuvenescedor, antimicrobianos, dentre outros (Nakpong e Wootthikanokkhan, 2010; Qiu, 2010; Marounek *et al.* 2012).

4.4 Estudo da conversão de ácidos graxos saturados em ésteres etílicos e da seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*

Segundo Parente *et al.* (2011) e conforme análise do óleo hidrolisado de peixe tilápia (Tabela 4.1), os peixes são fontes de óleos ricos em ácidos graxos mono e poliinsaturados de alto valor agregado. Entretanto, esses animais também possuem em sua composição, ácidos saturados, responsáveis por efeitos maléficos à saúde (Hunter *et al.*, 2010), os quais são utilizados como substratos para a síntese de ésteres com diversas aplicações, seja na produção de aromas; de sabões; fabricação de medicamentos, perfumes e cosméticos; na produção e modificações de componentes alimentares; biopesticidas e também na produção de biocombustíveis (Chang *et al.*, 2006; Aravindan *et al.*, 2007; Nakpong e Wootthikanokkhan, 2010; Wei *et al.*, 2010; Bu *et al.*, 2012; Marounek *et al.* 2012).

Segundo Derr *et al.* (1993), a maioria dos ácidos graxos saturados presentes nos óleos mais comumente consumidos correspondem ao esteárico e ao palmítico. Diante disso, muitos esforços vem sendo direcionados para modificar não apenas a composição dos ácidos graxos oriundos dos óleos de peixe, mas também de vegetais. Uma das tentativas é através da modificação genética (Hamm, 2003). Uma alternativa à alteração ao nível dos ácidos nucleicos é a aplicação de enzimas como auxiliares no processo de seletividade nos óleos, objetivando otimizar a composição dos mesmos em termos dos ácidos graxos insaturados (Cahoon e Schmid, 2008), através do perfil de seletividade das mesmas pelo ácido palmítico ou ácido esteárico.

4.4.1 Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico

Diante do exposto, foi realizado planejamento experimental composto central 2^3 para avaliar o comportamento das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*, na conversão de ácido esteárico em estearato de etila, bem como na seletividade entre os ácidos esteárico e palmítico, presentes na mistura reacional.

A Tabela 4.13 apresenta o planejamento experimental realizado com as variáveis selecionadas para a síntese de estearato de etila, utilizando lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Rhizopus oryzae*. Nesse planejamento foram utilizados agitação de 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h. Em destaque, pode-se observar os maiores valores de conversão obtidos para ambas as enzimas.

Comparando com as conversões obtidas quando o meio reacional foi o óleo hidrolisado de peixe tilápia (Tabela 4.3), os resultados para a conversão na mistura de ácidos graxos saturados foram relativamente superiores. Isso pode ser justificado pela menor quantidade de água no meio reacional e conseqüente redução da reação inversa de hidrólise, tendo em vista que os ácidos graxos (palmítico e esteárico) foram utilizados na apresentação comercial (sólidos à temperatura ambiente) e livres de solvente.

Tabela 4.13 – Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2³ para a conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de *Candida antarctica* e lipase de *Rhizopus oryzae*.

Exp	Enzima (%m)	Razão molar (álcool:ácido graxo)	T (°C)	Conversão (%)	
				<i>C. antarctica</i>	<i>R. oryzae</i>
1	2	1,5	50	59,2	17,5
2	2	1,5	60	46,4	42,3
3	2	4,5	50	50,7	40,5
4	2	4,5	60	37,1	10,4
5	6	1,5	50	61,5	53,2
6	6	1,5	60	62,0	28,9
7	6	4,5	50	49,7	29,7
8	6	4,5	60	19,4	15,4
9	0,64	3	55	21,2	21,4
10	7,36	3	55	37,4	34,5
11	4	0,48	55	3,5	7,8
12	4	5,52	55	36,3	24,4
13	4	3	46,6	42,7	40,1
14	4	3	63,4	14,6	4,5
15(C)	4	3	55	60,0	49,2
16(C)	4	3	55	59,3	53,2

* Em negrito, consta a maior conversão obtida para cada lipase utilizada.

Do total de 16 experimentos, 62,5% dos resultados foram consideravelmente maiores para as conversões obtidas com a lipase de *Candida antarctica*, 6,25% a partir de reações com a de *Rhizopus oryzae* e 31,25% correspondentes à valores semelhantes de conversão para os dois catalisadores.

4.4.1.1 Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico utilizando lipase de *Candida antarctica*

Praticamente todas as variáveis estudadas tiveram efeito na conversão de ácido esteárico, com nível de confiança de 85% ($p < 0,15$), exceto a interação entre enzima e temperatura.

De acordo com a Figura 4.14, foi possível observar que apenas a quantidade de enzima (L) possuiu efeito positivo (15,01) e que apenas a interação entre a quantidade de enzima e a temperatura não foi significativa para a conversão do ácido esteárico, na faixa avaliada.

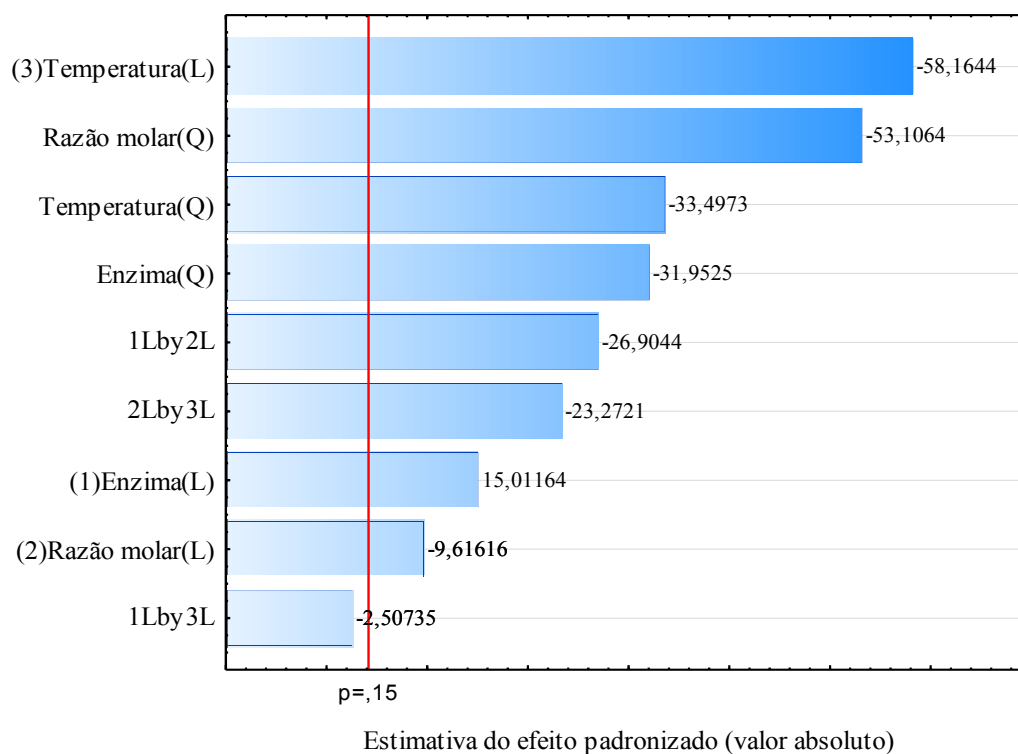


Figura 4.14 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de *Candida antarctica*.

É importante ressaltar que a mistura de ácidos graxos utilizados (palmítico e esteárico) é sólida à temperatura ambiente. Como a proposta foi realizar a reação sem solvente, isso aumentou a temperatura mínima para a mesma acontecer (45 °C). Com base nos dados apresentados no gráfico de Pareto (Figura 4.14), o efeito linear da temperatura foi o mais significativo (58,16). À medida que esta foi aumentada, a conversão de ácido esteárico

em estearato de etila decresceu. Uma explicação consiste na perda de atividade da enzima devido à temperatura para realização do experimento.

Sabendo que a estrutura tridimensional das proteínas e, portanto, das enzimas, são estabilizadas por diversas interações intracadeias, dentre elas, ponte de hidrogênio, ponte dissulfeto, interações hidrofóbicas, todas são facilmente rompidas com o aumento da temperatura, o que acarreta perda estrutural do sítio ativo e, conseqüentemente, da função catalítica. Uma outra possível explicação para esse decréscimo na conversão, está no maior caráter ácido do ácido palmítico, cujo pK_a é 4,78, enquanto que do ácido esteárico é 10,15. Isso significa que no momento da formação do complexo enzima-substrato, conforme apresentado no Capítulo 2 (item 2.3), o ácido palmítico sofrerá ataque nucleofílico mais facilmente. Assim, sua conversão em éster etílico tende a ser maior do que a de ácido esteárico.

A razão molar (Q) possuiu o segundo maior efeito (53,11). Por ter sido negativo, retrata que a síntese de estearato de etila foi reduzida quando a razão molar aumentou. Em razões molares maiores, a enzima pode ter sido inibida pelo etanol, o que está de acordo com a previsão de Meng *et al.* (2011). Ademais, se comparado ao resultado de efeitos estimados quando foi utilizado o óleo hidrolisado de peixe tilápia, a lipase de *Candida antarctica* também teve o efeito quadrático negativo na variável razão molar (mesmo que, segundo Tabela 4.4, demonstre que a significância desse efeito só seria considerado a partir de 75% de confiança).

Efeito negativo também foi observado na quantidade de enzima (Q), ou seja, a conversão aumentou até uma determinada quantidade de enzima, a partir da qual decresceu. Levando em consideração que a reação de esterificação envolve um equilíbrio (Figura 4.2), é possível que em grande quantidade, a lipase de *Candida antarctica* tenha utilizado não apenas o ácido esteárico como substrato, mas também a água que foi formada na reação de esterificação. Isso promove a reação inversa, quebrando a molécula de estearato de etila através da hidrólise.

Esse raciocínio está de acordo com as observações de Rodriguez e Fernandez-Lafuente (2010) em torno das reações de esterificação, os quais afirmaram que uma das condições experimentais de maior relevância nesse tipo de reação está relacionada com a atuação da água que, por ser um dos produtos da reação, deve ser removida com o intuito de deslocar o equilíbrio termodinâmico para a síntese do éster.

Uma solução pode ser disponibilizar mais adsorvente no meio reacional, adicionando-se mais peneira molecular, ou mesmo avaliar adsorvente com tamanho de poro

menor, como a de 3 Å, tendo em vista que é utilizada em reações enzimáticas (He *et al.*, 2012). Entretanto, uma quantidade maior de peneira molecular ocuparia maior volume dentro de um reator em escala, ou seja, ter-se-ia menos volume disponível para a reação dentro do reator. Consequentemente, ao se pensar em uma produção em larga escala para a utilização do resíduo do óleo de peixe, um volume muito grande de reator poderia inviabilizar o processo. Assim, um estudo de otimização para quantificar a peneira molecular deve ser analisado.

Outro ponto importante a se ressaltar é que uma quantidade mínima de água é importante para a manutenção do sítio enzimático ativo (Tan *et al.*, 2006).

Não obstante, não se pode descartar a preferência da enzima pelo ácido esteárico nas condições analisadas, pois, em pequena quantidade, a conversão foi maior. Além disso, uma outra explicação consiste na dificuldade de acessar o sítio ativo enzimático quando grande quantidade de enzima está presente no meio reacional.

A Tabela 4.14 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo quadrático da conversão de ácido esteárico em estearato de etila, utilizando lipase de *Candida antarctica*.

Tabela 4.14–Coeficientes de regressão do modelo da conversão do ácido esteárico, utilizando lipase de *Candida antarctica*, com nível de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	p
Média das interações	57,31	0,34	0,004
(1) Quantidade de Enzima (L)	1,95	0,13	0,04
Quantidade de Enzima (Q)	-5,05	0,16	0,02
(2) Razão molar (L)	-1,25	0,13	0,06
Razão molar (Q)	-8,39	0,16	0,01
(3) Temperatura (L)	-7,57	0,13	0,01
Temperatura (Q)	-5,29	0,16	0,02
1 x 2	-4,57	0,17	0,02
1 x 3	-0,43	0,17	0,02
2 x 3	-3,96	0,17	0,03

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

Diante dos resultados expostos, praticamente todas as variáveis foram significativas nas condições selecionadas para este estudo.

Com o intuito de observar a significância do modelo da conversão do ácido esteárico quando a lipase de *Candida antarctica* foi utilizada, foi construída a Tabela de

ANOVA (Tabela 4.15). De acordo com a análise de variância, o valor de F_{tab} foi muito inferior ao do F_{calc} , indicando que o modelo é estatisticamente significativo, para 85% de intervalo de confiança, porém, o coeficiente de correlação R^2 foi muito baixo (0,36), traduzindo a falta de ajuste do modelo aos resultados obtidos.

Tabela 4.15 – ANOVA para o modelo de conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de *Candida antarctica*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{cal}
Regressão	5552,18	14	396,58	1715,33
Resíduo	3255,22	6	542,54	
Falta de ajuste (FA)	3254,98	5	651	
Erro Puro (EP)	0,23	1	0,23	
Total	5104,16	15		
R^2		0,36		
F_{tab} (85% de confiança)				${}^a F_{(14,1)} = 26,94$

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

A Figura 4.15 apresenta a superfície de resposta em função da razão molar e da quantidade de enzima. De maneira geral, quando foi utilizado pequena quantidade de enzima e pequena razão molar, bem como grande quantidade de enzima e grande quantidade de razão molar, as conversões diminuíram. Isso pode ser explicado, respectivamente, pela limitação da interação enzima-substrato e pela provável inibição da enzima pelo etanol. Já em razões molares álcool:ácido graxo intermediárias (3:1), a conversão aumentou 76% quando a quantidade de enzima variou de 0,64 para 7,36 %m e cerca de 183% quando variou de 0,64 para 4 %m de enzima.

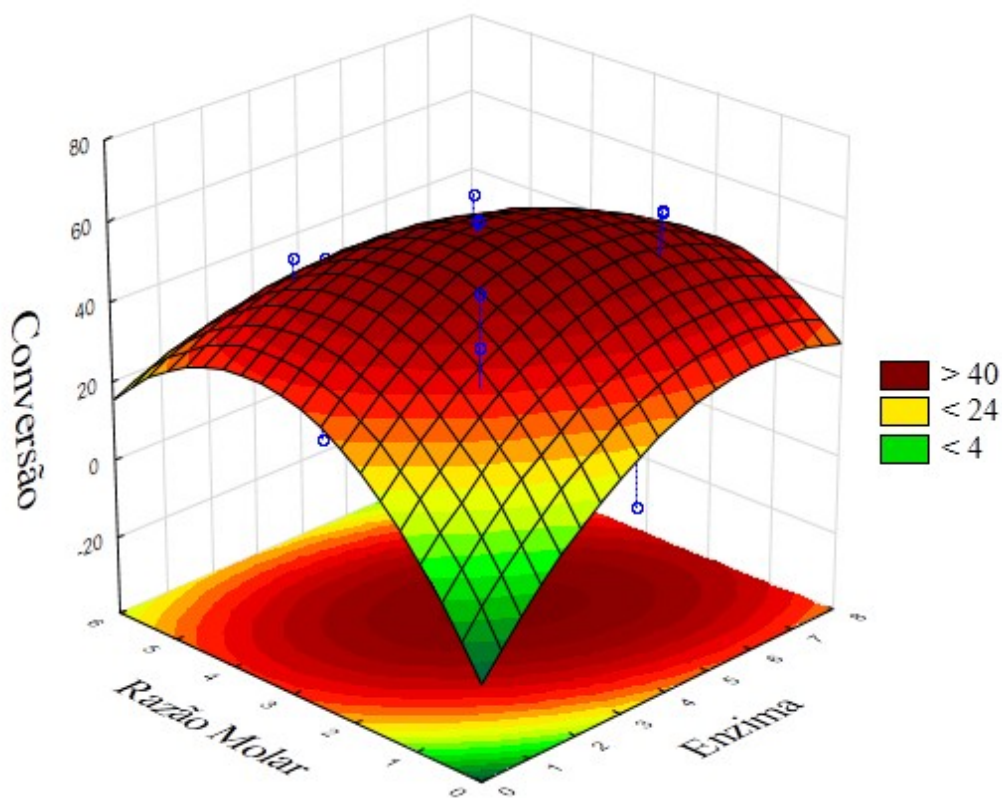


Figura 4.15 – Superfície de resposta para a conversão de ácido esteárico em função da razão molar e da quantidade de enzima, utilizando lipase de *Candida antarctica* a 55 °C, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

4.4.1.2 Planejamento experimental para a conversão do ácido esteárico utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*

Com nível de confiança de 85%, o perfil do efeito das variáveis estudadas para a conversão de ácido esteárico no seu éster etílico foi semelhante ao observado quando a reação foi catalisada pela lipase de *Candida antarctica*, do qual, apenas a quantidade de enzima (L) foi positivo (3,67), conforme ilustram as Figuras 4.14 e 4.16. Dessa forma, a discussão realizada para a Figura 4.14 pode ser estendida para a Figura 4.16.

O efeito quadrático da razão molar foi o maior e teve valor negativo. Como já mencionado, isso retrata que a síntese de estearato de etila foi reduzida quando a razão molar aumentou. Em razões molares maiores, a enzima pode ter sido inibida pelo etanol, o que está de acordo com a previsão de Meng *et al.* (2011).

Quanto à temperatura, à medida que esta foi aumentada, a conversão de ácido esteárico em estearato de etila decresceu (efeito linear = 9,90). Como já mencionado para a mesma resposta, quando utilizado lipase de *Candida antarctica*, uma explicação consiste na perda de atividade da enzima, resultado do efeito da temperatura nas interações estabilizadoras da estrutura tridimensional da mesma.

Semelhante ao observado para a catálise com lipase de *Candida antarctica*, também foi negativo o efeito quadrático da quantidade de enzima (Q), bem como positivo o efeito linear. Aumentando-se a sua proporção, outro critério pode ter sido mais relevante no processo de formação do complexo enzima-substrato, dentre as alternativas, a maior facilidade com que o ácido palmítico atinge seu sítio ativo, tanto pelo fato de ser uma molécula menor do que o ácido esteárico, como pelo seu maior caráter ácido ($pK_{a(\text{ácido palmítico})} = 4,78$; $pK_{a(\text{ácido esteárico})} = 10,15$), característica que aumenta as chances de sofrer ataque nucleofílico por parte do grupo serina, pertencente ao sítio ativo das lipases (Rodrigues e Fernández-Lafuente (2010). Além disso, estando em grande quantidade no meio reacional, a enzima pode ter dificuldade em expor seu sítio ativo para a formação do complexo enzima-ácido graxo.

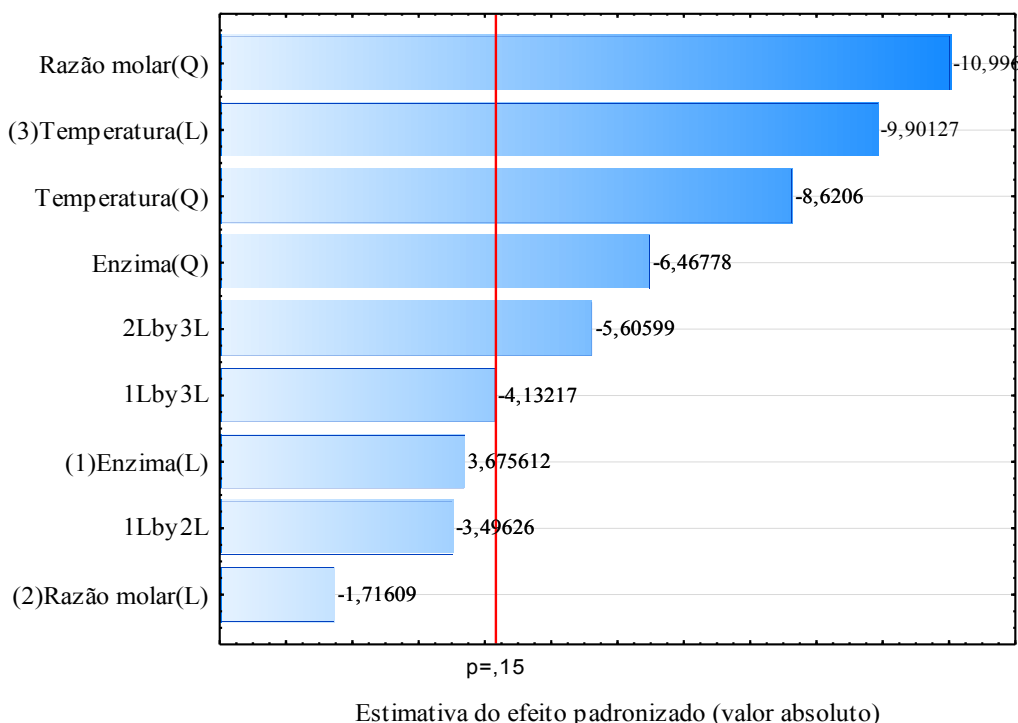


Figura 4.16 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Contudo, mesmo possuindo perfis de estimativa de efeitos semelhantes (Figuras 4.14 e 4.16), não é prerrogativa para concluir que as enzimas possuem comportamentos iguais nas condições estudadas. Esses dados apenas representam o efeito que diversas variáveis podem ter no modelo matemático para a resposta conversão.

A Tabela 4.16 apresenta os coeficientes de regressão para o modelo quadrático da conversão de ácido esteárico em estearato de etila, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Tabela 4.16 – Coeficientes de regressão do modelo da conversão da lipase de *Rhizopus oryzae* para a reação de esterificação do ácido esteárico, com nível de confiança de 85%.

Fator	Coeficiente ^a	Desvio padrão	p
Média das interações	50,32	2,00	0,02
(1) Quantidade de Enzima (L)	2,82	0,78	0,17
Quantidade de Enzima (Q)	-6,03	0,93	0,10
(2) Razão molar (L)	-1,31	0,77	0,33
Razão molar (Q)	-10,24	0,93	0,06
(3) Temperatura (L)	-7,60	0,77	0,06
Temperatura (Q)	-8,03	0,93	0,07
1 x 2	-3,50	1,00	0,18
1 x 3	-4,14	1,00	0,15
2 x 3	-5,62	1,00	0,11

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

Pela ANOVA, Tabela 4.17, pôde-se observar que o modelo quadrático não apresentou um bom ajuste e regressão significativa. O F_{calc} foi apenas 34% superior ao valor de F_{tab} , portanto, sem significado estatístico para apresentação do modelo matemático da catálise enzimática de ácido esteárico a estearato de etila. Além disso, o valor de R^2 foi 0,66, não representando ajuste do modelo aos dados experimentais obtidos.

Tabela 4.17 – ANOVA para o modelo de conversão de ácido esteárico, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}
Regressão	4598,65	14	328,47	40,85
Resíduo	1291,82	6	215,30	
Falta de ajuste (FA)	1283,78	5	256,76	
Erro Puro (EP)	8,04	1	8,04	
Total	3833,35			
R²	0,66			
F_{tab} (85% de confiança)				^a F _(14,1) = 26,94

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

O gráfico de superfície de resposta para o modelo de segunda ordem, representado pela Figura 4.17, indica que a conversão do ácido esteárico pela lipase de *Rhizopus oryzae* é função da temperatura e da quantidade de enzima, tendendo a menores valores quando utilizado temperaturas maiores, dentro da faixa avaliada.

Considerando a reação a 55 °C, é possível observar o efeito da quantidade de catalisador na conversão, a qual aumentou aproximadamente 148% quando a quantidade de enzima utilizada foi alterada de 0,64 para 4 %m. É papel do catalisador diminuir a energia de ativação e, assim, tornar a reação mais rápida. No caso das enzimas, essa função é realizada através da formação de mais complexos enzima-substrato, de acordo com o mecanismo reacional apresentado no Capítulo 2 - Figura 2.3. Neste, é evidente que, respeitando o grau de saturação das enzimas, bem como a quantidade de substratos no meio, quanto mais lipase, mais complexo será formado em menor tempo, facilitando a reação subsequente de adição do etanol e consequente finalização da esterificação do ácido graxo.

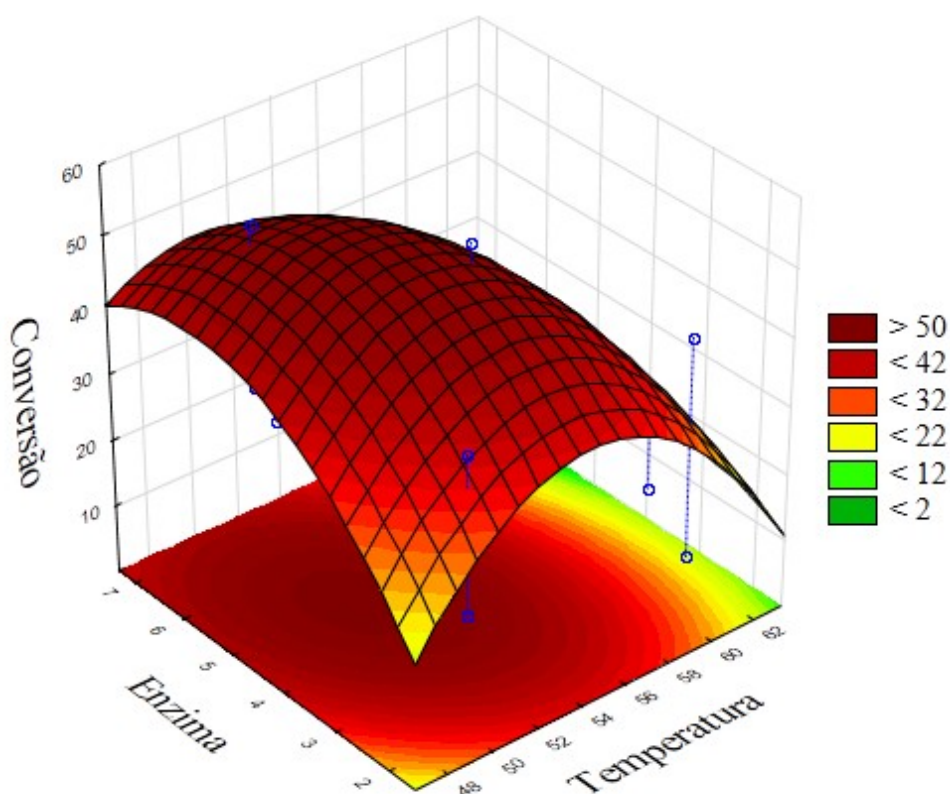


Figura 4.17 – Superfície de resposta para a conversão de ácido esteárico em função da quantidade de enzima e da temperatura, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, razão molar 3:1, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular e tempo reacional de 24 h.

Ainda com base na Figura 4.17, também é possível observar o efeito negativo da temperatura. Fixando a quantidade de enzima em 4 %m, a conversão decresceu 91% quando a temperatura aumentou de 55 para 63,4 °C, fato que provavelmente pode ser justificado pela temperatura ótima da lipase de *Rhizopus oryzae*. No entanto, até o momento, não há publicações que se refiram às mesmas condições estudadas neste trabalho e que mencionem a temperatura ótima da lipase de *Rhizopus oryzae*. Fora da faixa ideal, as interações intracadeias, importantes para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima, bem como para a funcionalidade do sítio ativo, podem ter sido rompidas.

4.4.1.3 Comparação entre as conversões de ácido esteárico utilizando as lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae*

Comparando as conversões obtidas ao longo dos 16 ensaios atribuídos pelo planejamento experimental composto central 2^3 , de acordo com a Figura 4.18, é possível observar a diferença na reatividade das duas lipases estudadas.

Com exceção do experimento 11 (condição: 4 %m enzima, razão molar álcool:ácido esteárico 0,48:1 e temperatura de 55 °C), no qual a lipase de *Rhizopus oryzae* se sobressaiu, e o experimento 9 (condição: 0,64 %m enzima, razão molar álcool:ácido esteárico 3:1 e temperatura de 55 °C), no qual as conversões pelas duas enzimas foram muito próximas, a lipase de *Candida antarctica* foi a responsável pelos maiores valores de conversão nas condições estudadas, o que era esperado, tendo em vista a maior atividade de esterificação que esta possui.

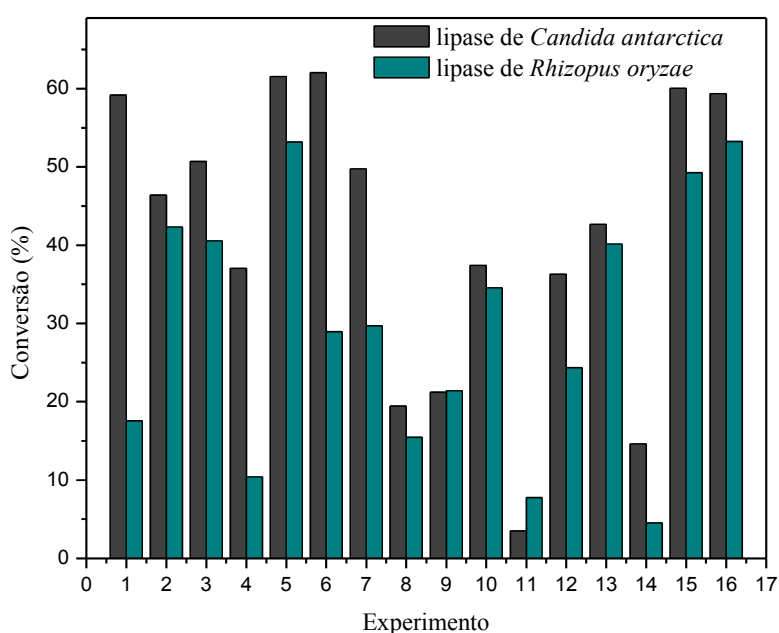


Figura 4.18 – Conversão do ácido esteárico em estearato de etila pelas lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* nos 16 ensaios de esterificação, conforme planejamento composto central 2^3 .

4.4.2 Planejamento experimental para a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e *Rhizopus oryzae* na mistura de ácidos graxos saturados

Diante da presença de dois ácidos graxos saturados no meio reacional, as seletividades em cada um dos 16 ensaios realizados foram calculadas de acordo com a Equação 3.7 do capítulo 3, que é a relação entre o éster do ácido esteárico e o éster do ácido palmítico.

A Tabela 4.18 apresenta os resultados obtidos através do planejamento experimental para análise das variáveis avaliadas para a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae*, utilizando agitação de 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h. Em destaque, pode-se observar os valores das maiores seletividades alcançadas para ambas as enzimas.

Tabela 4.18 – Resultados obtidos do planejamento experimental composto central 2³ para otimização das variáveis avaliadas para a seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0).

Exp	Enzima (%m)	Razão molar (álcool:ácido graxo)	T (°C)	Seletividade <i>C. antarctica</i>	Seletividade <i>R. oryzae</i>
1	2	1,5	50	0,46	0,96
2	2	1,5	60	0,45	0,46
3	2	4,5	50	0,44	0,86
4	2	4,5	60	0,51	2,17
5	6	1,5	50	0,43	0,61
6	6	1,5	60	0,47	0,56
7	6	4,5	50	0,51	0,47
8	6	4,5	60	0,46	0,72
9	0,64	3	55	0,47	1,59
10	7,36	3	55	0,48	0,51
11	4	0,48	55	0,37	0,87
12	4	5,52	55	0,46	1,20
13	4	3	46,6	0,44	0,58
14	4	3	63,4	0,46	0,87
15(C)	4	3	55	0,43	0,41
16(C)	4	3	55	0,43	0,42

* Em negrito, consta o maior valor de seletividade obtido para cada lipase utilizada.

Dos 16 experimentos, pode-se considerar que a lipase de *Candida antarctica* foi seletiva para o ácido palmítico em 100% dos casos. Já em relação à lipase de *Rhizopus oryzae*, preferiu majoritariamente o ácido palmítico, porém, em praticamente 25% dos ensaios, inclusive, com condições bem distintas, selecionou o ácido esteárico.

Para explicar tal comportamento, é válido lembrar que o ácido palmítico é formado por 16 carbonos, enquanto o ácido esteárico, por 18. Nas condições analisadas, a lipase de *Candida antarctica* foi específica a ponto de preferir um ácido graxo a outro por

uma diferença de apenas dois carbonos. Considerando o caráter ácido dos dois reagentes envolvidos, temos que o ácido palmítico possui pK_a 4,78, enquanto o ácido esteárico, pK_a 10,15, ou seja, para um dado valor alto de pH, o primeiro fica totalmente dissociado em seu íon carboxilato. Como está ilustrado na Figura 4.19, quanto menor o grupo alquila do ácido, menor o efeito indutivo doador de elétrons para o carbono da carbonila e, portanto, maior a sua carga parcial positiva. O inverso pode ser dito para o ácido esteárico, ou seja, por ter maior grupo alquila, maior será o efeito indutivo doador de elétrons para o carbono da carbonila e, portanto, sua carga parcial positiva será menor.

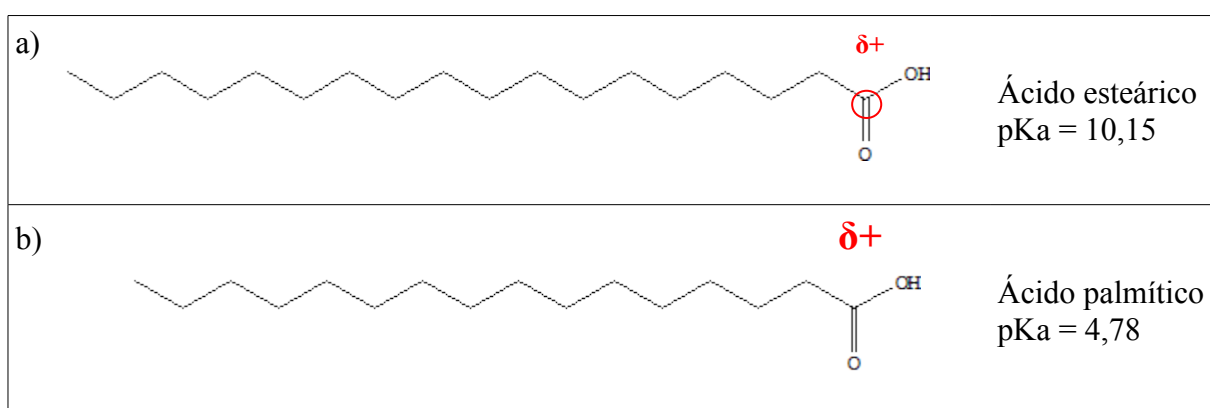


Figura 4.19 – Estrutura dos ácidos graxos: (a) ácido esteárico e (b) ácido palmítico.

De acordo com a Figura 2.3 do capítulo 2, quanto mais positivo o carbono carbonílico, mais facilmente sofrerá ataque nucleofílico pelo grupo hidroxila do resíduo serina, que compõe o sítio ativo enzimático. Em suma, é evidente que o ácido palmítico será mais facilmente atacado, portanto, formará mais complexos enzima-substrato, diminuindo a conversão de ácido esteárico. Porém, mesmo sendo esperado maior formação de complexo enzima-substrato com o ácido palmítico, alterando as condições reacionais, foi verificado que é possível alterar a seletividade da lipase, aumentando, assim, a formação de complexos com o ácido esteárico.

Além disso, uma outra explicação consiste na composição e estrutura dos grupos funcionais das duas enzimas avaliadas. Em todas as explicações, foi considerado que ambas possuíam o grupo hidroxila da serina e o grupo amino da histidina, como resíduos ativos (item 2.4 do capítulo 2), porém, enquanto é de conhecimento que a tampa da lipase de *Candida antarctica* não interfere na sua ligação com o substrato (Uppenberg *et al.*, 1994), a de *Rhizopus oryzae* pode interferir. Para validar esse argumento, é preciso avaliar a estrutura molecular enzimática, bem como da referida molécula, através de técnicas como a de difração de raios-X (Rodrigues e Fernández-Lafuente, 2010).

De acordo com os resultados de seletividade para o ácido graxo C18:1 - ácido oleico em relação ao ácido graxo C20:0 - ácido eicosanóico (Tabela 4.8), quando o meio reacional consistiu no óleo hidrolisado de peixe, vale lembrar que tanto a lipase de *Candida antarctica* como a lipase de *Rhizopus oryzae* preferiram o ácido graxo saturado. Porém, a lipase de *Rhizopus oryzae* preferiu mais, pois seus valores de seletividade foram majoritariamente menores do que os da lipase de *Candida antarctica*.

Observando os resultados de seletividade obtidos para a lipase de *Candida antarctica*, é possível perceber que foram muito próximos, conforme ilustra a Figura 4.20. O erro puro foi zero, motivo pelo qual, não foram gerados dados pelo programa STATISTICA (versão 10). A seletividade foi mantida ao longo dos 16 experimentos, sendo o desvio padrão correspondente à apenas 0,03.

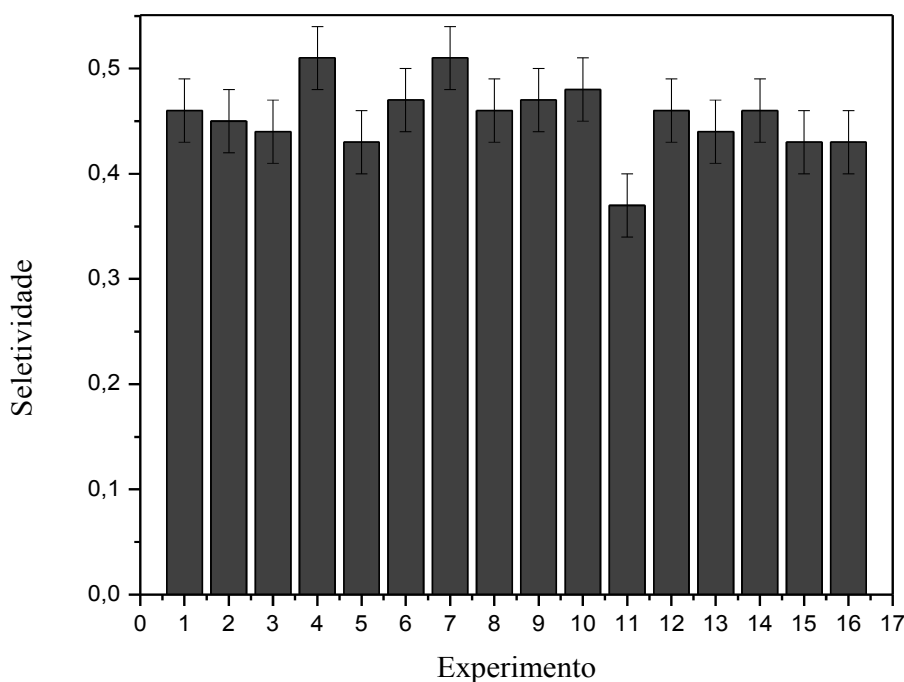


Figura 4.20 – Seletividade da lipase de *Candida antarctica* em relação ao ácido esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) nos 16 ensaios do planejamento experimental composto central 2^3 , a 180 rpm, com 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

4.4.2.1 Planejamento experimental para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) presentes na mistura de ácidos graxos saturados

Todas as variáveis estudadas tiveram efeito na seletividade, quando utilizado lipase de *Rhizopus oryzae*. Diferente da lipase de *Candida antarctica*, hora preferiu o ácido palmítico, hora preferiu o ácido esteárico.

Nesse sentido, de acordo com a Figura 4.21, é possível observar que o efeito linear da quantidade de enzima foi o maior, seguido pela interação entre razão molar e temperatura.

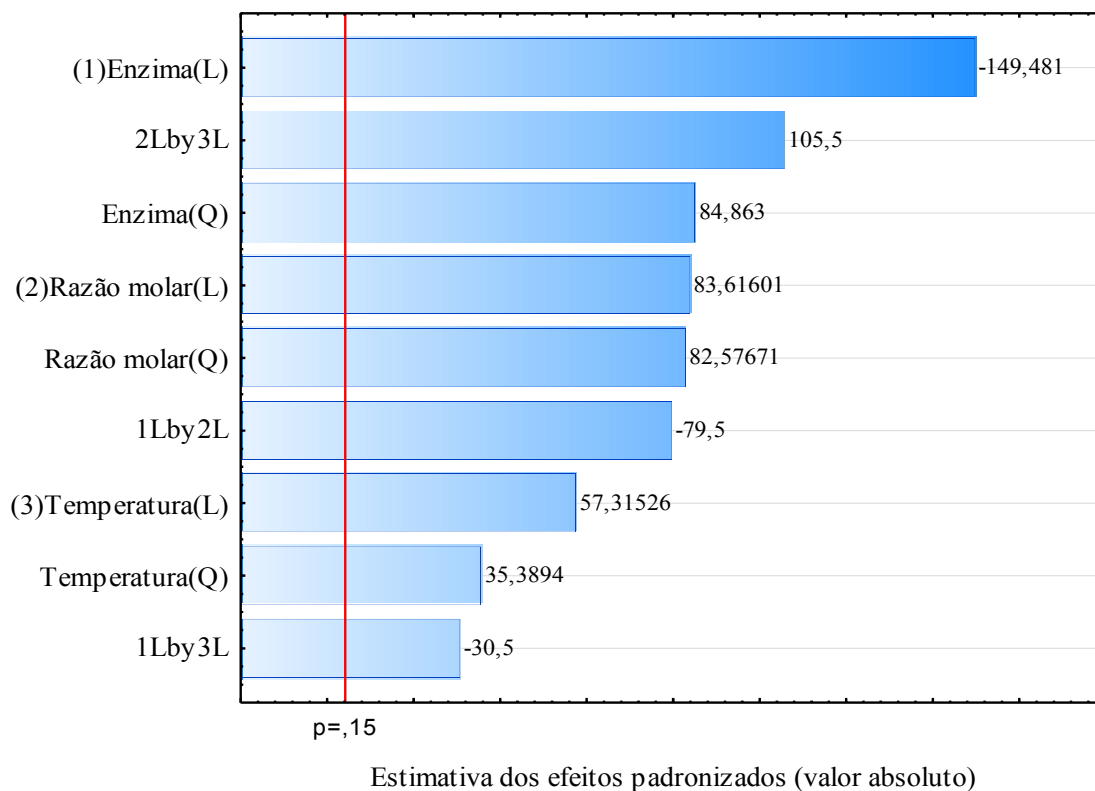


Figura 4.21 – Gráfico de Pareto dos efeitos estimados para as variáveis estudadas na seletividade quando utilizado lipase de *Rhizopus oryzae*.

A quantidade de enzima (L) apresentou efeito negativo (149,48), ou seja, à medida que se aumentou a quantidade de catalisador no meio reacional, foi favorecida a ligação com o ácido palmítico. Considerando que ambas as lipases possuem os mesmos grupos reativos, a explicação pode ser dada com base nos tamanhos das moléculas de ácidos e da região do sítio ativo enzimático.

Mesmo que a lipase de *Rhizopus oryzae* possua ácido glutâmico (Glu) ao invés de ácido aspártico (Asp), como já elucidado para a lipase de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994), esse fator não justifica a reatividade diferente dessas duas enzimas com base nesse resíduo ácido de aminoácido, pois os valores de pK_a para os mesmos são muito semelhantes e, conseqüentemente, suas reatividades também o são (Solomons e Fryhle, 2012). Nesse ponto, o que pode estar influenciando a reação diferenciada entre os catalisadores é a tampa, também já elucidada para a lipase de *Candida antarctica* (Uppenberg *et al.*, 1994) e sabidamente sem interferência no seu mecanismo reacional.

Quando a enzima esteve nas menores proporções estudadas, é provável que o fator mais relevante para a ligação enzima-substrato tenha sido a vantagem do ácido esteárico (53 %m) em relação ao ácido palmítico (47 %m), o que resultou em maiores valores de seletividade. No entanto, quando a proporção de enzima foi maior, houve preferência pelo ácido palmítico. Nesse caso, o fator predominante pode ter sido o tamanho desta molécula, que por ser menor, tem mais fácil acesso ao sítio ativo da enzima, bem como seu maior caráter ácido, facilitando o ataque nucleofílico por parte do grupo hidroxila e conseqüente maior formação de complexo enzima-ácido palmítico.

Quanto à razão molar e a temperatura, ambas apresentaram efeito linear positivo. À medida que seus valores foram aumentando, a seletividade também aumentou, ou seja, a lipase de *Rhizopus oryzae* preferiu o ácido esteárico.

Com razões molares baixas, pequena quantidade de etanol estava disponível no meio. Por tudo o que já foi mencionado a respeito da maior tendência do ácido palmítico sofrer o ataque nucleofílico, mais complexo deste ácido com a enzima estava presente no meio reacional. Dessa forma, estando nas menores quantidades estudadas, o fator predominante para a reação do álcool foi a maior disponibilidade do complexo formado com o ácido palmítico. Em maiores proporções, é provável que o etanol tenha reagido igualmente com ambos os ácidos complexados, mas como estava em maior porcentagem, o ácido esteárico foi mais esterificado, o que resultou no aumento da seletividade.

O ácido esteárico estava em vantagem em relação ao ácido palmítico, pois correspondeu à 53 %m da composição da mistura de ácidos graxos saturados avaliada. Porém, este último possui maior caráter ácido. Dessa forma, o mais provável é que o ácido palmítico forme complexo enzima-substrato mais facilmente do que o ácido esteárico, mesmo que este estivesse em maior quantidade no meio. No entanto, se a temperatura for considerada como fator de aumento do grau de agitação das moléculas, é possível concluir que em maiores valores, aliou-se à vantagem do ácido esteárico para que mais do seu complexo fosse formado e, assim, resultasse em aumento da seletividade. Isso é o que está implícito no efeito linear positivo da temperatura em relação à preferência da lipase de *Rhizopus oryzae* pelo ácido esteárico.

Dados os efeitos e suas respectivas significâncias com 85% de intervalo de confiança ($p < 0,15$), a Tabela 4.19 foi construída com o intuito de apresentar os coeficientes de regressão para o modelo quadrático da seletividade, utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*.

Tabela 4.19 – Coeficientes de regressão do modelo da seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* para a reação de esterificação do ácido esteárico, com nível de confiança de 85%.

Fator	Coefficiente ^a	Desvio padrão	p
Média das interações	0,43	0,004	0,007
(1) Quantidade de Enzima (L)	-0,29	0,002	0,004
Quantidade de Enzima (Q)	0,20	0,002	0,007
(2) Razão molar (L)	0,16	0,002	0,008
Razão molar (Q)	0,19	0,002	0,008
(3) Temperatura (L)	0,11	0,002	0,01
Temperatura (Q)	0,08	0,002	0,02
1 x 2	-0,20	0,002	0,008
1 x 3	-0,08	0,002	0,02
2 x 3	0,26	0,002	0,006

^a Os efeitos significativos estão marcados em negrito.

Esse estudo indicou que todas as variáveis foram significativas nas condições selecionadas. Com o intuito de observar se o modelo apresentou ajuste aos dados experimentais, bem como se a regressão foi significativa, os valores de F_{tab} , F_{calc} e do coeficiente de correlação (R^2) foram conferidos, como apresenta a Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – ANOVA para o modelo de seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação ao ácido esteárico.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{cal}
Regressão	3,7	14	0,26	5281,35
Resíduo	0,38	6	0,06	
Falta de ajuste (FA)	0,38	5	0,08	
Erro Puro (EP)	0,00005	1	0,00005	
Total	3,44	15		
R ²	0,89			
F _{tab} (85% de confiança)				^a F _(14,1) = 26,94

^a F_{calc} para a falta de ajuste = MQ_{FA}/MQ_{EP}

De acordo com a análise de variância, o valor de F_{tab} foi muito inferior ao do F_{calc} , indicando que o modelo é estatisticamente significativo, para 85% de intervalo de confiança. Considerando o valor do coeficiente de correlação próximo de 1, foi possível escrever a Equação 4.1 como modelo para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação à síntese de estearato e palmitato de etila. Para tanto, foram considerados os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 4.19 e os desvios padrões foram descartados, tendo em vista que apresentaram valor praticamente nulo.

$$S = 0,43 - 0,29x_1 + 0,2x_1^2 + 0,16x_2 + 0,19x_2^2 + 0,11x_3 + 0,08x_3^2 - 0,2x_{(1)}x_{(2)} - 0,08x_{(1)}x_{(3)} + 0,26x_{(2)}x_{(3)} \quad (4.1)$$

onde x_1 , x_2 e x_3 correspondem à valores reais de quantidade de enzima, razão molar álcool:ácido graxo e temperatura, respectivamente.

Uma outra forma de avaliar o ajuste do modelo aos dados experimentais é através do gráfico representativo dos valores observados *versus* valores preditos (Figura 4.22).

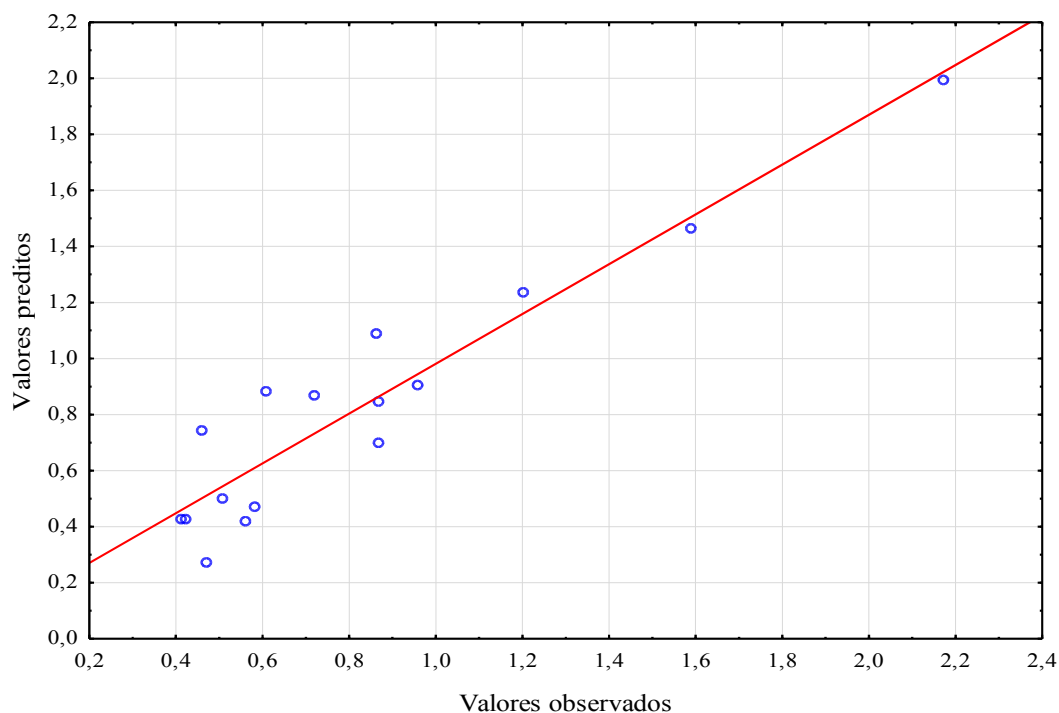


Figura 4.22 – Valores observados *versus* valores preditos para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação ao ácido esteárico.

O ajuste do modelo foi verificado com o coeficiente de correlação R^2 , o qual foi calculado em 0,89, indicando que 89% da variabilidade da resposta pode ser explicado pelo modelo exposto na Equação 4.1.

De maneira geral, a lipase de *Rhizopus oryzae* apresentou maior seletividade quando a reação foi conduzida em maior temperatura e com razão molar mais elevada. A interação entre essas duas variáveis foi responsável pelo segundo maior efeito. A Figura 4.23 apresenta a superfície de resposta da seletividade em função de ambas.

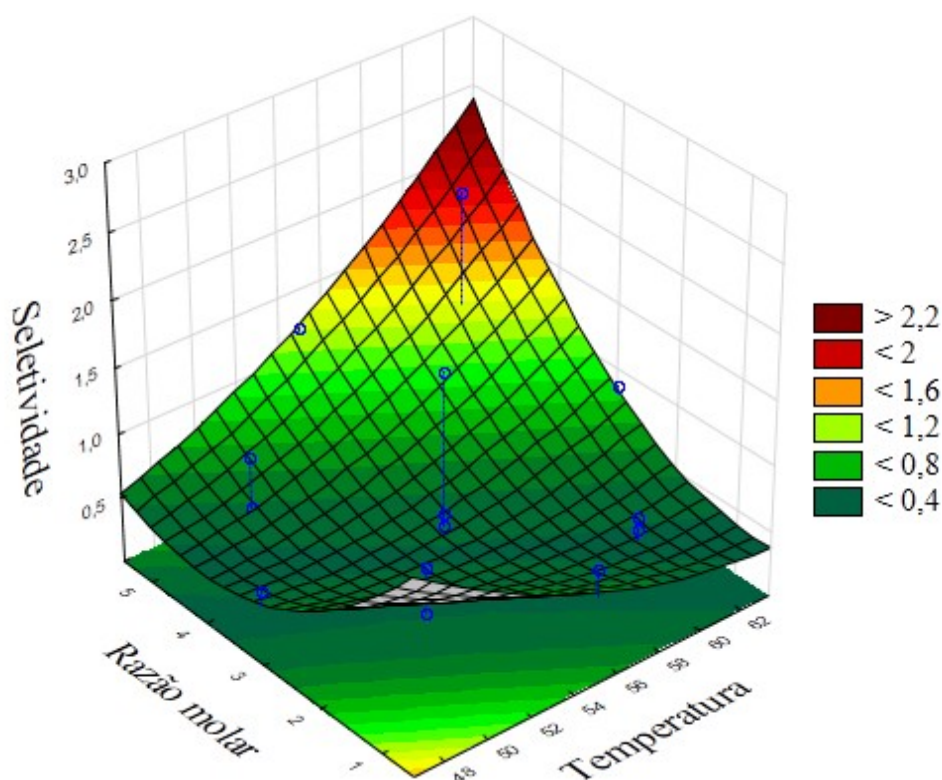


Figura 4.23 – Superfície de resposta para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação ao ácido esteárico como função da razão molar e temperatura, utilizando 4 %m de lipase de *Rhizopus oryzae*, 180 rpm, 5 %m de peneira molecular 5 Å e tempo reacional de 24 h.

Utilizando 4 %m de catalisador, foi possível aumentar 193% da seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae*, ou seja, sua preferência pelo ácido esteárico, quando a razão molar álcool:ácido graxo foi alterada de 3:1 para 5,52:1 a 55 °C.

4.4.2.2 Comparação entre as seletividades das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* em relação aos ácidos esteárico e palmítico

Previamente, é possível afirmar que para as condições estudadas, a lipase de *Candida antarctica* é mais seletiva para ácido palmítico. Vale ressaltar que a faixa de valores selecionada não influenciou significativamente o resultado de seletividade para essa enzima.

Ao contrário, a lipase de *Rhizopus oryzae*, apesar de ter sido seletiva majoritariamente pelo ácido palmítico, também teve preferência pelo ácido esteárico em alguns ensaios (4, 9 e 12 da Tabela 4.18).

Como a especificidade de uma enzima resulta da conformação das cadeias laterais de aminoácidos que compõem o seu sítio ativo, e dos que o cercam, mais dados a esse respeito são necessários para confirmar a hipótese relacionada à forma e composição do sítio ativo da lipase de *Rhizopus oryzae*.

4.4.3 Avaliação da seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* utilizando cargas enzimáticas iguais na reação de esterificação dos ácidos esteárico e palmítico

Nas reações de esterificação da mistura de ácidos graxos saturados, realizadas segundo planejamento experimental exposto na Tabela 4.13, a quantidade de catalisador utilizado foi dada em termos de massa/massa, dessa forma, levando em consideração que as duas enzimas estudadas possuem diferentes atividades de esterificação, conforme Tabela 4.2, para uma mesma reação, a quantidade de massa das duas lipases foi a mesma, mas a carga variou, sendo a da *Candida antarctica* sempre superior a da *Rhizopus oryzae*.

Para descartar a hipótese de que as lipases estariam obtendo resultados distintos de seletividade devido à diferença das suas cargas, foram realizadas reações fixando-se a carga enzimática em 200 U. Nessas condições, a seletividade de ambas as lipases foi de 0,47, o que está de acordo com os resultados observados no planejamento experimental, nos quais, ambas as enzimas preferiram o ácido palmítico, tendo sido, a lipase de *Candida antarctica*, seletiva para o referido ácido em 100% dos ensaios.

4.5 Avaliação da seletividade das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* a partir de dados da esterificação química

Tendo em vista que a seletividade das enzimas é um dado importante no que diz respeito à sua melhor aplicação para a obtenção de um determinado produto com o maior rendimento possível, seja ele oriundo de ácido graxo saturado ou insaturado, conhecer as condições em que é possível conduzi-la a selecionar majoritariamente um substrato ao invés do outro é objeto de estudo de diversas pesquisas acadêmicas (Meng *et al.* 2010 e 2011; Da Rós *et al.*, 2012; Giua *et al.*, 2012).

Nesse contexto, por se tratar de uma reação inespecífica, através da esterificação química, foi obtido um valor de seletividade que representou a relação entre os ésteres de ácidos graxos desejados para cada substrato selecionado (óleo hidrolisado de peixe ou mistura

de ácidos graxos saturados). A Figura 4.24 apresenta as seletividades obtidas através das esterificações química e enzimática (obtida a partir do estudo com 200 U de lipase), utilizando o óleo hidrolisado de peixe e a mistura de ácidos graxos saturados palmítico e esteárico. A partir de sua análise, pode-se observar que é possível diminuir ou aumentar a seletividade por ácidos graxos específicos quando enzimas são utilizadas como catalisadores, graças à sua versatilidade e especificidade.

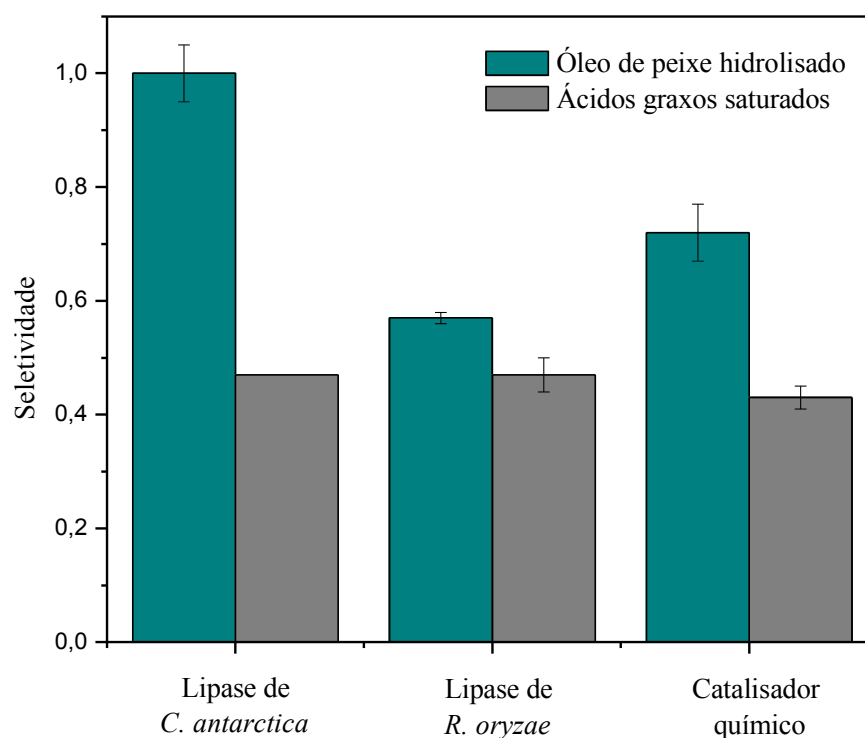


Figura 4.24 – Seletividades obtidas através das esterificações química e enzimática, com carga fixa de 200 U, em óleo hidrolisado de peixe tilápia e na mistura de ácidos graxos saturados palmítico (16:0) e esteárico (C18:0).

Através da esterificação química do óleo hidrolisado de peixe tilápia, foi obtida seletividade de 0,72 para representar a relação entre os ésteres do ácido oleico (C18:1) e do ácido eicosanóico (C20:0). Esse valor implica na obtenção de maior concentração de éster de ácido eicosanóico do que de ácido oleico ao final da reação. Por se tratar de um catalisador químico, portanto, sem especificidade, não é esperado que essa preferência pelo ácido saturado seja alterada, mesmo que as condições reacionais sejam modificadas.

Entretanto, em se tratando de catalisador enzimático, para o mesmo substrato, a lipase de *Candida antarctica* apresentou seletividade maior (1,00), enquanto a de *Rhizopus oryzae* foi menor (0,60). Além disso, como apresentado na Tabela 4.8, esse valor pode ser alterado de acordo com a condição reacional.

Em relação à esterificação química dos ácidos graxos saturados, a relação entre os ésteres do ácido esteárico (C18:0) e palmítico (C16:0) foi 0,43, o que significa a síntese preferencial de éster de ácido palmítico. Analisando a catálise enzimática para o mesmo substrato, ambas possuíram o mesmo valor de seletividade (0,47), inclusive, bem próximo daquele obtido para a catálise química, porém, isso não implica na falta de seletividade das lipases frente aos ácidos palmítico e esteárico, pois, como mostra a Tabela 4.18, esse valor pode ser alterado de acordo com as condições reacionais.

Em suma, a diferença no comportamento dos catalisadores frente aos mesmos substratos é consequência da especificidade inerente às enzimas, o que as tornam vantajosas em relação aos catalisadores químicos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas possuem especificidade e são capazes de diferenciar seu comportamento frente aos substratos, de acordo com as modificações no meio reacional. Essa característica é devido à conformação do sítio ativo, bem como dos resíduos de aminoácidos que o cercam. Sabendo que estes podem possuir cargas e diferentes grupos reacionais, são suscetíveis à modificações por fatores tais como solvente, pH, temperatura e substrato e, portanto, terem sua seletividade alterada. Esse fato é o que as tornam alvos de diversos estudos com o objetivo de otimizar as reações de grande interesse para a síntese de produtos específicos.

5 CONCLUSÕES

A hidrólise do óleo das vísceras de peixe tilápia foi satisfatória, o que garantiu alto índice de ácidos graxos livres para a reação de esterificação enzimática.

Quando em contato com o óleo hidrolisado de peixe tilápia, cuja composição consistiu numa mistura de ácidos graxos saturados e insaturados, nas condições avaliadas, as lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* foram mais seletivas para o ácido graxo saturado, ácido eicosanóico (C20:0), do que para o ácido graxo insaturado, ácido oleico (C18:1).

Em relação às variáveis selecionadas para avaliar a influência na seletividade dos catalisadores, considerando 85% de confiança, nenhuma foi significativa para a ação da lipase de *Candida antarctica*. Já a lipase de *Rhizopus oryzae*, possuiu maior sensibilidade às mudanças conduzidas nos ensaios de esterificação do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, nos quais, praticamente todas as variáveis apresentaram efeito significativo na sua seletividade em relação ao ácido oleico.

A lipase de *Candida antarctica* possuiu maior atividade de esterificação do que a lipase de *Rhizopus oryzae*. A lipase de *Candida antarctica* converteu mais ácido oleico em oleato de etila do que a lipase de *Rhizopus oryzae*, quando utilizado o óleo hidrolisado de peixe tilápia como substrato.

Com nível de confiança de 85%, mais variáveis significativas foram encontradas para o modelo de conversão quando utilizado lipase de *Rhizopus oryzae*. Dessa forma, esta enzima foi mais sensível às alterações do meio reacional do que a lipase de *Candida antarctica*.

Em relação ao meio contendo a mistura de ácidos graxos saturados, nas condições estudadas, a lipase de *Candida antarctica* foi seletiva para ácido palmítico em 100% dos ensaios realizados e a faixa de valores selecionada para avaliar a influência na sua seletividade não afetou significativamente a resposta.

Já lipase de *Rhizopus oryzae* selecionou majoritariamente o ácido palmítico e considerando 85% de confiança, a temperatura, razão molar e quantidade de enzima influenciaram significativamente na seletividade. Dessa forma, foi possível construir um modelo para a seletividade da lipase de *Rhizopus oryzae* em relação ao ácido esteárico.

A lipase de *Candida antarctica* foi responsável pelas maiores conversões de ácido esteárico em estearato de etila. Considerando nível de confiança de 85%, praticamente todas as variáveis selecionadas foram significativas para ambas as enzimas.

Quando a quantidade de enzima foi fixada em 200 U, a lipase de *Candida antarctica* não fez distinção entre os ácidos oleico (insaturado) e eicosanóico (saturado), nas reações de esterificação do ácido oleico presente no óleo hidrolisado de peixe tilápia, enquanto a lipase de *Rhizopus oryzae* esterificou preferencialmente o ácido eicosanóico (saturado). Portanto, nas condições avaliadas, a lipase de *Rhizopus oryzae* é a mais indicada para a obtenção de ésteres de ácidos graxos saturados, tais como biodiesel, componentes de creme rejuvenescedor, antimicrobianos, dentre outros. Já para o meio contendo a mistura de ácidos graxos saturados, ambas as lipases apresentaram o mesmo valor de seletividade, mantendo-se a maior afinidade pelo ácido palmítico.

Ambas as lipases alteraram sua seletividade com as mudanças nas condições reacionais, o que elucidava a especificidade característica dos catalisadores enzimáticos, tornando-os vantajosos em relação aos catalisadores químicos no que se refere à síntese de produtos específicos.

6 TRABALHOS FUTUROS

Como possíveis trabalhos futuros, pode-se apontar:

- a) estudar a quantidade ideal de peneira molecular 5 Å para a obtenção de conversão máxima de ácido oleico em oleato de etila, utilizando o óleo hidrolisado de peixe tilápia;
- b) estudar a quantidade ideal de peneira molecular 3 Å para a obtenção de conversão máxima de ácido oleico em oleato de etila, utilizando o óleo hidrolisado de peixe tilápia e comparar com os resultados obtidos quando utilizado peneira molecular 5 Å;
- c) estudar temperatura ótima das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* utilizando o óleo hidrolisado de peixe tilápia como substrato;
- d) estudar temperatura ótima das lipases de *Candida antarctica* e de *Rhizopus oryzae* utilizando a mistura de ácidos graxos saturados contendo ácido palmítico e ácido esteárico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R.G. Oils and Fats Group International Lecture: The Year of the fish Oils, **Chemistry and Industry**, v. 7, p. 139–145, 1988.

AKANBI, T. O.; ADCOCK, J. L.; BARROW, C. J. Selective concentration of EPA and DHA using *Thermomyces lanuginosus* lipase is due to fatty acid selectivity and not regioselectivity. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 615-620, 2013.

AKOH, C.C.; CHANG, S.; LEE, G.; SHAW, J. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8995–9005, 2007.

AL-ZUHAIR, S., JAYARAMAN, K.V., KRISHNAN, S., CHAN, W. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 212-217, 2006.

AL-ZUHAIR, S., LING, F.W., JUN, L.S. Proposed kinetic mechanism of production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 951-960, 2007.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. AOCS. Official Method Cd 3d-63 - Acid Value, 1997. 2p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM. Official Method ASTM D6304 - 07 Standard Test Method for Determination of Water in Petroleum Products, Lubricating Oils, and Additives by Coulometric Karl Fischer Titration. Guide to ASTM test methods for the analysis of petroleum products and lubricants, 2. ed., 2007.

ANDREÃO, P. S. S.; GIACOMINI, R. A.; STUMBO, A. M.; WALDMAN, W. R.; BRAZ-FILHO, R.; LIGIÉRO, C. B. P.; MIRANDA, P. C. M. L. Utilização e recuperação de sílica gel impregnada com nitrato de prata. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 212-215, 2010.

ARANDA, D. A. G.; SANTOS, R. T. P.; TAPANES, N. C. O.; RAMOS, A. L. D.; ANTUNES, O. A. C. Acid-catalyzed homogeneous esterification reaction for biodiesel production from palm fatty acids. **Catalysis Letters**, v. 122, p. 20–25, 2008.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 141–158, 2007.

ARRUDA, Lia Ferraz de. **Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BERGÉ, J. P.; BARNATHAN, G. Fatty acids from lipids of marine organisms: Molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 49–125, 2005.

BERRIOS, M.;SILES, J.; MARTÍN, M. A.; MARTÍN, A. A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil. **Fuel**, v.86, p. 2383–2388, 2007.

BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Preparation of an stable biocatalyst of bovine liver catalase. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 763–767, 2003.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society Series B - Statistical Methodology**, v. 13, n. 1, p. 1-45, 1951.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistic for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building**. Wiley: New York, 1978.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R.; **Empirical Model-Building and Response Surfaces**. Wiley: New York, 1987.

BU, C.; DUAN, D.; WANG, Y.; MA, L.; LIU, Y.; SHI, G. Acaricidal activity of ethyl palmitate against *Tetranychus cinnabarinus*. **Information Technology and Agricultural Engineering**, v. 134, p. 703-712, 2012.

CAHOON, E.B., SCHMID, K.M. Metabolic engineering of the content and fatty acid composition of vegetable oils. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 161-200, 2008.

CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; FURLANETTO, S.; LOIODICE, F.; FRACCHIOLLA, G.; MASSOLINI, G. Lipases for biocatalysis: development of a chromatographic bioreactor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 715-724, 2003.

CAMPBELL, Mary K.; FARRELL, Shawn O. **Bioquímica**. 5. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007, v. 3 e 8.

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

CHANG, S.-W.; SHAW, J.-F.; SHIEH, C.-H.; SHIEH, C.-J. Optimal formation of hexyl laurate by Lipozyme IM-77 in a solvent-free system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7125–7129, 2006.

CHRISTENSEN, R. **Analysis of variance, design and regression – applied statistical methods**. CRC: New York, 2000.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 177-182, 2012.

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

DERR, J.; KRIS-ETHERTON, P. M.; PEARSON, T. A.; SELIGSON, F. H. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: II. The plasma total and low-density lipoprotein cholesterol response of individual fatty acids. **Metabolism**, v. 42, p. 130–134, 1993.

DIAS, Fernando Pedro. **Aproveitamento de vísceras de tilápia para produção de biodiesel**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

DUAN, ZHANG-QUN; DU, WEI; LIU, DE-HUA. Novozym 435-catalyzed 1,3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1923–1927, 2010.

EBERZ, W. F.; WELGE, H. J.; YOST, D. M.; LUCAS, H. J. The hydration of unsaturated compounds. IV. The rate of hydration of isobutene in the presence of silver ion. The nature of the isobutenesilver complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, p. 45-49, 1937.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R; HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; MATEO, C.; TERRENI, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MOREN, M. A.; ALONSO, J.; GARCÍA-LÓPEZ, J. L.; GUIBAN, J. M. Biotransformations catalyzed by multimeric enzymes: stabilization of tetrameric ampicillin acylase permits the optimization of ampicillin synthesis under dissociation conditions. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 95–104, 2001.

FIAMETTI, K. G.; SYCHOSKI, M. M.; CESARO, A.; FURIGO, JR.; BRETANHA, L. C.; PEREIRA, C. M. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono and diacylglycerols from olive oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 981-987, 2011.

GIUA, L.; COSSIGNANI, L.; SIMONETTI, M. S.; LOMBARDI, G.; BLASI, F. Candida rugosa lipase selectivity toward trans,cis- and cis,trans-conjugated linoleic acid isomers. **European Food Research and Technology**, v. 235, p. 53–59, 2012.

GOTO, H.; SHIONOYA, N.; SUGIE, M.; TOMINAGA, M.; SHIMELIS, O.; TANIGUCHI, M.; IGARASHI, T.; HIRATA, Y. Novel Pre-fractionation Method of Trans Fatty Acids by Gas Chromatography with Silver-Ion Cartridge Column. **Journal of Oleo Science**. v. 61, n. 2, p. 49-56, 2012.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; GOTOR, V. Enzymatic aminolysis and ammonolysis processes in the preparation of chiral nitrogenated compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 1125–1143, 2006.

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Food Engineering**, v.115, n. 4, p. 475-480, 2013.

GRUNDY, S. M.; **Nutrition and Disease Update: Heart Disease**, Ed. Kritchevsky: D. & Carroll, K. K., AOCS, Champaign, Illinois, 1994.

GUERRERO, J. L. MADRID, P. C.; JUÁREZ, R. N. Isolation of some PUFA from edible oils by argentated silica gel chromatography. **Grasasy y Aceites**, v. 54, p. 116–121, 2003.

GUPTA, R.; RATHI, P. ; BRADDOO, S. Lipase mediated upgraation of dietary fats and olis. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 43, p. 635–644, 2003.

HAMM, W. Oil production and processing. In: Caballero, B., Trugo, L.C., Finglas, P.M. (Eds.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed. Academic Press, Amsterdam, pp. 5904–5916, 2003.

HE, W-S.; LI, J-J.; PAN, X-X.; ZHOU, Y.; JIA, C-S.; ZHANG, X-M.; FENG, B. Lipase-mediated synthesis of water-soluble plant stanol derivatives in tert-butanol. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 1-5, 2012.

HOLWERDA, K.; VERKADE, P. E.; DE WILLIGEN, A. H. A. Vergleichemde untersuchungen uber die verseifungsgeschwindigkeit einiger ein sauriger triglyceride unter einfluss von pankreasextrakt. **Recueil des Travaux Chimiques des PaysBas**, v. 55, p. 43-57, 1936.

HUNTER, J.E., ZHANG, J., KRIS-ETHERTON, P.M.. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, p.46–63, 2010.

IVERSON, J. L.; WEIK, R. W. Correlation of fatty acid structure with preferential order of urea complex formation. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists'**, v. 50, p. 1111-1118, 1967.

JAEGER, K.-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

KARABULUT, I.; DURMAZ, G.; HAYALOGLU, A. A. Fatty Acid Selectivity of Lipases during Acidolysis Reaction between Oleic Acid and Monoacid Triacylglycerols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 21, p. 10466–10470, 2009A.

KARABULUT, I.; DURMAZ, G.; HAYALOGLU, A. A. Fatty Acid Selectivity of Lipases during Acidolysis Reaction between Triolein and Saturated Fatty Acids Varying from Caproic to Behenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 16, p. 7584-7590, 2009B.

KIM, S. H.; KIM, S-j.; PARK, S.; M, H. K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzimatic**, v. 85-86, p. 10-16, 2013.

KIRILIAUSKAITÈ, V.; BENDIKIENÈ, V.; JUODA, B. Synthesis of trimethylolpropane esters of oleic acid by Lipoprime 50T. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1561-1566, 2011.

KUO, CHIA-HUNG; CHEN, HSIN-HUNG; CHEN, JIANN-HWA; LIU, YUNG-CHUAN; SHIEH, CHWEN-JEN. High Yield of Wax Ester Synthesized from Cetyl Alcohol and Octanoic Acid by Lipozyme RMIM and Novozym 435. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11694-11704, 2012.

LEAF, A.; WEBER., P.C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. **The New England Journal of Medicine**, v. 318, p.549-557, 1988.

LERIN, L. A.; FEITEN, M. C.; RICHETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; OESTREICHER, E. G.; OLIVEIRA, D. Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 5, p. 988-996, 2011.

LI, M.; PITTMAN JR., C.U.; LI, T. Extraction of polyunsaturated fatty acid methyl esters by imidazolium-based ionic liquids containing silver tetrafluoroborate - Extraction equilibrium studies. **Talanta**, v. 78, p.1364-1370, 2009A.

LI, W.; YANG, B.; WANG, Y.; WEI, D.; WHITELEY, C.; WANG, X. Molecular modeling of substrate selectivity of *Candida antarctica* lipase B and *Candida rugosa* lipase towards *c*9, *t*11- and *t*10, *c*12-conjugated linoleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 299-303, 2009B.

LIMA, Larissa Pinto. **Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando a produção de biodiesel**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THEILIN, B.; NYSTRÖM, A.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p. 3-40, 1998.

MADRID, P. C.; GUERRERO, J. L. High-performance liquid chromatographic purification of γ -linolenic acid (GLA) from the seed oil of two *Boraginaceae* species. **Chromatographia**, v. 56, p. 673-677, 2002.

MAROUNEK, M.; PAVLATA, L.; MISUROVA, L.; VOLEK, Z.; DVORAK, R. Changes in the composition of goat colostrum and milk fatty acids during the first month of lactation. **Czech Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 28-33, 2012.

MARTÍNEZ, J. C., MADRID, P. C.; GUERRERO, J. L. γ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p. 294-298, 2004.

MENG, Y. H.; CHEN, B. Q.; YANG, N.; WANG, G. L.; LI, Y.; TAN, T. W.: Oleic acid esterification in solvent-free medium by *Yarrowia lipolytica* lipase immobilized on fabric membranes. **Journal of Biobased Mater Bioenergy**, v. 4, p. 73-78, 2010.

MENG, Y.; WANG, G.; YANG N.; ZHOU, Z.; LI, Y.; LIANG, X.; CHEN, J.; LI, Y.; LI, J. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 6, 2011.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. Acesso em: 14 fev. 2013.

MOHAMED, I. O. Lipase-catalyzed synthesis of cocoa butter equivalent from palm olein and saturated fatty acid distillate from palm oil physical refinery. **Applied Biochemistry and Biothecnology**, v. 168, n. 6, p. 1405-1415, 2012.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; **Response surface methodology**. Wiley: New York, 2002.

NAKPONG, P.; WOOTHIKANOKKHAN, S. High free fatty acid coconut oil as a potential feedstock for biodiesel production in Thailand. **Renewable Energy**, v. 35, n. 8 p. 1682–1687, 2010.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., HAREL, M., REMINGTON, S. J., SILMAN, I., SCHRAG, J. D., SUSSMAN, J. L., VERSCHUEREN, K. H. G., & GOLDMAN, A. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering Design and Selection**. v. 5, p. 197-211, 1992.

ONG, A. L.; KAMARUDDIN, A. H.; BHATIA, S.; LONG, W. S.; LIM, S. T.; KUMARI, R. Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 924–929, 2006.

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

PAN, X.; CHEN, B.; WANG, J.; ZHANG, X.; ZHUL, B.; TAN, T. Enzymatic synthesizing of phytosterol oleic esters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n.1, p. 68-77, 2012.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R., NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-161, 1999.

PARENTE, R. C.; NOGUEIRA, C. A. Jr.; CARMO, F. R.; LIMA, L. P.; FERNANDES, F. A. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; SANT'ANA, H. B. Excess Volumes and Deviations of Viscosities of Binary Blends of Sunflower Biodiesel + Diesel and Fish Oil Biodiesel + Diesel at Various Temperatures. **Chemical Engineering Journal**, v. 56, p. 3061-3067, 2011.

PATTERSON, H. B.W. **Safeguarding qua ty and yield. In Handling and Storage of oilseeds, oils, fats and meals**. New York: Patterson. Elsevier Applied Science. ed. H.B.W., 1989, p. 86.

PERIGNON, M.; LECOMTE, J.; PINA, M.; RENAULT, A.; SIMONNEAU-DEVE, C.; VILLENEUVE, P. Evaluation of *Rhizopus oryzae* Lipase for the Determination of Regiodistribution in Triacylglycerols with Medium Chain Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 89, 1, p. 89-96, 2012.

PUWASTIEN, P.K.; NAKNGAMANONG, Y.; BHATTACHARJEE, L. Proximate composition of raw and cooked thai freshwater and marine fish. **Journal Food Composition and Analysis**, v. 12, pp. 9–16, 1999.

QIU, X. **Anti-aging cosmetic cream, e.g. used for keeping skin elastic and youthful, includes *Coleus blumei* extract, magnesium carbonate, ellagic acid, bentonite, glycerol monostearate, diglyceryl monoisostearate, paraffin oil and ethyl palmitate.** CN101732186-A, 2010.

REYES, H.R.; HILL JR., C.G. Kinetic modeling of interesterification reactions catalyzed by immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 2, p. 171–182, 1994.

RICHETTI, Aline. **Esterificação enzimática de palmitato de 2-etilexila em sistema livre de solvente.** 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R. L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100–109, 2008.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** 2. ed. Campinas-SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. Review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15–32, 2010.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 648–653, 2007.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; CARBALLIDO, J. R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 1–12, 2010.

SAJILATA, M.G.; SIGHAL, R.S.; KAMAT, M.Y. Fractionation of lipids and purification of γ -linoleic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 109, p. 580–586, 2008.

SALUM, T. F. C. **Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos.** Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SARGENT, J.R.; MCEVOY, L.A.; BELL, J.G. Requirements presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117–127, 1997.

SCHERVISH, M. J. P values: What they are and what they are not. **American Statistician**, v. 50, n. 3, p. 203–206, 1996.

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

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

SILVA, G. F.; CAMARGO, F. L.; FERREIRA, A. L. O. Application of response surface methodology for optimization of biodiesel production by transesterification of soybean oil with ethanol. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 407-413, 2011.

SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 77, n. 79, p.745-757, 1999.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10. ed. São Paulo: LTC, 2012, v. 1.

SRINIVAS, D.; SATYARTHI, J. K. Biodiesel production from vegetable oils and animal fat over solid acid double-metal cyanide catalysts. **Catalysis Surveys from Asia**, v. 15, p. 145-160, 2011.

STANSBY, M. E. Marine-derived fatty acids or fish oils as raw material for fatty acids manufacture. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 11, p. 793A-796A, 1979.

STANSBY, M. E. **Fish oils in nutrition**. New York: van Nostrand Reinhold. ed. Stansby, M. E., 1990.

STROCCHI, A.; BONAGA, G. Correlation between urea inclusion compounds and conformational structure of unsaturated C-18 fatty acid methyl esters. **Chemical Physical Lipids**, v. 15, p. 87-94, 1975.

TAN T, NIE K, WANG F. Production of biodiesel by immobilized *Candida sp.* lipase at high water content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 128, p.109-116, 2006.

TAYLOR, R.J. **The Chemistry of Glycerides**. Unilever Educational Booklet Advanced Series, n.4. Unilever Information Division. London, 1973.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria ii: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

UPPENBERG, J.; ANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

UPPENBERG, J.; ÖHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase b from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, p. 16838-16851, 1995.

URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por catálise enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

VAZQUEZ, L.; KLEINER, L.; AKOH, C. C. Concentration of Stearidonic Acid in Free Fatty Acids Form from Modified Soybean Oil by Selective Esterification with Dodecanol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 9, p. 1655-1662, 2012.

VELIKODVORSKAYA, V. V.; RABINKOV, A. G.; KOPELEVICH, V. M.; TOLOSA, E. A.; BULANOVA, L. N.; GUNAR, V. I. Study of the substrate-specificity of rat-liver acetyl-coa carboxylase. **Biochemistry-Moscow**, v. 55, n. 6, p. v, 1990.

VELOSO, L. Biodiesel de peixe: Projeto da Petrobras e do Ministério da Pesca transforma restos de pescado em matéria-prima de biocombustível "limpo". **ISTO É Independente**, edição 2244, 09 novembro 2012. Disponível em: 09 novembro 2012.

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

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C; W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, cap. 4.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, p. 41-49, 1999.

WANG, W. F.; LI, T.; NING, Z. X.; WANG, Y. H.; YANG, B.; MA, Y. J.; YANG, X. Q. A process for the synthesis of PUFA-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil. **Journal of Food and Engineering**, v. 109, n. 3, p. 366-381, 2012.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3627-3652, 2005.

WATANABE Y, NAGAO T, NISHIDA Y, TAKAGI Y, SHIMADA Y. Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 1015-1021, 2007A.

WATANABE Y, PINSIRODOM P, NAGAO T, YAMAUCHI A, KOBAYASHI T, NISHIDA Y, TAKAGI Y, SHIMADA Y. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 99-105, 2007B.

WEI, W.; SUN, J.; ZHAO, L. **Use of ethyl palmitate for preventing *Bursaphelenchus xylophilus* from affecting pine tree**. CN101849539-A, 2010.

WONG, C.-H. AND WHITESIDES, G. M. (1994). Enzymes in synthetic organic chemistry. **In: Tetrahedron Organic Chemistry Series** (Baldwin, J. E., Williams, R. M., Bäckvall, J.-E., eds.). Pergamon: Amsterdam, The Netherlands, 12, pp. 41-130.