



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

JOERLLY ROMÃO DA SILVA

**LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES
COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO INDUSTRIAL A PARTIR DE ÁCIDOS
GRAXOS DO ÓLEO DE PEQUIÍ (*Caryocar brasiliense sp.*)**

CUITÉ – PB

2016

JOERLLY ROMÃO DA SILVA

**LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES
COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO INDUSTRIAL A PARTIR DE ÁCIDOS
GRAXOS DO ÓLEO DE PEQUÍ (*Caryocar brasiliense sp.*)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Farmácia da Universidade Federal de
Campina Grande como requisito para a
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof.º Dr. Wellington Sabino Adriano

CUITÉ – PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586l Silva, Joerlly Romão da.

Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada para produção de ésteres com potencial de aplicação industrial a partir de ácidos graxos do óleo de pequi. / Joerlly Romão da Silva. – Cuité: CES, 2016.

67 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientador: Wellington Sabino Adriano.

1. Bioquímica. 2. Lipase. 3. Quitosana. 4. Óleo de pequi. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 577.1

JOERLLY ROMÃO DA SILVA

LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES COM
POTENCIAL DE APLICAÇÃO INDUSTRIAL A PARTIR DE ÁCIDOS GRAXOS DO
ÓLEO DE PEQUIÍ (*Caryocar brasiliense sp.*)

Aprovação em 05 / 05 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Wellington Sabino Adriano (UFCG/CES)
Orientador/Presidente

Prof.º Dr. Maria Emília da S. Menezes (UFCG/CES)
Membro da Comissão

Prof.º Dr. Marciano Henrique de Lucena Neto (UFCG/CES)
Membro da Comissão

CUITÉ - PB
2016

Dedico a Deus. A meus pais João Romão e Rosileide, meu irmão Juciano Romão, e meu avô Manoel Romão Neto *in memoriam*, por sempre me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas decisões, com todo carinho, paciência, amor, dedicação, mostrando-me sempre qual melhor caminho seguir. A vocês, todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo infinito amor que tem por mim, pela constante companhia na minha vida, que nos momentos de fraqueza me manteve firme, permitindo sempre vencer os obstáculos durante a graduação. A Ele a honra a gloria e o louvor.

A meus pais João Romão e Rosileide Maria que sempre cuidou tão bem de mim, com todo amor, carinho, paciência, e que encheram os olhos de lágrimas quando souberam da minha tão sonhada aprovação no vestibular, e desde então agarraram esse sonho com unhas e dentes, não permitindo que nada pudesse atrapalhar. O meu muito obrigado.

Meu irmão Juciano Romão que mesmo longe sempre me apoiou em todos os momentos, com muita sabedoria e paciência, um abraço caloroso em você meu parceiro.

Agradeço a todos os outros familiares, avós, tios, tias e primos que muitos torceram e lutaram junto comigo nesses anos, em especial a minha avó Tereza Fortunato e aos tios Joana Fortunato, Irmã Célia Romão e José Medeiros, tenho muita sorte de ter pessoas tão especiais que torceram por mim nessa jornada, um muito obrigado a todos.

À Maria Emanuela Martins, por toda ajuda, pela compreensão, confiança, por acreditar sempre em meu trabalho, não deixando que desistisse jamais de alcançar os meus objetivos.

À minha amiga Geoclécia Cruz pela monitoria, que foi de extrema importância, que de forma voluntária, auxiliou todos os experimentos e compartilhou das dificuldades enfrentadas em laboratório. Obrigado.

Ao meu orientador, Prof.º Dr. Wellington Sabino Adriano, pela paciência e sabedoria com que transmitiu seus conhecimentos, conduzindo um modesto aluno a atingir seus objetivos de forma digna e honesta, sendo um exemplo de profissionalismo e amor à profissão.

Aos novos e velhos amigos que adquiri no decorrer da vida, bem como os de residência universitária que contribuíram de forma direta ou indiretamente para o crescimento pessoal, em especial José Nyellysson, Michel Perone, Robson Galdino, João Rocha, Tiago Bastos (Índio), ao casal Felipe e Aline pela amizade e confiança e a Nayara, por sempre apoiarem nos momentos difíceis na vida pessoal e acadêmica. Aos amigos Tarcísio Alexandria e família por me acolher como um filho com todo amor e carinho em sua residência durante o último ano do ensino médio. O meu muito obrigado.

À todos os Docentes que ministraram aulas do Curso de Bacharelado em Farmácia, pelos ensinamentos repassados durante a graduação. Onde dividiram suas experiências e

conhecimentos para que fosse possível tornar-me um futuro profissional competente, baseada na ética, segurança e amor a profissão.

Aos funcionários do CES, pela disponibilidade na prestação de serviços, sempre ajudando cada um à sua maneira, em especial aos amigos Fabinho Vigilante, Seu Vital, e a todas as cozinheiras que compõe o grupo responsável pela alimentação da Residência e RU.

Enfim, a todos os mencionados e também àqueles que não foram, mas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, para concretização de uma etapa tão importante em minha vida. Minha eterna gratidão e generosidade.

RESUMO

Lipases, triacilgliceróis éster hidrolases E. C. 3.1.1.3, são enzimas que atuam em ligações ésteres de triacilgliceróis, liberando ácidos orgânicos e glicerol. Em meio aos diferentes suportes usados na imobilização enzimática destaca-se a quitosana, um suporte orgânico consistindo em um polímero natural amplamente empregada devido ao seu baixo custo. Este trabalho teve como objetivo aplicar a enzima lipase de *Rizhomucor miehei* imobilizada em quitosana visando à sua utilização na obtenção de ésteres obtidos a partir dos ácidos graxos provenientes da hidrólise do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense sp.*) com potencial aplicação na indústria farmacêutica. Este trabalho visou promover uma alternativa de aproveitamento de produtos regionais como os óleos, suportes de imobilização, contribuindo para a expansão e diversificação da biotecnologia industrial e promovendo a síntese de compostos onerosos como os ésteres a partir de matéria prima de baixo custo. Inicialmente realizou-se a imobilização da enzima no organogel a base de quitosana bem como a quantificação de sua atividade. Posteriormente foi realizado os ensaios de esterificação a partir de ácidos graxos do óleo de pequi em diferentes proporções de etanol sob agitação de 150 rpm à 37°C num período de 24 horas. Foram realizados ensaios de esterificação na presença do amido em meio reacional como agente dessecante ou adsorvente. Determinou o índice de acidez do meio inicial e final para saber qual o rendimento de ésteres produzidos. A lipase em sua forma imobilizada evidenciou atividade de 0,56 U/g, apresentando rendimento médio de 76% de ácidos graxos. Ocorreu valor máximo de conversão nos ensaios realizados com a lipase imobilizada na razão molar 1:1, sendo 56,67% de ésteres formados na reação sem a presença do agente dessecante e 70,53% de conversão em meio reacional com a presença do agente. Com o aumento da razão molar, houve uma diminuição na formação dos ésteres devido ao aumento de concentração do álcool, formando uma barreira impedindo o acesso dos ácidos graxos ao sítio ativo da enzima retirando a camada aquosa protetora da estrutura enzimática. Fazendo uso do amido em meio reacional permitiu-se evitar que a presença da água residual formada durante a reação de esterificação promovesse a hidrólise dos ésteres formados, favorecendo o aumento da conversão.

Palavras - Chave: Lipase; Imobilização; Esterificação; Quitosana; Óleo de pequi.

ABSTRACT

Lipases, triacylglycerol ester hydrolase E.C. 3.1.1.3, are enzymes that act on ester bonds of triacylglycerols, releasing organic acids and glycerol. Among the different media used in enzyme immobilization stands out chitosan, an organic support consisting of a natural polymer widely used due to its low cost. This work aims to apply the Rizhomucor lipase enzyme miehei immobilized on chitosan aiming to use in obtaining esters obtained from fatty acids derived from the hydrolysis of Pequí oil (*Caryocar brasiliense sp.*) With potential application in the pharmaceutical industry. It is extremely important to conduct this study, aiming to promote use of alternative regional products such as oils, immobilizing supports, contributing to the expansion and diversification of industrial biotechnology and promoting the synthesis of expensive compounds such as esters from raw material low cost. Initially there was the immobilization of the enzyme in the organogel chitosan base as well as the quantification of its activity. Subsequently esterification was performed assays from fatty acids Pequí oil in different proportions of ethanol under stirring of 150 rpm at 37 ° C in a 24 hour period. Esterification assays were performed on starch present in the reaction medium as a desiccant or adsorbent. It is given the acid value of the initial and final means to know the income produced esters. The lipase immobilized form showed activity of 0.56 U/g, obtained a 76% yield of fatty acids. There was maximum conversion value of the tests performed with lipase immobilized form in the molar ratio 1: 1 with 56.67% of esters formed in the reaction without the presence of desiccant and 70.53% conversion in the reaction medium with agent presence. With the increase in molar ratio, there was a decrease in the formation of esters due to the increased concentration of alcohol, forming a barrier preventing access of fatty acids to the active site of the enzyme by removing the protective aqueous layer structure of the enzyme. Making use of the starch in the reaction medium allowed to prevent the presence of residual water formed during the esterification reaction did not promote hydrolysis of esters formed, favoring an increase of the conversion.

Key - words: Lipase; immobilization; esterification; chitosan; pequí oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação geral de hidrólise de um Triacilglicerol.

Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*.

Figura 3: Modelo estrutural das α/β hidrolase.

Figura 4: Estrutura tridimensional da enzima lipase de *Rhizomucor miehei* em sua forma aberta (A e C) e fechada (B e D).

Figura 5: Ativação interfacial de Lipase.

Figura 6: Métodos de imobilização de enzimas.

Figura 7: Estrutura dos biopolímeros (a) quitosana (b) quitina (c) celulose.

Figura 8: Diagrama de produção comercial de quitina e quitosana.

Figura 9: Influência do pH sobre a estrutura da quitosana.

Figura 10: Representação da reação reversível de esterificação.

Figura 11: Ésteres usados como flavorizantes e produzidos a partir de lipases por reação de esterificação.

Figura 12: Exemplos de ésteres de aroma usados como flavorizantes obtidos por catálise enzimática.

Figura 13: Síntese do organo-gel a base de solução de quitosana 5% m/v.

Figura 14: Etapas da imobilização de lipase em organo-gel.

Figura 15: Reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato (pNPB).

Figura 16: Determinação da atividade da lipase livre e /ou imobilizada e autodegradação do pNPB.

Figura 17: Reação de Saponificação.

Figura 18: Processamento de obtenção de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti.

Figura 19: Fluxograma referente ao ensaio de obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do óleo de buriti.

Figura 20: Estrutura macroscópica do organo-gel a base de quitosana.

Figura 21: Conversão em ésteres apresentadas para cada ensaio realizado respectivamente com óleo de pequí na ausência de sagu no meio reacional.

Figura 22: Percentual de conversão em ésteres apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na presença de sagu (amido) no meio reacional.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Óleo da polpa de pequi: composição em ácidos graxos.

Tabela 2: Razões molares, e suas equivalentes concentrações de ácido e etanol.

Tabela 3 - Valores referentes as massas de organogéis com lipase imobilizada seguido de diferentes atividades do suporte em cada reator.

Tabela 4 - Rendimento obtido nos ensaios de hidrólise de triglicerídeos do óleo de pequi in natura.

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão referente aos ensaios de esterificação para cada razão molar utilizando o óleo de pequi. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).

Tabela 6 - Média \pm desvio padrão referente aos ensaios de esterificação realizados em duplicata com óleo de pequi em presença de amido no meio reacional. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).

LISTA DE ABREVIATURAS

TAG - Triacilgliceróis

Kda - KiloDalton

pH - potencial Hidrogeniônico

m/m - Porcentagem massa massa

°INPM - Porcentagem de álcool em massa ou grau alcoólico

pNP - p-nitrofenol

pNPB - Butirato de p-nitrofenila

KOH - Hidróxido de Potássio

X - Conversão, %

SDS - Dodecilsulfato de sódio

U - Umidade, %

μL – Microlitro (unidade de volume)

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1. Objetivo geral | 18 |
| 2.2. Objetivos específicos | 18 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 3.1. Enzimas | 19 |
| 3.2. Uso da Lipase como Biocatalisador Enzimático | 19 |
| 3.3. Lipases de <i>Rhizomucor miehei</i> | 21 |
| 3.4. Imobilização Enzimática | 24 |
| 3.5. Uso da Quitosana como Suporte para Imobilização de Enzimas | 27 |
| 3.6. Esterificação de Ácidos Graxos..... | 31 |
| 3.6.1. Influência da Água na Reação de Esterificação | 32 |
| 3.6.2. Influência do álcool na reação de esterificação | 32 |
| 3.7. Ésteres na Indústria Farmacêutica | 33 |
| 3.8. Óleo de Pequí | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1. Materiais | 37 |
| 4.1.1. Enzima | 37 |
| 4.1.2. Suporte..... | 37 |
| 4.1.3. Substratos | 37 |
| 4.1.4. Agente adsorvente | 37 |
| 4.1.5. Reagentes utilizados no tratamento do suporte, obtenção de ácidos graxos livres e esterificação | 37 |
| 4.2. Métodos | 38 |
| 4.2.1. Preparo do suporte a base de quitosana | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2.2. Imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em organogel..... | 39 |
| 4.2.3. Determinação da Atividade da Lipase e Autodegradação do Substrato..... | 40 |
| 4.2.4. Produção de ácidos graxos livres a partir do óleo de pequi | 42 |
| 4.2.5. Ensaio de esterificação utilizando ácidos graxos com a lipase imobilizada | 43 |
| 4.2.6. Índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres | 45 |
| 4.2.7. Conversão | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 5.1 Atividades da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada | 47 |
| 5.2 Obtenções dos ácidos graxos livres do óleo de pequi | 48 |
| 5.3 Ensaio de esterificação utilizando ácidos graxos do óleo de pequi com a lipase imobilizada | 49 |
| 5.4 Esterificações com a presença de agente dessecante (amido) no meio de reação | 52 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 55 |
| 7. REFERÊNCIAS | 56 |
| APÊNDICE | 65 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas na sua forma nativa (enzimas livres) pode ser rastreada desde as civilizações antigas na indústria de alimentos e mais recentemente nas indústrias farmacêuticas e químicas. Atualmente quase 4000 enzimas são conhecidas, e dessas, cerca de 200 estão em uso comercial, sendo que esse número continua a multiplicar-se por causa das muitas transformações que podem catalisar (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001). Dentre as muitas enzimas usadas nos processos industriais, as lipases se destacam cada vez mais e estão entre as mais utilizadas, porque reconhecem uma grande variedade de substratos e pode catalisar muitas reações diferentes, tais como hidrólise ou a síntese de ésteres. A versatilidade das lipases faz com que essas sejam usadas em muitas reações com diferentes aplicações, como a produção de medicamentos, na indústria química ou modificação de alimentos (Rodrigues; Fernandez-Lafuente, 2010a).

Apesar de possuírem excelentes perspectivas como catalisadores, quando utilizadas em sua forma livre apresentam características que limitam a sua utilização em escala industrial, como a solubilidade destas no meio de reação, que impede a sua separação do meio reacional e a sua reutilização em outros processamentos, bem como inviabiliza economicamente a sua separação dos produtos formados (Adriano, 2008). Devido à enzima estar em baixas concentrações no meio, a sua recuperação se torna onerosa / custosa para a indústria, sendo inviável o seu uso como matéria-prima não reciclável. Torna-se importante promover alternativas que viabilizem a utilização de enzimas em escala industrial, fazendo com que o processo se torne mais acessível financeiramente. Uma alternativa muito viável é a imobilização das enzimas em suportes de baixo custo, como a quitosana, pois permite superar as desvantagens apresentadas no uso da enzima em sua forma livre no meio reacional. Permitindo uma diminuição no custo do processo, devido ao biocatalisador poder ser facilmente separado do meio reacional e ser reutilizado em outras reações (Adriano, 2008).

Contudo, as lipases (Triacilglicerol éster hidrolases E.C 3.1.1.3) vêm se destacando entre as demais, por catalisarem a hidrólise de ligações éster presentes e triglicerídeos/acilgliceróis. A reação é reversível, podendo ocorrer em ambientes não aquosos (Paiva; Balcão; Malcata, 2000). As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) sendo que a origem microbiana representa a grande maioria (Martins; Kalil; Costa, 2008). As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens em relação às lipases de origem animal e vegetal (Dalla-Vecchia;

Nascimento; Soldi, 2004). Os ésteres formados representam uma das mais importantes classes de compostos orgânicos e podem ser sintetizados por vários mecanismos, dentre os métodos existentes pode ser citado a reação entre ácido graxo e álcool, com consequente eliminação de água, denominando-se reação de esterificação (Hasan; Shah; Hameed, 2006). O que determinará a propriedade do produto formado será a natureza química dos ácidos graxos de origem, assim, a matéria prima é de fundamental importância para que o éster de interesse seja sintetizado. Logo, são realizados estudos de investigação do potencial catalítico de lipases imobilizadas em organogéis, para a formação de ésteres, utilizando álcoois secundários, avaliando o comportamento durante as reações de esterificação neste novo sistema. Essas enzimas são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, baixo custo, além de não requererem cofatores (Jesus et al, 1997).

Nesse contexto, esse trabalho estuda a síntese de ésteres por rota enzimática a partir de óleos presentes na região Nordeste, como o óleo de pequi utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada. Visando promover uma alternativa de aproveitamento de produtos regionais como os óleos vegetais, suportes de imobilização, contribuir para o crescimento, diversificação e aprimoramento da biotecnologia industrial, promovendo a síntese de compostos onerosos como ésteres a partir de matéria prima de baixo custo, acarretando em potenciais benefícios socioeconômicos através do desenvolvimento de uma tecnologia inovadora, descentralizando um pouco o eixo de pesquisa nesse tema que se concentra mais nas regiões sul e sudeste do país, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento de mais um polo de pesquisa no tema na região nordeste do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Aplicar um catalisador estável usando lipase de *Rizhomucor miehei* em suporte de baixo custo, com a adição de microemulsão visando à utilização deste catalisador na produção de ésteres com potencial aplicação industrial.

2.2. Objetivos específicos

- Imobilizar de lipase de *Rizhomucor miehei*, gerando menores custos industriais;
- Agregar valores a materiais de baixo custo como a quitosana, o amido (sagu);
- Obter ácidos graxos a partir do óleo de pequí para esterificação;
- Produzir ésteres que possam ser aplicados na área farmacêutica;
- Avaliar a influência na conversão em ésteres após a adsorção da água residual.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Enzimas

O homem vem utilizando as enzimas empiricamente há milhares de anos em diversos processos, tais como a fermentação do suco de uva para a obtenção do vinho, na fabricação de pães e queijos. Porém, eram apenas aplicações práticas, por não conhecerem o modo de ação destes catalisadores biológicos que só foi elucidado muito tempo depois (Nelson; Cox, 2002). Enzimas são proteínas capazes de promover e acelerar reações químicas, estando presentes em todos os seres vivos e regulando grande número de processos metabólicos como respiração celular, síntese e degradação de proteínas, lipídeos, carboidratos, entre outras reações (Silva, 2010). A velocidade da reação enzimática é influenciada pelas concentrações de substrato, enzima, pH, temperatura e presença de ativadores ou inibidores enzimáticos (Castro; Mendes; Santos, 2004; Silva, 2010).

Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são, frequentemente, muito superiores aos dos catalisadores inorgânicos e orgânicos, possuem um alto grau de especificidade para seus substratos, aceleram as reações quando comparado a uma reação não catalisada. Como todos os outros catalisadores, elas atuam diminuindo a energia de ativação necessária para que se atinja um estado de transição e ocorra reação química, acarretando no aumento da velocidade de uma reação (Lehninger; Cox; Nelson, 2006).

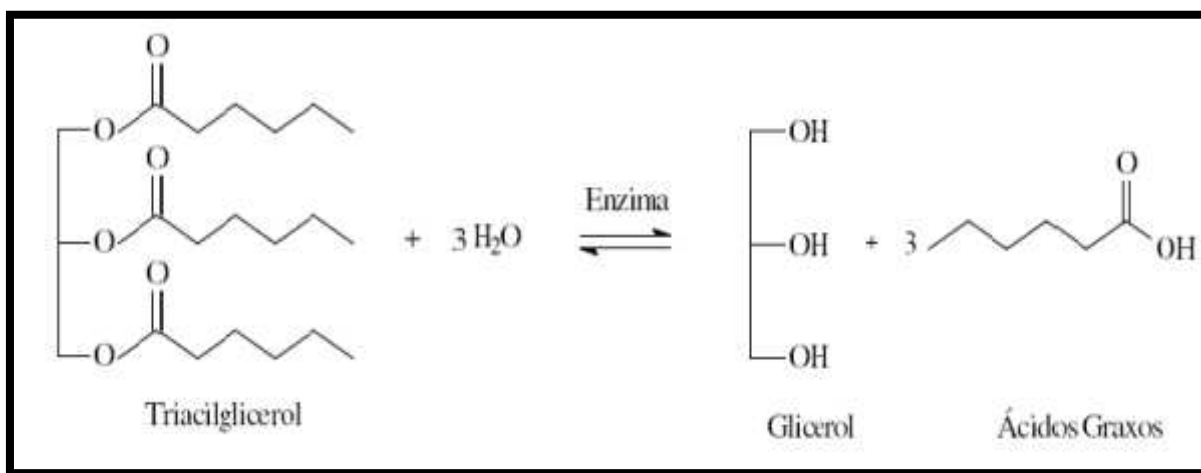
A atividade catalítica depende da integridade da conformação nativa da proteína, pois, se a enzima for desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é perdida, portanto, as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias proteicas são essenciais para a sua atividade catalítica (Silva, 2010).

3.2. Uso da Lipase como Biocatalisador Enzimático

Biocatálise é a técnica que utiliza catalisadores biológicos, sejam enzimas ou microorganismos, para a conversão de um substrato em produto. Dentre as enzimas de grande interesse industrial podemos citar as lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3), estas enzimas compõe à família das hidrolases, que atuam na interface óleo-água catalisando a reação de hidrólise do Triacilglicerol (TAG), obtendo como produto ácido graxo livre e

glicerol (Figura 1), além dessas reações as lipases catalisam as reações de transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), como também na síntese de diferentes ésteres carboxílicos e aminólise (síntese de amidas), propriedades enantiosseletivas, lactonização (esterificação intramolecular), apresentando níveis aceitáveis de atividade e estabilidade frente à ambientes aquosos e não-aquosos (Figueiredo, 2013; Franken et al., 2010; Martins; Kalil; Costa, 2008; Mendes; Castro; Giordano, 2013).

Figura 1: Reação geral de hidrólise de um Triacilglicerol.



Fonte: Adaptado de Jaeger; Reetz, 1998.

Para que a hidrólise enzimática ocorra são necessários dois importantes requisitos: a formação de uma interface óleo-água e sua consequente adsorção nessa interface. Portanto, quanto maior a interface emulsionante, maior será a quantidade de enzima adsorvida, proporcionando maiores velocidades de reações. A lipase vem mostrando-se como um dos principais catalisadores com alta potencialidade, contribuindo assim de forma crescente com a rica e pouca explorada bioindústria (Joseph; Ramteke; Kumar, 2006). Estas enzimas podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal, tendo como exemplo a mamona (*Ricinus communis*) e microbiana (bactérias e fungos), sendo que a origem microbiana representa a grande maioria (Martins; Kalil; Costa, 2008). Os microorganismos apresentam uma excelente produção de lipases extracelulares e é a fonte de escolha para a produção em escala industrial em relação às lipases de origem animal e vegetal, possuindo menor tempo de geração, alto rendimento de conversão de substrato em produto, vasta versatilidade, maior simplicidade na manipulação de cultivo (extração, isolamento e purificação), mais estáveis e apresentam propriedades diferentes das lipases de origem animal

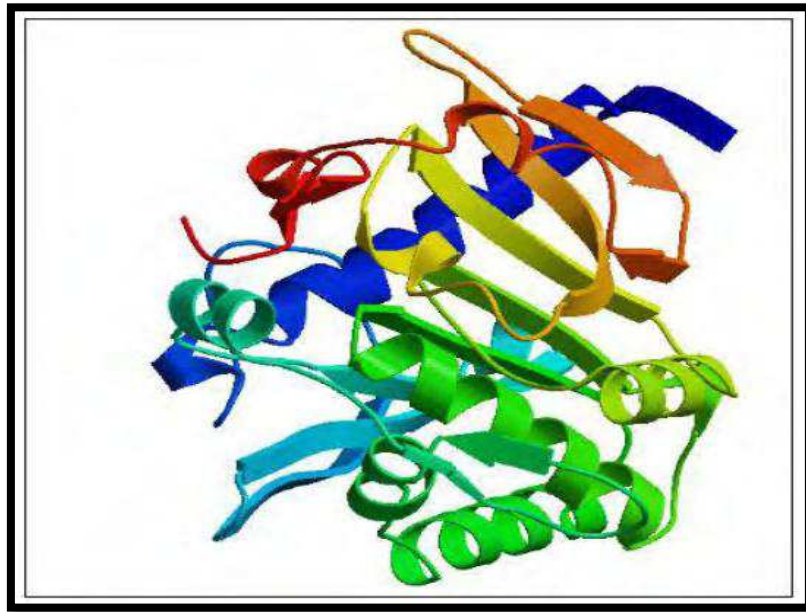
e vegetal (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004; Durli, 2007; Hasan; Shah; Hameed, 2006).

Os motivos do enorme potencial biotecnológico da lipase incluem: sua alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de cofatores, baixo custo, possuem uma larga especificidade pelo substrato, atuação em grande faixa de pH, facilidade de produção em grandes quantidades, regiosseletividade, quimiosseletividade e exibem uma alta enantiosseletividade (Castro; Mendes; Santos, 2004; Nuernberg, 2003). A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se à enantiosseletividade exibida por muitas destas enzimas. A catálise enantiosseletiva permite a obtenção de produtos opticamente puros, uma vez que estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuarem, preferencialmente, num dos isômeros de uma mistura racêmica. Esta característica é extremamente vantajosa, pois, em muitos casos, uns dos isômeros (R ou S) apresentam atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico. Fazendo o uso dessa biomolécula possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes e eficazes quanto aos realizados pela natureza. Além disso, as enzimas possibilitaram a diminuição de rejeitos descartados pelas indústrias que poderiam comprometer o meio ambiente (Hasan; Shah; Hameed, 2006). Devido às numerosas funções e sua ampla potencialidade, os estudos envolvendo Lipases vêm crescendo de forma constante ao longo do tempo, proporcionando um maior aprofundamento, visando melhorar a atuação desta enzima frente às dificuldades encontradas, e enriquecendo cada vez mais as bibliotecas digitais.

3.3. Lipases de *Rhizomucor miehei*

Lipases de *Rhizomucor miehei* são proteínas extracelulares de origem fúngica, produzidas pelo microorganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, sendo comercializado sob duas formas, na sua forma solúvel (20,000 L) e na forma imobilizada (Lipozyme® IM RM). Estas enzimas apresentam na sua constituição 269 aminoácidos na sua totalidade, um peso molecular de 29 kDa e um ponto isoelétrico 3,8 (Rodrigues; Fernandez-Lafuente, 2010). A Lipase de *Rhizomucor miehei* foi a primeira a ter sua estrutura descrita (Derewenda; Derewenda; Dodson, 1992; Santos, 2011). Na Figura 2, observa-se a estrutura tridimensional da enzima lipase de *Rhizomucor miehei*.

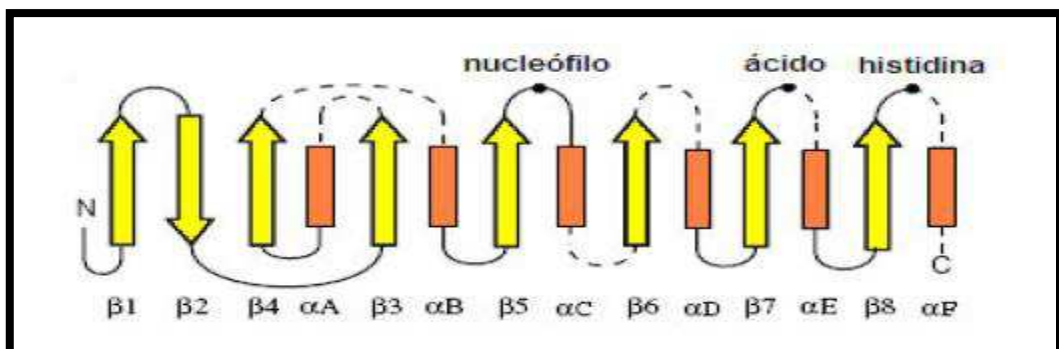
Figura 2: Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*.



Fonte: Bergamasco, 2013.

De acordo com Schmid e Verger (1998) a lipase de *Rhizomucor miehei* possui uma estrutura com conformação em α/β hidrolase composta de uma sequência específica de α hélices e folhas β pregueadas, estas hidrolisam as ligações éster por meio de uma tríade catalítica. Essas enzimas apresentam nos seus sítios ativos uma tríade catalítica composta pelos seguintes aminoácidos: serina 144 (nucleófilo), aspartato/ácido aspártico 203 e histidina 257 (Oliveira, 2012). Podemos observar a sequência α/β hidrolase e os respectivos aminoácidos na figura 3.

Figura 3: Modelo estrutural das α/β hidrolase.

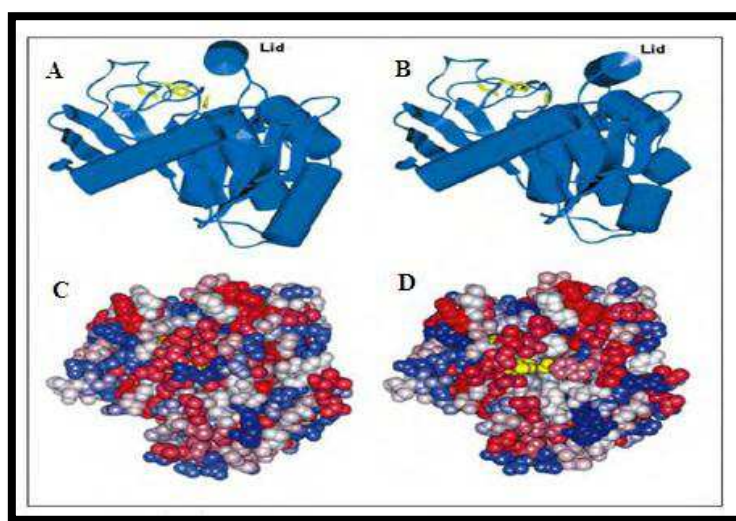


Fonte: Oliveira, 2012.

Apesar de serem solúveis em água, as lipases são capazes de catalizar reações contendo substratos lipídicos insolúveis na interface óleo/água. As enzimas lipolíticas são

qualificadas por aumentar, ao extremo, sua atividade catalítica quando atua na interface óleo-água. Na Figura 4, observa-se a estrutura da enzima lipase da *Rhizomucor miehei* em dois momentos: Lipase de forma fechada (A, C) e de forma aberta (B, D). Nos item A e B (vista lateral), podem-se visualizar a tríade catalítica (amarelo) e os elementos de estrutura secundária mostrando a estrutura alfa/beta-hidrolase comum em todas as lipases. Após a abertura da tampa, a tríade catalítica (amarelo) torna-se acessível (D) ao substrato na interface óleo-água (Bergamasco, 2013).

Figura 4: Estrutura tridimensional da enzima lipase de *Rhizomucor miehei* em sua forma aberta (A e C) e fechada (B e D).

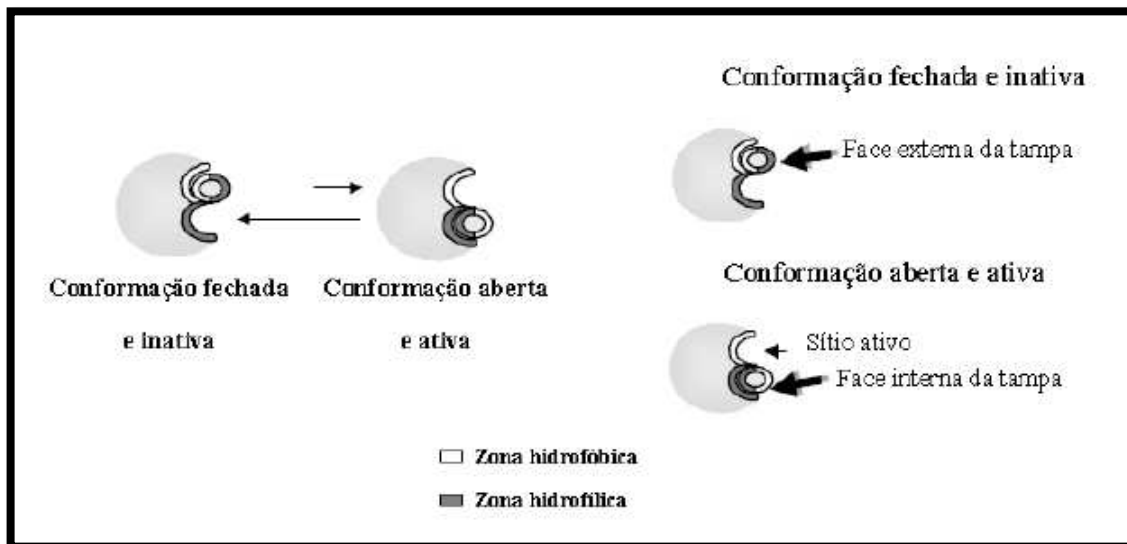


Fonte: Bergamasco, 2013.

Este aumento na atividade enzimática é provocado por rearranjos estruturais na região do sítio catalítico da enzima, permitindo que o substrato alcance a região catalítica. Na inexistência da interface óleo/água, o sítio catalítico é protegido do meio reacional por uma cadeia polipeptídica (sequência de proteínas), denominando genericamente como uma “tampa” hidrofóbica ou “lid”, apresentando mobilidade na presença da interface óleo-água. Na constituição interna do “lid” possui resíduos hidrofóbicos que interagem com as regiões hidrofóbicas em torno do sítio catalítico, ocorrendo quando a biomolécula está na forma inativa/fechada. Na presença de interfaces hidrofóbicas o “lid” se desloca, por meio de ligações de hidrogênio, ligações salinas, com uma região superficial da biomolécula, favorecendo a aproximação do substrato ao sítio catalítico, proporcionando a sua abertura, originando a conformação ativa da biomolécula, ocorrendo o fenômeno da ativação interfacial

(Rodrigues; Fernandez-Lafuente, 2010; Bergamasco, 2013). Evidencia-se tal fenômeno na figura 5.

Figura 5: Ativação interfacial de Lipase.



Fonte: Oliveira, 2012.

3.4. Imobilização Enzimática

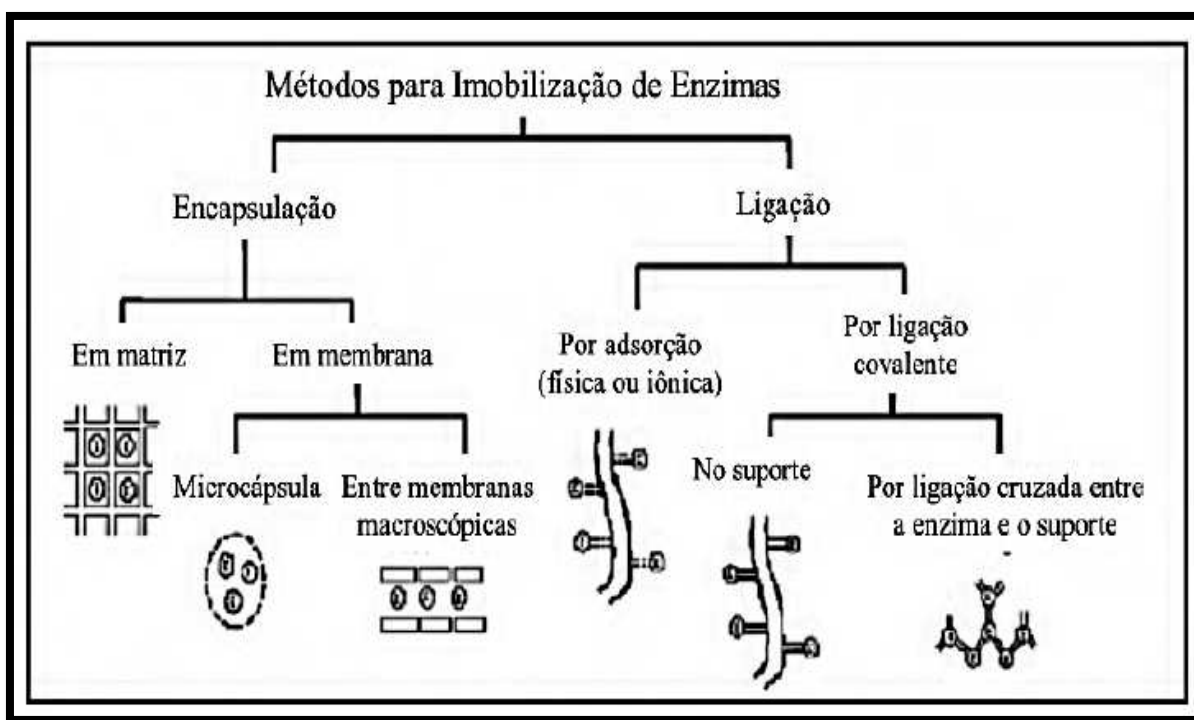
O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Assim, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo da enzima. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004).

De acordo com a técnica de Miranda (2004), a enzima fica retida no interior dos poros ou na superfície do material usado como suporte. O complexo enzima-suporte irá manter as características físicas do suporte, ao mesmo tempo em que retém a atividade biológica da enzima na forma solúvel. As vantagens obtidas pelo processo de imobilização são o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo sua reutilização sem perdas significativas da sua atividade catalítica. As principais desvantagens deste processo são a alteração da conformação nativa da enzima, perda de atividade durante o processo de imobilização, interação suporte enzima e a redução da atividade catalítica devido

aos efeitos difusionais, de microambiente e estéricos/conformacionais, ou seja, a possibilidade de reutilização ou uso contínuo, insolubilidade e estabilidade são características desejadas comercialmente, oferecidas por uma enzima quando esta se encontra imobilizada em suporte inerte adequado (Adriano, 2008).

De um modo geral, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação (Ferraz et al., 2015; Villeneuve; Muderhwa; haas, 2000). A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (figura 6) (Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004).

Figura 6: Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004.

A escolha do método de imobilização é feita pela avaliação de parâmetros como atividade enzimática global, efetividade de utilização de lipase, desativação e características de regeneração, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e as propriedades finais desejadas da enzima imobilizada ao suporte (Santos,

2015). Dentre os métodos de imobilização a adsorção é o método mais simples e prático para imobilizar enzimas, esta é imobilizada sobre um suporte sólido inerte por ligações fracas (Van der Waals, Interações Hidrofóbicas, Pontes de Hidrogênio, Ligações Iônicas). Na imobilização por adsorção física a enzima fica ligada na superfície do suporte insolúvel por uma interação não específica em meio aquoso, através das interações van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio. A imobilização por adsorção iônica, a enzima se liga ao suporte por atrações eletrostáticas envolvidas entre as cargas opostas presentes, tanto na superfície do suporte, quanto da enzima (Cardoso, 2009; Ferraz et al., 2015).

Esse método apresenta vantagens como uma menor perturbação da estrutura conformacional da enzima, facilidade e simplicidade no processo, baixo custo. A maior desvantagem é a dessorção da enzima devido as forças envolvidas no processo serem fracas, possuir baixa estabilidade frente às variações de pH, temperatura, presença do substrato e força iônica, e a adsorção não-específica de outras estruturas proteicas e substâncias como o substrato. Já na ligação covalente a interação se dá através de uma combinação química entre os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos da enzima que não são essenciais para a sua atividade e o material/suporte ativado. A imobilização por ligação cruzada não tem o envolvimento do suporte, assim as enzimas estão ligadas umas às outras, ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura tridimensional muito complexa. As vantagens que esse processo apresenta são grande força de ligação gerando uma alta estabilidade do complexo enzima-substrato, evita o fenômeno da dessorção, diminuição da velocidade de desativação (Adriano, 2008; Cardoso et al., 2009).

Na encapsulação baseia-se no confinamento da biomolécula no interior de uma matriz porosa, tendo como função a retenção física desta, podendo aprisionar ou encapsular a enzima, sendo constituído por um polímero geliforme e semipermeável. Dentre as vantagens observadas tem-se: a proteção da enzima do contato direto com o meio, minimização dos efeitos desnaturantes, não promove alterações estruturais da enzima. As desvantagens apresentadas são os problemas difusionais (apresentando maior probabilidade com os substratos de elevadas massas molecular), restrição do uso de substratos de alto peso molecular, alta concentração da enzima usada no processo visando à garantia do confinamento, possível inativação da enzima durante o processo, possíveis efeitos de inibição por produtos ou substrato no interior da matriz porosa, e a instabilidade do suporte limitando assim o uso prolongado (Santos, 2015).

Esta tecnologia enzimática além de proporcionar a produção de um biocatalisador ativo e estável, mostra-se como uma operação relativamente simples sem necessidade de uma

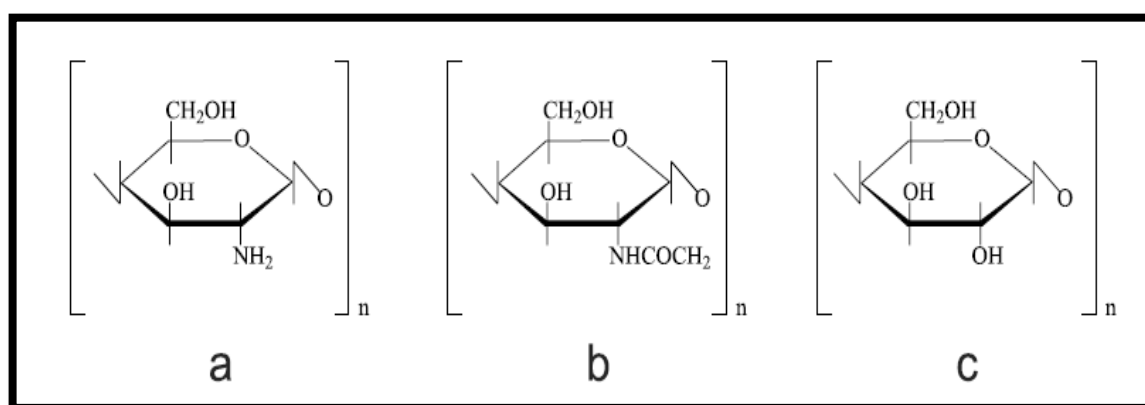
preparação de enzima de elevada pureza ou de um suporte que pode não estar disponível comercialmente.

Portanto, uma imobilização adequada pode ser um instrumento extremamente útil e poderoso para melhorar custo o desempenho da enzima. No entanto, deve-se considerar que todas as estratégias para estabilizar uma enzima (como a modificação química de proteínas) são compatíveis, e que elas não devem ser consideradas como competidoras (Santos, 2015).

3.5. Uso da Quitosana como Suporte para Imobilização de Enzimas

Entre os diferentes tipos de suportes orgânicos naturais utilizados na imobilização enzimática destaca-se a quitosana (Figura 7a). A quitosana é produzida por meio da hidrólise alcalina da quitina (Figura 7b) via processo termoquímico, promovendo a N-desacetilação, normalmente usa-se hidróxido de sódio (NaOH) (40-50% m/m) a 110-115 °C, ainda que essa desacetilação raramente seja total, sendo o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (Figura 7c). A quitosana apresenta uma estrutura quimicamente similar à celulose, diferindo-se apenas nos grupos funcionais. Outra propriedade importante da quitosana é a presença de diferentes grupos funcionais como os grupos hidroxila (OH) e amino (R-NH₂), compondo a estrutura geral desse biopolímero, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (R-NH₂) na estrutura da quitosana (Adriano, 2008; Vieira, 2009).

Figura 7: Estrutura dos biopolímeros (a) quitosana (b) quitina (c) celulose.



Fonte: Mendes, Oliveira; Castro, 2011.

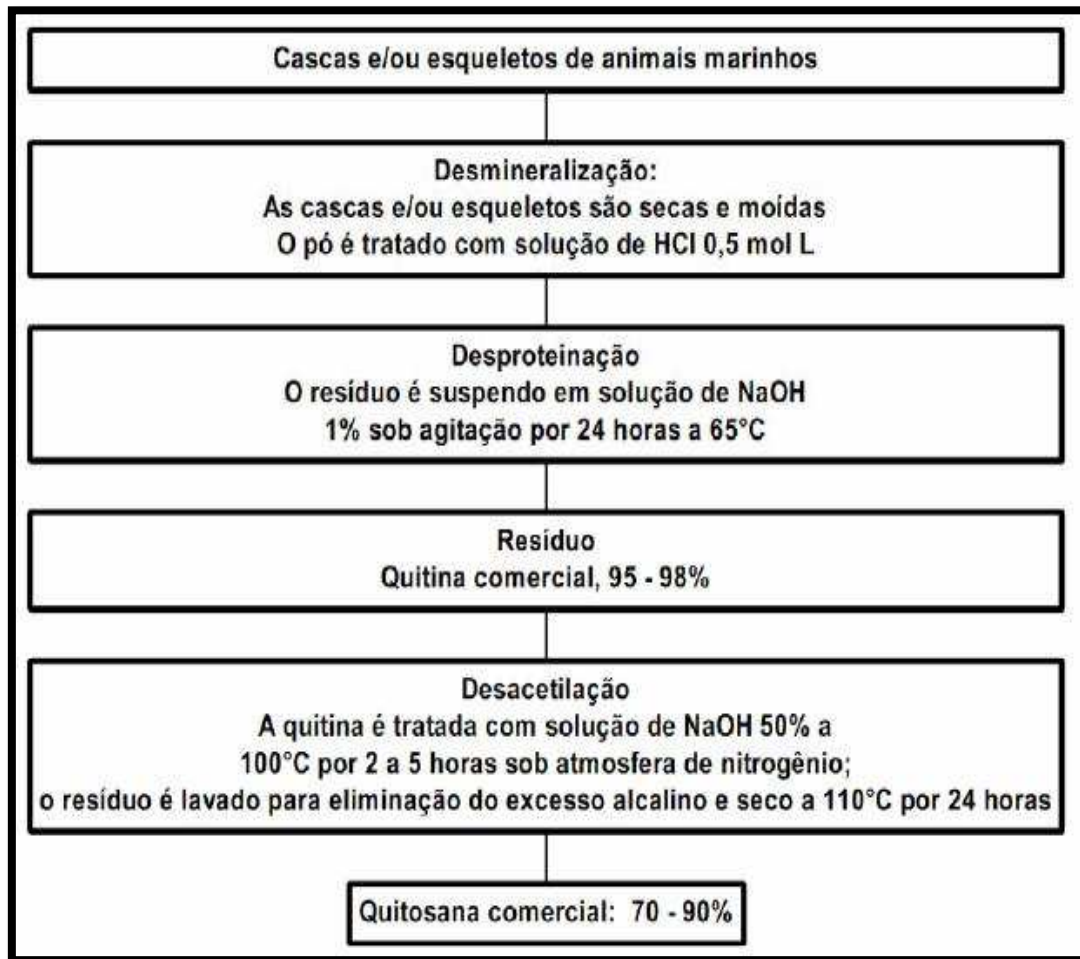
A quitina é facilmente encontrada em fontes naturais como carapaças de crustáceos, camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos,

sendo consideradas como rejeito pela indústria pesqueira, que em muitos casos, as consideram poluentes. Com a sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (Mendes, Oliveira; Castro, 2011).

Os principais fatores que afetam o grau de desacetilação e, conseqüentemente, as características da quitosana obtida são temperatura e tempo de reação, concentração da solução do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das partículas da quitina e presença de agentes que evitam a despolimerização. Para produzir 1 kg de quitosana 70% desacetilada a partir de carapaças de caranguejo, são necessários 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH, 0,5 t de água para o processo e 0,9 t de água de resfriamento. Diferentes configurações de quitosana podem ser obtidas no processo de desacetilação da quitina e estas configurações podem ser empregadas no processo de imobilização de enzimas. Entretanto, as formas de hidrogéis e membranas são as mais empregadas devido às alterações físicas obtidas, como o aumento do diâmetro de poros do suporte, ideal para o processo de imobilização de enzimas (Mendes, Oliveira; Castro, 2011).

A extração da quitina a partir de cascas e exoesqueletos de animais marinhos vem sendo apresentados em vários trabalhos na literatura. O uso da quitosana como suporte para imobilização de enzimas se deve às suas diferentes fontes como pó, escamas, hidrogéis, membranas, fibras, apresentando também diferentes grupos funcionais como hidroxilas e amino, permitindo a utilização de diferentes métodos de imobilização. É solúvel em ácidos orgânicos diluídos (fórmico, acético, oxálico, malônico, succínico, adípico, láctico, pirúvico, málico, tartárico e cítrico) e também em ácido clorídrico e nítrico a 1% (m/m) e soluções concentradas de ácido fosfórico e sulfúrico (Kumar et al., 2000). Evidencia-se na figura 8 um procedimento comercial de extração de quitina e quitosana.

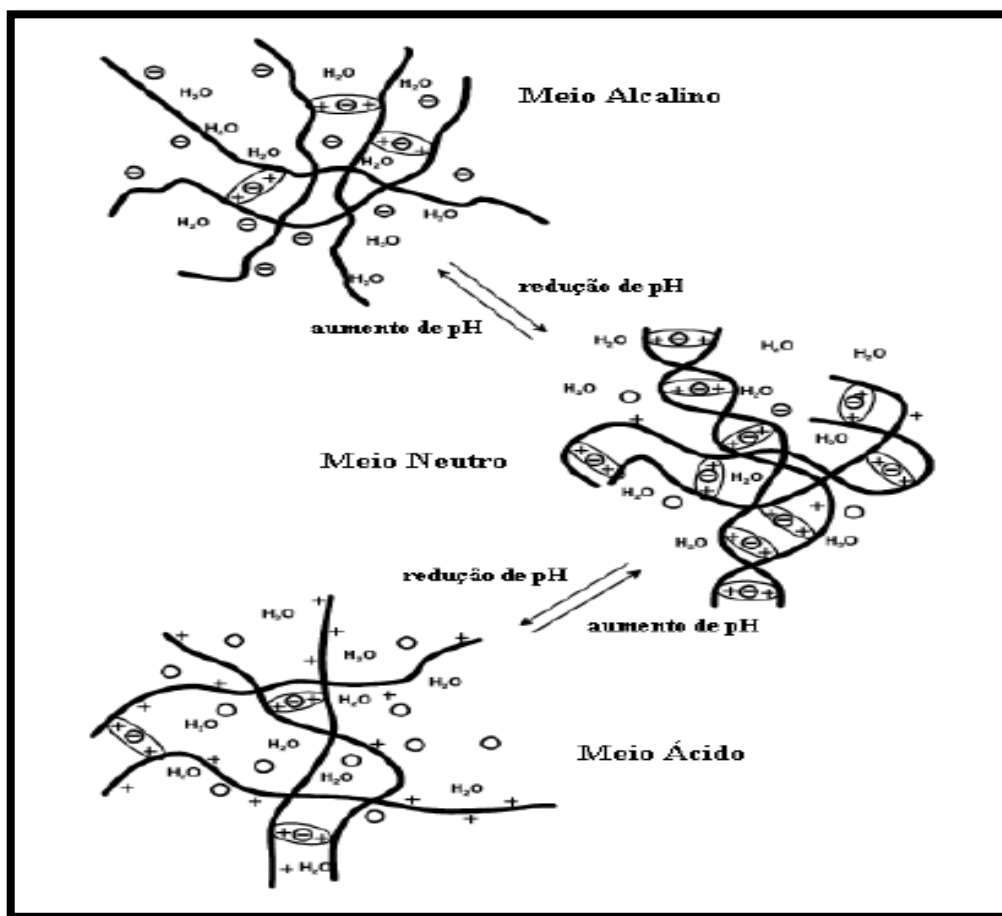
Figura 8: Diagrama da produção comercial de quitina e quitosana.



Fonte: Adriano, 2008.

A estrutura da quitosana é mantida por interações iônicas, como também as ligações covalentes, sendo as ligações iônicas influenciadas pelo pH do meio reacional, refletindo na capacidade de retenção de água no hidrogel (Berger et al., 2004). Se o pH do meio decresce (meio ácido), ocorre a protonação dos grupos amino da quitosana, resultando na repulsão eletrostática e enfraquecimento da resistência mecânica do hidrogel, por causa do aumento de água no hidrogel. Com a elevação do pH (meio básico), a protonação da quitosana diminui, e isso reduz o grau de inchamento dos hidrogéis. Em pH próximo da neutralidade, há equilíbrio entre as cargas do hidrogel, o que promove máxima interação entre os grupos ionizáveis, proporcionando maior estabilidade ao gel (Veríssimo, 2012). Tais comportamentos podem ser observados na figura 9.

Figura 9: Influência do pH sobre a estrutura da quitosana.



Fonte: Berger, 2004; Vieira, 2009.

A quitosana tem inúmeras aplicações devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade de produtos inofensivos, não toxicidade, inércia fisiológica. Na área ambiental, a quitosana é conhecida como um bioadsorvente para remoção de íons metálicos tóxicos, corantes e compostos orgânicos utilizados nos processos de tratamento de água e bebidas. Devido às suas propriedades antimicrobianas são usados para reduzir o crescimento microbiano, e como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes processados. Atuam também como floculante e coagulante nos processos de tratamento de efluentes industriais e ainda podem remover o petróleo de derramamentos no mar, contribuindo na solução de um dos grandes problemas ambientais (Carrara; Rubiolo, 1994).

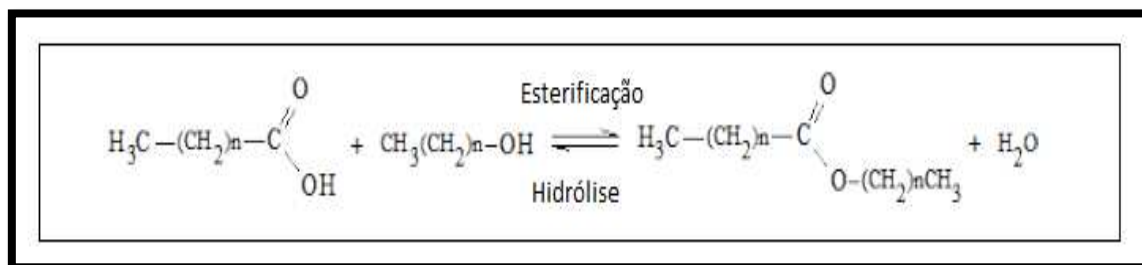
Na área da saúde, a quitosana é conhecida como um redutor de níveis de colesterol no sangue. Possuindo uma capacidade de diminuir o colesterol LDL, mantendo o colesterol HDL. É conhecido também como um antiácido, para o controle de pressão alta, para prisão de ventre e redução do ácido úrico no sangue. A quitosana tem sido vastamente empregada como controlador de liberação de drogas e coadjuvante no controle de doenças como a artrose

(Berger et al., 2004; Kumar et al., 2000; Vieira, 2009). Como cosméticos, devido à sua natureza fungicida, é utilizada na formulação de cremes para o rosto, mãos e corpo, loções de banho e fabricação de xampus (Krajewska, 2004). A quitosana também tem sido utilizada como um suporte na imobilização de enzimas (Adriano et al., 2008). Portanto, a quitosana apresenta-se como um suporte promissor devido a sua multiplicidade de aplicações, tanto os estudos quanto o uso apresentaram crescimento nos últimos anos, pois este biopolímero renovável é de grande potencial para o mercado de biomateriais. O baixo custo e a abundância deste material o tornam interessante para o setor industrial.

3.6. Esterificação 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 subproduto. Como apresentado na figura 10, 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 10: Representação da reação reversível de esterificação.



Fonte: Adaptado de Bastos, 2013.

Como alternativa a rota química convencional, processos de conversão enzimática tem sido bem explorados para sintetizar ésteres de ácidos graxos a partir de óleos (Watanabe et al., 2007). 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; Nie; Wang, 2006), bem como o elevado tempo reacional. Para superar esses inconvenientes, a conversão pode ser realizada em duas etapas: hidrólise do óleo seguida de esterificação 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, o rendimento de ácidos graxos livres no final da hidrólise seria reduzido (Akoh et al., 2007). A velocidade de formação do éster depende do ácido orgânico e álcool utilizado. Além disso, os efeitos do ácido orgânico e o comprimento da cadeia do substrato são significativos em reações de esterificação catalisadas por lipases. A temperatura e o pH também são fatores que geralmente afetam a esterificação. Cada enzima possui seu valor ótimo de atuação. Qualquer fator, que afeta a ligação do substrato, influencia a taxa de esterificação (Carneiro, 2013).

3.6.1. Influência da Água na Reação de Esterificação

A água gerada durante a reação de esterificação é considerada o mais importante parâmetro que precisa ser controlado. Mesmo sob condições de baixa concentração de água, durante o curso da reação, um mol de água é formado para cada mol de éster sintetizado. Como solventes hidrofílicos são geralmente evitados para prevenir a inativação da enzima, a formação desta fase aquosa pode ocorrer facilmente durante a reação. Dessa forma, a remoção de água por diversas metodologias pode prevenir este fenômeno e ajudar na direção da reação para sua conclusão com altas conversões. 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; Muderhwa; Haas, 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.

3.6.2. Influência do álcool na reação de esterificação

Meng et al. (2011) citaram que o etanol é essencial para a reação de esterificação, mas que, em grande quantidade, desnatura proteínas, incluindo as enzimas. Devido a 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

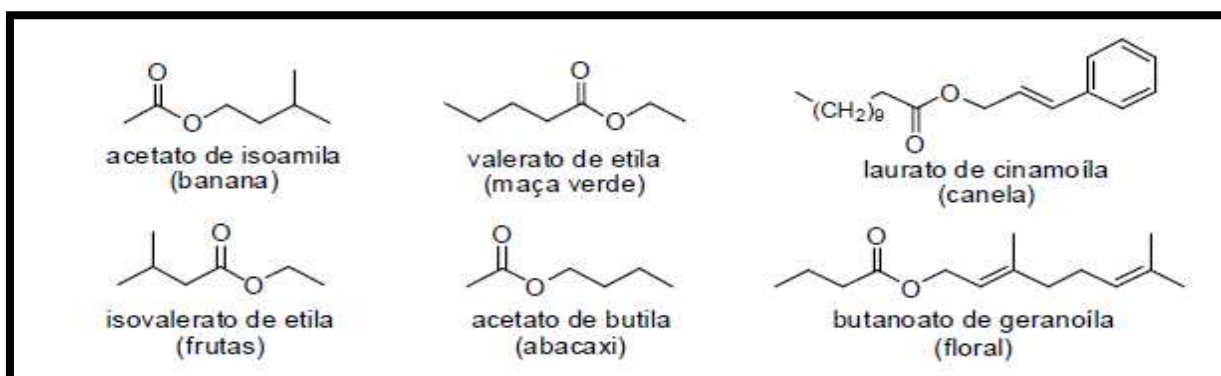
volume de etanol em uma reação teste. Com a adição desse substrato em mais de uma etapa, houve aumento considerável no grau de esterificação, com valor de aproximadamente 82%. O processo de esterificação ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molecular, sendo mais utilizado o metanol, devido ao seu baixo custo, e o etanol por não ser tóxico e ser ecologicamente mais viável que o metanol que é o derivado do petróleo (Carneiro, 2013). 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).

3.7. Ésteres na Indústria Farmacêutica

Os ésteres são substâncias orgânicas frequentemente encontradas na natureza, e utilizadas como importantes intermediários em síntese orgânica. Tais substâncias desempenham um papel importante na indústria farmacêutica, de perfumes, de polímeros, de cosméticos e estão presentes na composição de produtos alimentícios para realçar e imitar sabores e aromas (Costa et al., 2004). Destacam-se também como emulsificantes e flavorizantes sendo responsável pelo sabor e aroma usados em medicamentos que apresentam as seguintes formas farmacêuticas: como em xaropes, soluções e suspensões (Menegatti; Fraga; Barreiro, 2001). Estes conferem aos alimentos e medicamentos aromas e sabores característicos. Normalmente, são usados como aditivos para realçar o aroma de uma bebida ou de um alimento. Na maior parte das vezes, o aroma encontrado em alimentos industrializados é devido a essas substâncias sintéticas. O acetato de benzila, por exemplo, é um dos componentes de medicamentos com sabor artificial de cereja, abricó e morango. O acetato de pentila é o éster que confere o aroma e o sabor de pêra a gomas de mascar (Balbani; Stelzer; Montovani, 2006). Na indústria de medicamentos, os ésteres estão presentes tanto no revestimento de cápsulas quanto na composição química do princípio ativo. O ácido acetilsalicílico (AAS) é um antiinflamatório não esteroideal com propriedades analgésicas e antipiréticas de maior comercialização e popularidade em todo o mundo. Sua síntese envolve a reação de esterificação do ácido salicílico com anidrido acético, sob

aquecimento (Menegatti; Fraga; Barreiro, 2001). Ésteres de aroma derivados do álcool cinâmico constituem uma classe que possui uma vasta aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos por possuírem essência de perfumes e flavorizantes. Estes produtos podem ser obtidos por métodos químicos que utilizam catalisadores mais agressivos. Porém, metodologias mais recentes apresentadas nas últimas duas décadas mostram que a reação de esterificação via enzimática utilizando principalmente lipases que podem ser usadas em solventes orgânicos, mostra-se cada vez mais promissora na síntese de ésteres de aroma (Bastos, 2013). A figura 11 mostra alguns exemplos de ésteres de aroma que vem sendo obtidos *via* catálise enzimática, com lipases.

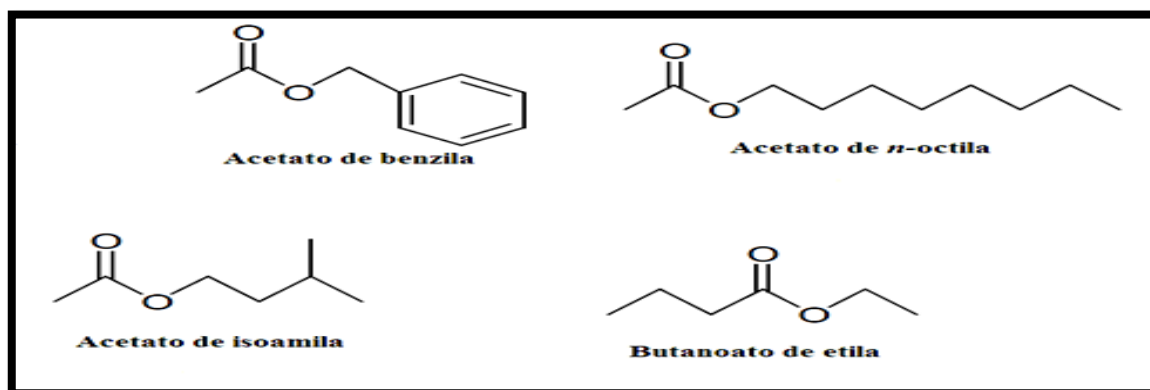
Figura 11: Ésteres usados como flavorizantes e produzidos a partir de lipases por reação de esterificação.



Fonte: Bastos, 2013.

Griz (2010) sintetizou ésteres usados como flavorizantes por meio de lipases de *Burkholderia cepacia* (LBC), *Pseudomonas fluorescens* e *Aspergillus niger* imobilizadas, como os acetatos de benzila (pêssego), de *n*-octila (laranja), de *isoamila* (banana) e o butanoato de etila (morango). Como evidenciado na figura 12.

Figura 12: Exemplos de ésteres de aroma usados como flavorizantes obtidos por catálise enzimática.



Fonte: Griz, 2010.

Bezbradica et al., (2007) utilizaram as lipases pancreática do porco e de *Rhizomucor miehei* na reação de obtenção de diversos ésteres de aroma, entre eles o butanoato de geranoíla (figura 11) e octanoato de heptila. No estudo de Dandavate; Keharia; Madamwar (2009) observou-se a preparação do *iso*-valerato de etila usando como catalisador a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em nanopartículas de sílica.

3.8. Óleo de Pequi

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense sp.*) pode ser classificada como frutífera ou oleaginosa, em razão das suas características e formas de utilização. Possui um enquadramento taxonômico: Divisão *Magnoliophyta*, Classe *Magnoliopsida (Dicotyledonae)*, Ordem *Theales (Guttiferales)*, Família *Caryocaraceae*, Gênero *Caryocar* (Cronquist, 1988; Silva et al., 2001).

A principal utilização do fruto é no consumo direto do caroço em forma de pequizada, em cozidos de carne de gado e de frango, no feijão, no arroz, e no conhecido baião de dois (feijão com arroz). Como oleaginosa, da polpa do fruto é extraído um óleo que tem diversas utilidades, além de seu emprego na culinária, o foco central de uso desse produto. É utilizado na indústria de cosméticos (cremes), de limpeza (sabões), e na indústria de fármacos (Oliveira et al., 2008), mesmo sem a existência de informações advindas de pesquisas. Porém, como a polpa tem, em média, cerca de 200.000 UI de vitamina A (Peixoto, 1973), pelo menos no suprimento dessa vitamina é garantido algum efeito benéfico à saúde humana. Na tabela 1 é apresentada a composição em ácidos graxos da polpa do fruto do pequi.

Tabela 1: Óleo da polpa de pequi: composição em ácidos graxos.

| ÁCIDO GRAXO | TEOR EM (%) |
|------------------------------------|--------------------|
| Ácido Palmítico (C 16:0) | 34,4 – 40,2 |
| Ácido Palmitoléico (C 16:1) | 1,4 – 2,1 |
| Ácido Esteárico (C 18:0) | 1,8 – 2,3 |
| Ácido Oléico (C 18:1) | 53,9 – 57,4 |
| Ácido Linoléico (C 18:2) | 1,5 – 2,8 |
| Ácido Linolênico (C 18:3) | 0,7 – 1,0 |
| Ácido Araquídico (C 20:0) | 0,2 |

Fonte: Brasil, 1985; Facioli; Gonçalves, 1998.

Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) identificaram carotenoides no pequi *Caryocar brasiliense camb.* Estes metabólitos conferem proteção à pele impedindo a lipoperoxidação, evitando desta maneira a formação de radicais livres com conseqüentemente retardo envelhecimento cutâneo. Também foram demonstradas as atividades leishmanicida, antimicrobiana do extrato das folhas de pequi (Paula-Junior et al., 2006).

Portanto, é de grande importância o estudo da utilização do óleo de pequi, vislumbrando a aplicabilidade na área cosmética e farmacêutica visando o aproveitamento de recursos naturais com desenvolvimento sustentável e conseqüentemente desenvolvimento regional e contribuição social (Pianovski et al., 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico são apresentados os materiais e a descrição dos procedimentos realizados durante o desenvolvimento deste trabalho. Os experimentos foram realizados no Laboratório de pesquisa de processos enzimáticos (J10) na Unidade Acadêmica de Saúde (UAS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.1. Materiais

4.1.1. Enzima

Para a imobilização foi utilizada a lipase (E.C 3.1.1.3) de *Rhizomucor miehei*, Palatase® 20,000L da Sigma Aldrich com atividade específica de 450 U/ml de extrato.

4.1.2. Suporte

A quitosana utilizada para a pesquisa se apresentou na forma de pó, sendo adquirida junto a POLYMAR IND. LTDA, Fortaleza, Ceará, que possui grau de desacetilação de aproximadamente 85%.

4.1.3. Substratos

Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense sp.*) obtido na feira pública de Campina Grande - PB sem nenhum tratamento prévio para obtenção de ácidos graxos livres, etanol comercial 93,1° INPM e o butirato de p-nitrofenila (pNPB) para medição da atividade enzimática.

4.1.4. Agente adsorvente

Amido peletizado, da marca YOKI®, tendo como nome comercial sagu.

4.1.5. Reagentes utilizados no tratamento do suporte, obtenção de ácidos graxos livres e esterificação

Hidróxido de potássio (KOH) 0,01 M; fenolftaleína 1% m/v; solução alcoólica de KOH 10% m/v; PA; ácido acético glacial 5% v/v; dodecil sulfato de sódio (SDS); hexano PA; fosfato de sódio monobásico PA e fosfato de potássio dibásico PA; isopropanol PA; solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 25% v/v; solução hidróxido de sódio (NaOH) 0,0624 M.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do suporte a base de quitosana

Para o preparo do suporte, foi utilizada metodologia adaptada de Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi (2004) e Cavalcante (2014). A solução de quitosana foi preparada a partir de uma dissolução do ácido acético glacial 5% v/v. Neste processo foi feito um ajuste de pH igual a 5,0. Após, sob agitação, verteu-se 4 gramas de quitosana em pó nessa solução de ácido acético glacial formando uma solução final de quitosana 5% m/v com ausência de grumos no meio. Com isso, foi solubilizado 0,04g de dodecilsulfato de sódio (SDS) que é o surfactante em 1mL de hexano, sendo homogeneizado posteriormente nas 4g de solução de quitosana, dessa forma obteve-se o organogel. Evidencia-se tal preparação na figura 13.

Figura 13: Síntese do organogel a base de solução de quitosana 5% m/v.



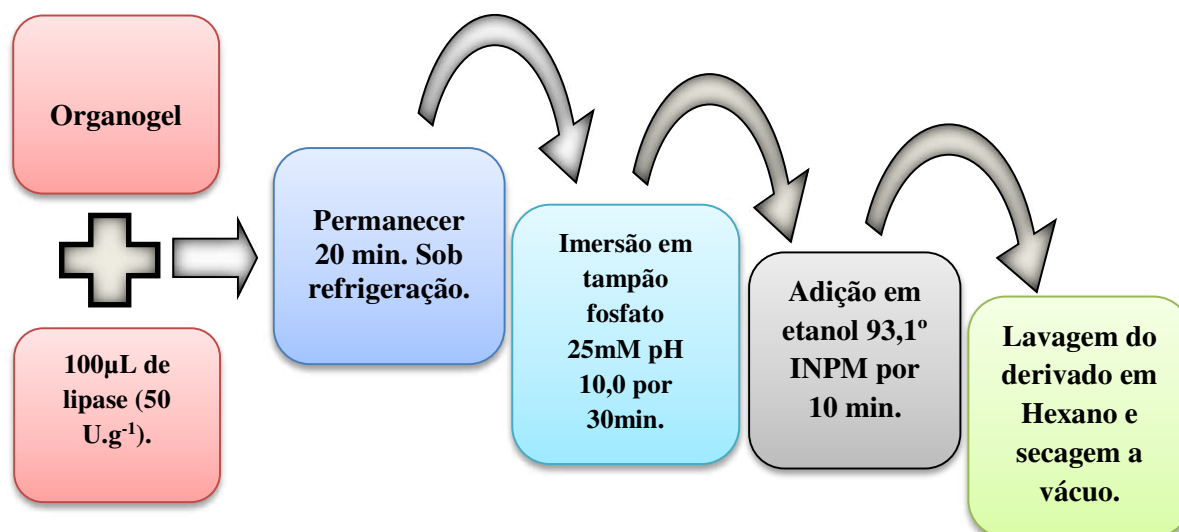
Fonte: Adaptado de Cruz, 2015.

4.2.2. Imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em organogel.

Para a imobilização usou Método descrito por Cavalcante (2014). Foi adicionado 50 U.g⁻¹ por grama de suporte que equivale a 100µL da enzima adicionado ao gel formado, onde foi homogeneizado cuidadosamente para não ocorrer a desnaturação da enzima. Em seguida, o suporte (organogel) com a enzima imobilizada passou por sucessivas etapas, para que adquirisse estabilidade, favorecendo a imobilização da enzima.

Na figura 14 visualizamos as etapas de imobilização da lipase no organogel a base de quitosana. Inicialmente, o gel foi levado à geladeira onde permaneceu por um período de 20 minutos sob refrigeração, após passar o tempo necessário, o derivado (enzima + suporte) foi imerso em tampão fosfato 25mM pH 10,0 por 30 minutos, ou seja, esse tempo é necessário para que ocorresse a neutralização do pH e conseqüente coagulação da quitosana, onde esse suporte começará a tomar forma do tipo matriz polimérica, característica essa atribuída ao tipo de imobilização sendo denominada encapsulação em matriz polimérica. Posteriormente, o gel foi adicionado em álcool etílico 93,1° INPM onde permaneceu por 10 minutos, para que o organogel adquirisse uma maior consistência. Em seguida, o derivado foi lavado com 3mL de hexano (o solvente orgânico) e filtrado em bomba à vácuo para retirar o excesso do solvente presente no suporte. Feito isso, o derivado estava pronto para aferição da atividade da enzima no organogel, bem como para o uso nos ensaios de esterificação.

Figura 14: Etapas da imobilização de lipase em organogel.



Fonte: Adaptado de Cruz, 2015.

4.2.3. Determinação da Atividade da Lipase e Autodegradação do Substrato

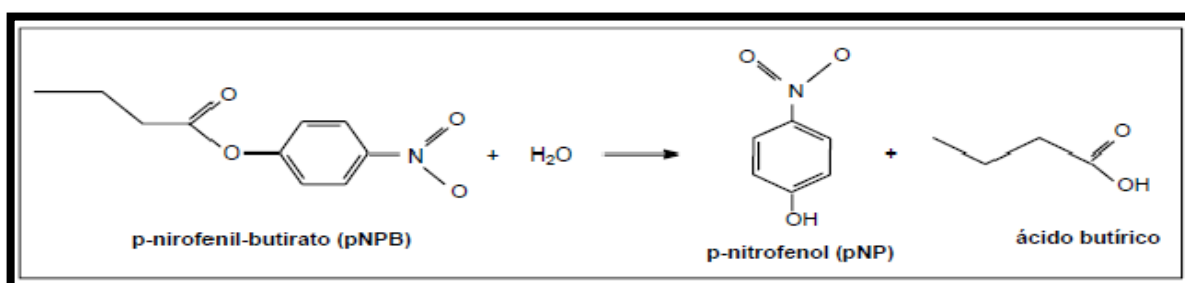
Para aferição da atividade catalítica da enzima lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada, foi utilizado o substrato butirato de p-nitrofenila (pNPB) através da sua degradação, sendo avaliada em espectrofotômetro (UV-Vis) no comprimento de onda 400 nanômetros ($\lambda = 400\text{nm}$). Para que fosse possível realizar a aferição da atividade enzimática, fez-se necessário ocorrer a preparação do meio reacional, onde nesse local a enzima poderia atuar tranquilamente.

Para a preparação do meio reacional foi utilizado três soluções:

- **Solução A:** 26 μL do substrato que é o pNPB diluído em 10ml de álcool isopropílico,
- **Solução B:** tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0
- **Solução C:** 29 ml solução B com 1 ml solução A

Dessa forma, o reator com 30mL de meio reacional estava pronto, onde foi realizada a atividade enzimática a uma temperatura de 25°C em triplicata fornecendo uma maior confiabilidade ao processo de aferição da atividade da enzima imobilizada. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro UV-Vis ($\lambda = 400\text{nm}$), durante 10 minutos sob agitação, sendo medidas as absorbâncias a cada 2 minutos em alíquotas de 2ml, a fim de determinar a hidrólise do pNPB pela lipase, originando produtos de reação como p-nitrofenol (pNP) e o ácido butírico, podendo-se observar essa reação na figura 15. Assim, a atividade enzimática foi definida como a quantidade de lipase que hidrolisou 1 μmol de pNPB por minuto nas condições descritas em unidades de enzima por ml de solução enzimática (U/ml) ou unidade de enzima por grama de suporte (U/g) (enzima) (Oliveira, 2012; Carneiro, 2013; Cavalcante, 2014).

Figura 15: Reação de hidrólise do p-nitrofenil butirato (pNPB).

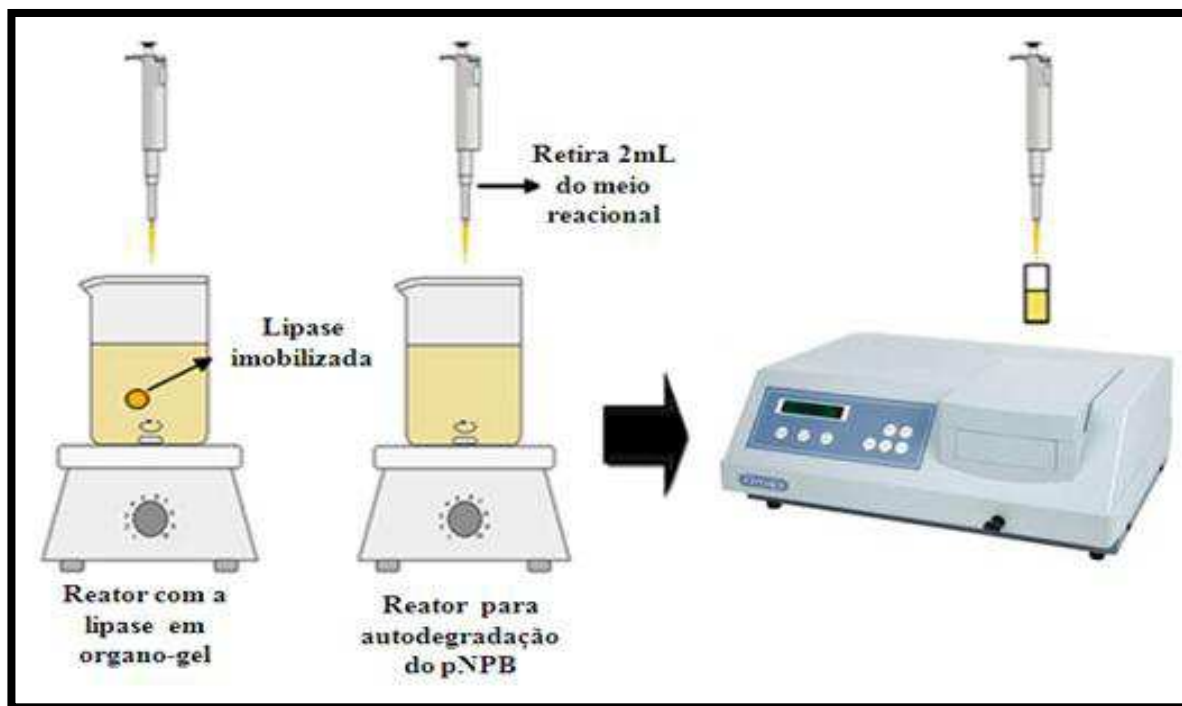


Fonte: Oliveira, 2012.

Foi realizado o branco da reação que se baseia na capacidade de Autodegradação do substrato com ausência de enzima no meio reacional, a fim de ser possível identificar qual a quantidade de substrato que realmente eram hidrolisadas pela lipase ocorrendo nas mesmas

condições de reação para determinação da atividade da enzima imobilizada. Na figura 16 pode ser observado todo o processo de determinação da atividade para a enzima imobilizada em suporte a base de quitosana, bem como a autodegradação do substrato.

Figura 16: Determinação da atividade da lipase livre e /ou imobilizada e Autodegradação do pNPB.



Fonte: Adaptado de Cruz, 2015.

Portanto, quatro gráficos lineares foram plotados, três com os dados obtidos no reator com a lipase imobilizada e o outro com a absorvância do branco. Com as equações das retas obtidas, foram identificados os valores da tangente para o reator com derivado e para o branco (autodegradação do substrato) (Oliveira, 2012; Carneiro, 2013; Cavalcante, 2014). Com os valores obtidos, foi calculado a atividade da enzima imobilizada por meio da equação 1, sendo em seguida realizada uma média das atividades.

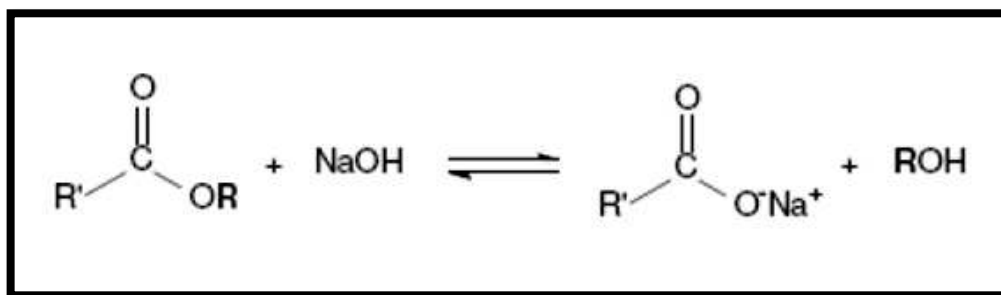
$$At = \frac{(\alpha - \alpha_{branco}) \times 0,0922 \times V_{reator}}{V_{enzima} \text{ (mL) ou } m_{derivado} \text{ (g)}} \quad (1)$$

Onde: At é a atividade enzimática (U/ml ou U/g), α é a tangente da amostra, α é a tangente do branco. $0,0922$ é o fator da curva de calibração, V_{reator} é o volume do reator (ml), V_{enzima} é o volume de enzima solúvel (ml) e $m_{derivado}$ é a massa de derivado (g).

4.2.4. Produção de ácidos graxos livres a partir do óleo de pequi

Esses ensaios foram realizados segundo a metodologia adaptada de Carneiro (2013). Assim, a produção ocorreu em duas etapas, uma etapa ocorrendo uma catálise alcalina e outra ocorrendo uma catálise ácida. Na primeira etapa foi necessário realizar a hidrólise do óleo, onde preparou-se 200ml de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% m/v, tendo o álcool etílico 93,1° INPM como solvente. Dessa forma, essa solução foi levada juntamente com 30g de óleo de pequi in natura para o banho ultrassônico com frequência de 40 KHz e potência de 160 W em um balão de fundo redondo permanecendo por 45 minutos, ocorrendo uma reação de saponificação (Figura 17) para obtenção de sais de ácidos graxos.

Figura 17: Reação de Saponificação.

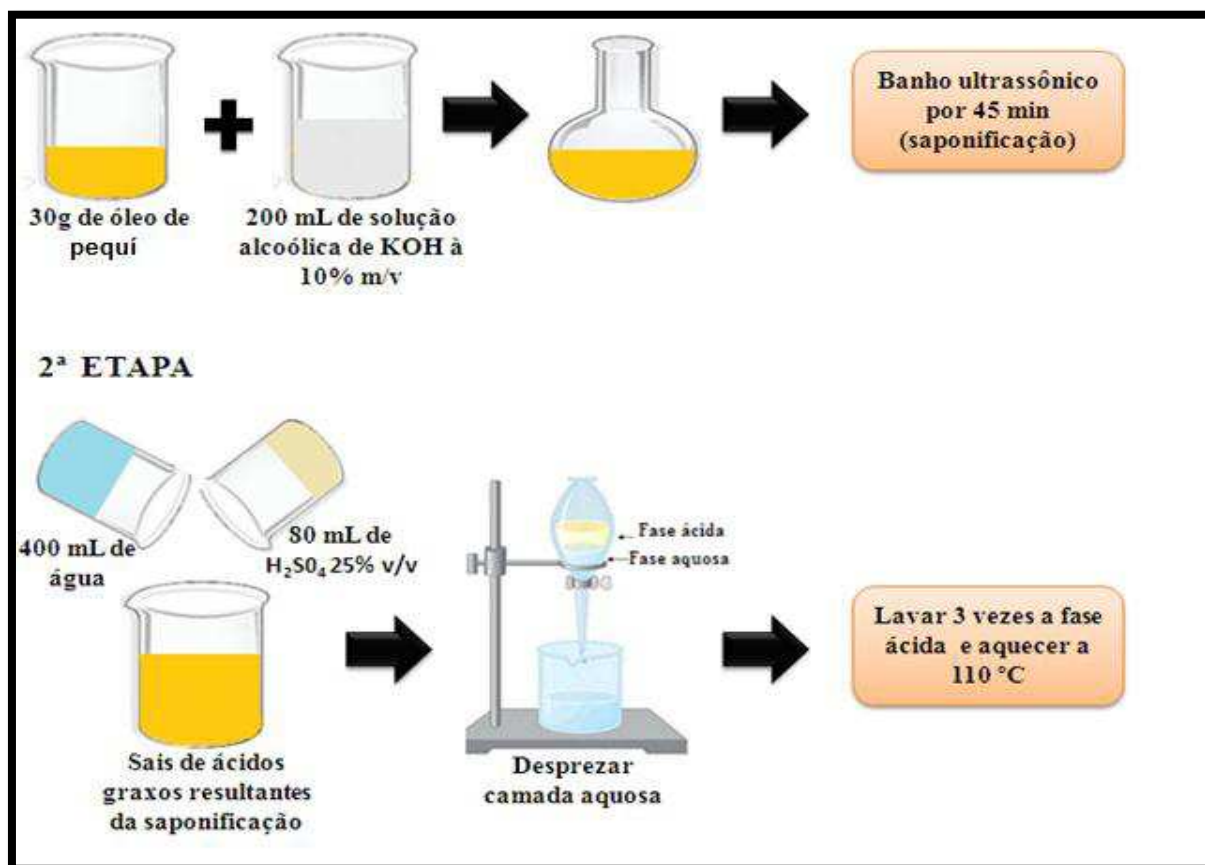


Fonte: Lima, 2009.

A segunda etapa consiste numa catálise ácida, para que ocorra total conversão do sal obtido em ácido graxo livre. Nessa etapa, ocorreu a separação dos ácidos graxos do glicerol obtidos na reação de saponificação, para isso, primeiramente, foram adicionados 400ml de água destilada a uma temperatura de 40°C em um béquer contendo previamente os sais de ácidos graxos e glicerol obtidos na reação de saponificação, homogeneizando cuidadosamente para não ocorrer formação de espuma e não interferir na separação dos ácidos graxos. Quando ocorreu total dissolução do sabão na água destilada, verteram-se 80ml de uma solução de ácido sulfúrico 25% v/v na reação para que ocorra hidrólise ácida. Após, deixou decantar por 60 minutos, até separar as duas fases (ácida e aquosa), em seguida foi levado para um funil de separação para que fosse obtido apenas a fase ácida sobrenadante, essa fase foi lavada três vezes com água destilada à 40°C para retirar o excesso de ácido sulfúrico, sendo em seguida levado para secagem em estufa a uma temperatura de aproximadamente 110°C por 60 minutos, até que ocorresse a evaporação da água presente na reação com os ácidos graxos

obtidos, retirando a umidade do meio (Cruz, 2015). Na figura 18 são evidenciados a 1ª e 2ª etapa do procedimento de obtenção dos ácidos graxos livres.

Figura 18: Processamento de obtenção de ácidos graxos livres a partir do óleo de pequi.



Fonte: Cruz, 2015.

4.2.5. Ensaios de esterificação utilizando ácidos graxos com a lipase imobilizada

Os procedimentos foram realizados segundo metodologia adaptada de Sousa (2013) e Cruz (2015). O ensaio de esterificação foi realizado em diferentes proporções molares, utilizando uma quantidade de 5g de ácido graxo livre juntamente com várias quantidades de álcool etílico 93,1° INPM nas seguintes razões molares ácido/álcool 1:1; 1:5; 1:10; 1:15 e 1:20 respectivamente. Esses testes foram realizados em duplicata e com esses valores obtidos calculava-se a média e o desvio padrão para cada ensaio. Os mesmos ensaios foram realizados utilizando 4g de amido (sagu) em meio reacional, objetivando adsorver a água formada na reação de esterificação e obter maior conversão de ácidos graxos em ésteres, observando

também a variação da porcentagem de ésteres formados com o uso desse agente adsorvente. As quantidades a serem usadas de ácido graxo e etanol nos ensaios foram calculadas a partir de cada razão molar a ser trabalhada e estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Razões molares, e suas equivalentes concentrações de ácido e etanol.

| Razão molar ácido/etanol | Massa ácido graxo | Volume de Etanol |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 1:1 | 5g | 1,03mL |
| 1:5 | 5g | 4,13mL |
| 1:10 | 5g | 9,30mL |
| 1:15 | 5g | 14,47mL |
| 1:20 | 5g | 19,64mL |

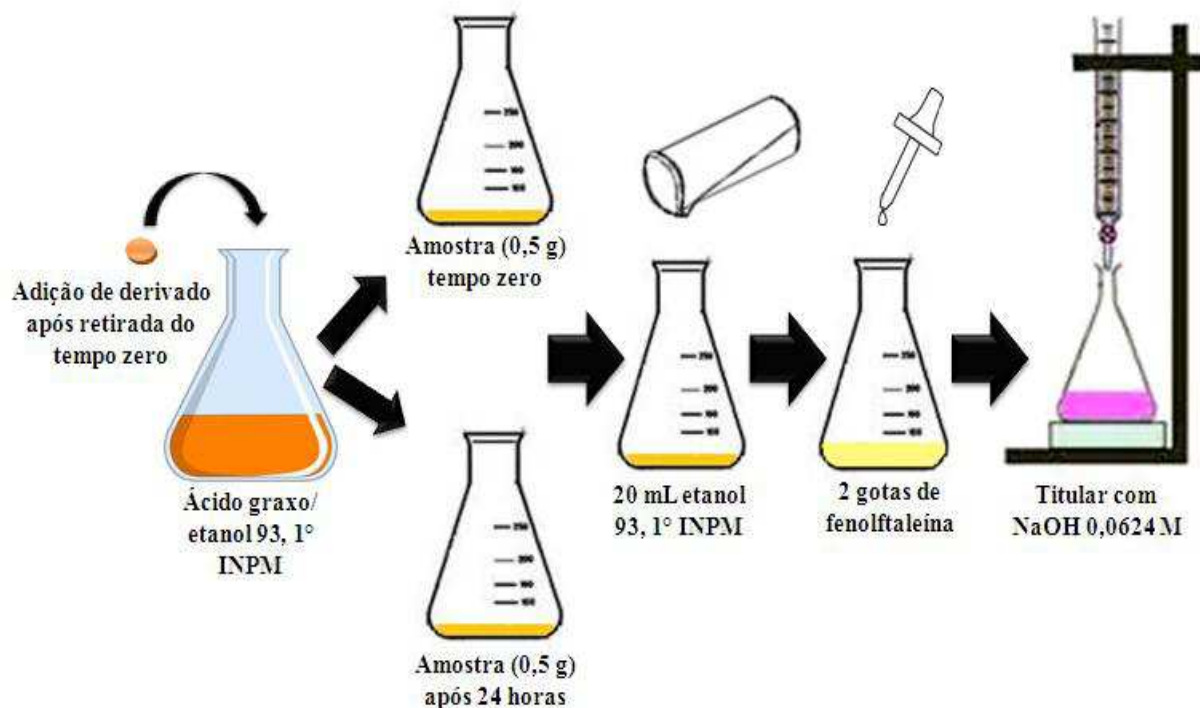
Fonte: Adaptado de Pereira, 2015.

Sabendo a razão utilizada para cada ensaio, como também as respectivas quantidades de ácido graxo e etanol que equivale a cada razão molar, foi adicionada a um erlenmeyer de tamanho adequado a quantidade necessária de ácido/etanol. Retirou-se a amostra referente ao tempo zero, que foi de aproximadamente 0,5g, para posteriormente ser titulada, visando quantificar o nível de acidez nesse meio reacional. Após ser retirado o tempo zero, adicionou-se ao meio 0,5g (0,56 U/g) de derivado, mantendo esse sistema sob agitação rotacional de 150 rpm em agitador de Kline na estufa a uma temperatura de 37°C por 24 horas. Decorrido esse tempo, retirou-se uma alíquota em torno de 0,5g do meio, onde essa consistiu na amostra após o transcorrer do tempo de 24 horas de reação.

Esses ensaios foram realizados novamente, adicionando 4g de amido ao meio reacional, por ser higroscópico, promove a adsorção da água produzida na reação de esterificação, favorecendo o aumento da conversão de ácidos em ésteres. Contudo, esse reagente foi adicionado após a retirada da amostra do tempo zero, e antes de ter colocado a enzima imobilizada (derivado) no meio.

Dessa forma, as amostras foram tituladas com hidróxido de sódio (NaOH) 0,0624 M para verificar o nível de acidez existente após a reação, e junto dessa adicionaram-se 20ml de álcool e 2 gotas de fenolftaleína como indicador (figura 19). Com os resultados obtidos das titulações, foi descontada a acidez proveniente do álcool, e a partir daí calculou-se o índice de acidez, a porcentagem de ácidos graxos livres para as amostras no tempo zero e 24 horas, e o cálculo de conversão em ésteres. Portanto, quanto maior a acidez inicial e menor a acidez final, maior será quantidade de ésteres formados.

Figura 19: Fluxograma referente ao ensaio de obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do óleo de pequí.



Fonte: Cruz, 2015.

4.2.6. Índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres

O índice de acidez revela o estado de conservação do óleo e corresponde ao número de miligramas de hidróxido de potássio (KOH) necessários para neutralizar os ácidos graxos livres (AGL) de um grama de gordura (em mg KOH/g). A porcentagem de ácidos graxos livres é um método para determinação de AGL existentes em uma amostra. As metodologias para determinação do índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres são sugeridas pela American Oil Chemists Society (A.O.C.S.) métodos oficiais Cd 3d-63 e Ca 5a-40, respectivamente. Estes métodos são utilizados para determinação do índice de acidez e teor de ácidos graxos livres de óleos e gorduras vegetais. Consistem-se na utilização de solução de hidróxido de sódio (NaOH) para titulação do ácido graxo livre na amostra, segundo metodologia adotada por Moreto e Fett (1998). Realizado esse procedimento e anotado o volume de NaOH gasto na titulação, o índice de acidez foi determinado de acordo com a equação 2 e os valores de porcentagem de ácidos graxos são calculados conforme a equação 3.

$$IA(\text{mg KOH/g}) = \frac{Vxfx 56,11 xM}{m} \quad (2)$$

$$\% AG(\%) = \frac{Vxfx 28,20 xM}{m} \quad (3)$$

Sendo que: IA é o índice de acidez (mg KOH/g), V é o volume de solução de NaOH necessário para titular a amostra (mL), f é o fator de correção da solução de NaOH (em torno de 1), M é a molaridade da solução de NaOH (mol/L), m é a massa da amostra utilizada (g), 56,11 é o fator de correção com relação ao KOH e % AG é a porcentagem de ácidos graxos livres (%) e 28,2 é o fator de correção com relação ao ácido oleico.

4.2.7. Conversão

O cálculo da conversão foi realizado a partir dos valores obtidos do índice de acidez no início (branco) e no final da reação de acordo com o descrito por Moreto e Fett (1998), evidenciado na equação 4.

$$X(\%) = \left(\frac{IA_o - IA_f}{IA_o} \right) x 100 \quad (4)$$

Onde: X é a taxa de redução do índice de acidez (%), IA_o é o índice de acidez no início da reação e IA_f é o índice de acidez no final da reação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividades da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada

A partir dos valores de absorvância encontrados (Tabela A1 no anexo A) foi possível obter o valor da tangente por meio da equação da reta determinada através de gráfico de regressão linear, e por meio deste realizar o cálculo da atividade do derivado à base de quitosana com a lipase imobilizada em cada reator utilizado, sendo determinado em triplicata com o auxílio dos valores da Autodegradação do pNPB (substrato) que consistiu no branco da reação para a atividade enzimática. Estão evidenciados na figura A1 no anexo A os comportamentos gráficos das absorvâncias obtidos nos reatores em que foram realizados os ensaios de atividade enzimática, bem como o gráfico com as absorvâncias referentes ao branco. Cruz (2015) aferiu a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* em sua forma livre, apresentando um valor de $450,04 \pm 1,1$ U/ml de extrato.

A atividade média da lipase imobilizada em quitosana 5% m/v foi $0,56 \pm 0,11$ U/g-1 unidades de enzima por grama de suporte está representado na tabela 3.

Tabela 3 - Valores referentes às massas de organogéis com lípase imobilizada seguido de diferentes atividades do suporte em cada reator.

| Reator | Massa Derivado (g) | Atividade Derivado U/g⁻¹ |
|---------------|-------------------------------|--|
| 1° | 0,23 | 0,52 |
| 2° | 0,25 | 0,68 |
| 3° | 0,21 | 0,47 |

Fonte: Dados do trabalho, 2016.

No estudo de Carneiro (2013) determinou-se a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em quitosana a 5% m/v, apresentando uma atividade 0,88 U/g. Cavalcante (2014) mostra em seu presente trabalho, que a quitosana 5 % m/v associada ao hexano com o tensoativo SDS apresentou uma das maiores atividades ($0,5 \pm 0,05$ U/g) em comparação a outro derivado estudado, como o alginato de sódio associado ao hexano como fase orgânica, ativado por glutaraldeído e SDS como tensoativo apresentou atividade ($0,2 \pm 0,06$ U/g), sendo relativamente menor que a quitosana. Acredita-se que o alginato de sódio, por formar organogel com estrutura mais rígida e/ou menos maleável que o suporte a base de quitosana,

dificulte a difusão do substrato até a enzima no interior micelar, resultando numa atividade enzimática menor do que o suporte à base de quitosana. Cruz (2015) determinou a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em quitosana a 5% m/v, mostrando uma atividade 0,56 U/g.

Portanto, o suporte a base de quitosana apresenta-se como promissor, mostrando ser um dos melhores para imobilização da lipase pelo método encapsulação em matriz polimérica de quitosana com a enzima confinada dentro do centro micelar em organogel (figura 20).

Figura 20: Estrutura macroscópica do organogel a base de quitosana.



Fonte: Modificado de Cruz 2015.

5.2 Obtenções dos ácidos graxos livres do óleo de pequí

Na extração dos ácidos graxos livres do óleo in natura do pequí foi obtido o rendimento médio final de 76%. A tabela 4 mostra as massas iniciais utilizadas do óleo in natura e as massas finais correspondentes aos ácidos graxos após hidrólise dos triglicerídeos obtidos juntamente com o rendimento da reação.

Tabela 4 - Rendimento obtido nos ensaios de hidrólise de triglicerídeos do óleo de pequí in natura.

| Massa óleo in natura(g) | Massa ácido graxo (g) | Rendimento (%) |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 30,03 | 23,34 | 77,72 |
| 30,02 | 22,54 | 75,08 |
| 30,02 | 22,46 | 74,82 |
| 30,01 | 23,25 | 77,47 |
| 30,04 | 22,97 | 76,46 |

Fonte: Dados do trabalho 2016.

A hidrólise alcalina com KOH em ultrassom, como afirma Lima (2009) e Cruz (2015) trata-se de uma reação, capaz de retirar os ácidos graxos presentes nas estruturas dos triglicerídeos, sem alterar a conformação molecular dos ácidos graxos obtidos.

5.3 Ensaios de esterificação utilizando ácidos graxos do óleo de pequí com a lipase imobilizada

Nos ensaios foram utilizados os ácidos graxos obtidos através da hidrólise do óleo de pequí, quanto maior a acidez presente nesse óleo maior sua conversão e/ou síntese de ésteres. Foi avaliada a influência da razão molar ácido/etanol em relação ao percentual dos ésteres etílicos formados em função da quantidade de etanol presente no meio reacional para cada uma das razões molares analisadas no estudo.

Na síntese de ésteres a partir de ácidos graxos do óleo de pequí utilizou o etanol, com aplicação da lipase imobilizada em um suporte de baixo custo, como a quitosana em organogel, ocorreu variações das concentrações molares de ácidos graxos e álcool utilizados em cinco razões molares diferentes. Foram analisadas essas razões afim de identificar qual razão possui maior conversão em ésteres. Observa-se na tabela 5 os resultados obtidos no ensaio de esterificação, evidenciando os seguintes dados obtidos: índice de acidez inicial e final, porcentagem de ácidos graxos livres iniciais e finais seguido da conversão para cada razão molar.

O índice de acidez inicial apresentado nas amostras em todas as razões molares decresceu com o aumento da concentração de álcool etílico utilizado em análise. Wu; Jaaskelainen; Linko (2003) em seu trabalho cita que o suporte no qual a enzima foi imobilizada pode ter adsorvido o etanol, este por ser um composto bastante polar, promove em elevadas concentrações a formação de uma camada estática desse substrato em torno da

partícula de enzima imobilizada impedindo conseqüentemente a entrada dos ácidos graxos livres ao sítio ativo da enzima e retirando a camada de água que serve como proteção da estrutura da molécula de enzima. Logo, a razão molar 1:1 em análise apresentou maior índice de acidez inicial, aproximadamente 96,15 (mg KOH/g), vale salientar que esta razão estava sob menor concentração de etanol, favorecendo tal comportamento. A razão 1:5 apresentou maior acidez final com 45,33 (mg KOH/g). Porém ao analisar tal resultado, não significa que esta razão apresentou uma baixa conversão, pois ao se fazer a diferença entre a acidez final e a inicial, o resultado não foi o menor entre as amostras. Assim, ao analisar a razão 1:20, fazendo diferença entre a acidez final e a inicial observa-se uma menor relação quando comparado com as outras razões, levando a entender que essa apresentou uma menor conversão. Observa-se na tabela 5 os resultados acima apresentados.

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão referente aos ensaios de esterificação para cada razão molar utilizando o óleo de pequi. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).

| Razão molar | Ia – inicial (mg KOH/g) | Ia – final (mg KOH/g) | % AG (%) – inicial | % AG (%) – final | Conversão (%) |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| 1:1 | 96,15 \pm 0,17 | 41,67 \pm 2,34 | 48,45 \pm 0,27 | 20,94 \pm 1,17 | 56,67 \pm 2,35 |
| 1:5 | 66,39 \pm 2,81 | 45,33 \pm 0,59 | 33,37 \pm 1,41 | 22,78 \pm 0,30 | 31,68 \pm 1,99 |
| 1:10 | 45,82 \pm 0,24 | 34,87 \pm 0,92 | 23,03 \pm 0,12 | 17,52 \pm 0,46 | 23,90 \pm 1,61 |
| 1:15 | 35,23 \pm 1,11 | 28,89 \pm 1,63 | 17,71 \pm 0,56 | 14,52 \pm 0,82 | 18,04 \pm 2,05 |
| 1:20 | 28,22 \pm 0,03 | 24,08 \pm 1,08 | 14,18 \pm 0,02 | 12,10 \pm 0,54 | 14,69 \pm 3,92 |

Fonte: Dados do trabalho 2016.

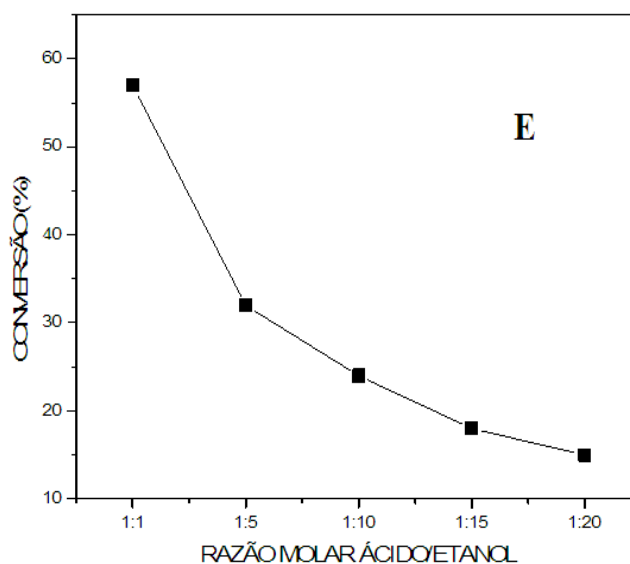
O decréscimo na conversão de ácidos em ésteres pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração de etanol utilizada nas demais proporções molares e/ou devido à quantidade de água formada no meio reacional durante a reação de esterificação (Wu; Jaaskelainen; Linko, 2003).

Possivelmente, o excesso de álcool provocou a inativação da enzima pois esta pode sofrer inibição pelo álcool. Tal comportamento das lipases frente ao excesso estequiométrico de álcool pode ser explicado por efeitos inibitórios, uma vez que devido à elevada polaridade de álcoois de cadeia curta (o etanol utilizado no estudo) ao entrar em contato com a enzima, pode ficar adsorvido no suporte no qual a enzima foi imobilizada, formando uma camada limite em torno do biocatalisador deixando o sítio ativo da enzima inacessível ao substrato. A concentração de água representa uma provável inativação enzimática, pois a quantidade de

água formada na reação de esterificação promove o deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação, favorecendo a hidrólise dos ésteres formados (Oliveira, 2012; Foresti et al., 2007)

O estudo de Carneiro (2013) apresenta que lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em quitosana, em meio de reação com ácidos graxos do óleo de coco e etanol para a síntese de ésteres, apresenta uma maior conversão (51,8%) na razão 1:1, e ocorrendo um decréscimo da conversão nas demais razões. Em Cavalcante (2014) ocorreu o mesmo, obtendo na razão 1:1 o maior valor de conversão (80%) em esterificação, utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* com ácido oleico. Seguindo a mesma metodologia dos demais, Cruz (2015) obteve uma conversão de 73,2% em esterificação, fazendo uso de lipases *Rhizomucor miehei* em reação com o óleo de buriti e etanol. O comportamento gráfico de conversão das amostras de ácidos graxos frente a formação de ésteres, nos ensaios de esterificação para o óleo de pequí estão representados na figura 21. No anexo B, especificamente na figura B1 mostra o perfil gráfico dos resultados obtidos em relação a acidez final e inicial, bem como a porcentagem de ácidos graxos livres iniciais e finais apresentados nos ensaios.

Figura 21: Conversão em ésteres apresentadas para cada ensaio realizado respectivamente com óleo de pequí na ausência de sagu no meio reacional.



Fonte: Dados do trabalho 2016.

5.4 Esterificações com a presença de agente dessecante (amido) no meio de reação

Para a avaliação do efeito da remoção da água, foi adicionado amido como agente dessecante ao meio reacional. Ao analisar os resultados obtidos conclui-se que esse agente promoveu um aumento da conversão em todas as razões molares analisadas. Dessa forma o amido é de suma importância na síntese de ésteres, pois possui a capacidade de adsorver a água residual formada durante a reação de esterificação, favorecendo o aumento da conversão dos ésteres formados. A razão 1:1 não apresentou o menor índice de acidez final com 28,14 (mg KOH/g), porém apresentou um aumento significativo na conversão de 56,67% para 70,53%. Já a razão 1:20 como esperado, apresentou a menor conversão, porém ocorreu um aumento de 14,69 % para 25,23% na concentração de ésteres formados. Portanto, obteve-se um aumento razoável na produção de ésteres formados no meio reacional. Com relação ao índice de acidez inicial e a porcentagem de ácidos graxos livres iniciais no óleo mantiveram-se praticamente idênticos por não terem sofrido alterações estatisticamente significativas, por outro lado o índice de acidez final e porcentagem de ácidos graxos livres finais diminuíram, favorecendo a elevação da diferença entre a acidez do meio inicial e final, resultando em uma maior conversão.

No trabalho de Cruz (2015) foi evidenciado um aumento na conversão em ésteres com o uso do agente dessecante (amido) utilizando a Lipase de *Rhizomucor miehei* em reação com o óleo de buriti, apresentando um aumento de 73,20% para 80,12%.

Santos (2011) mostrou que na esterificação realizada com o ácido oleico em presença de zeólitas como agente adsorvente da água residual formada no meio reacional evidenciou um aumento na conversão em ésteres de 46,8% para 53,0% na razão 1:4, por um período de 6,5 horas de reação utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada em quitosana. Oliveira (2012) também realizou estudos com a lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em quitosana, utilizando como agente dessecante peneira molecular 4A para a síntese de butirato de etila. A presença do agente dessecante promoveu reduções significativas nas taxas de conversão em éster, o rendimento que na ausência deste dessecante foi de 89%, foi reduzido para 46%. No estudo realizado por Cavalcante (2014) permitiu evidenciar que com a utilização de agente dessecante do tipo zeólitas ocorreu uma redução da conversão em todas as razões molares, frisando a razão 1:1 que ocorreu uma redução de 80% para 70% em ésteres formados após adição de agente dessecante. Portanto, isso comprova que a quantidade de agente dessecante utilizado removeu toda a quantidade de água formada no meio reacional, inclusive a concentração de água presente na estrutura da lipase.

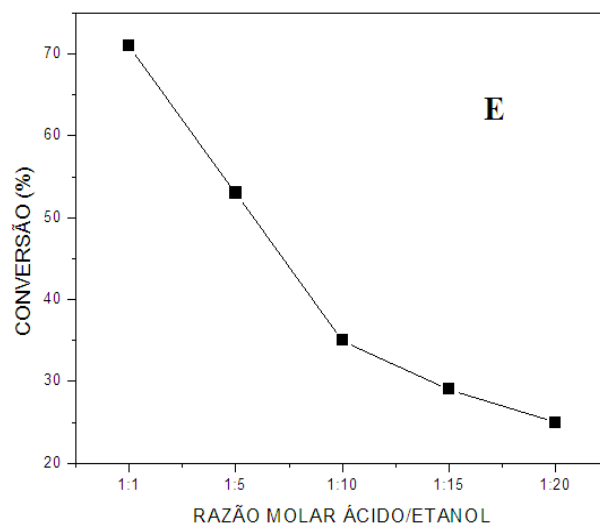
Assim, foi utilizada nos ensaios uma quantidade de 4g de amido que não interferiu na atividade enzimática em todas as razões, ou seja, essa quantidade utilizada permitiu promover um aumento da conversão nos ensaios com o óleo. Na tabela 6, podemos observar os resultados apresentados dos ensaios realizados na presença do agente dessecante, bem como o desvio padrão entre as amostras, que se manteve baixo em praticamente todos os ensaios, mostrando a confiabilidade nos testes realizados. Em seguida, na figura 22, observa-se o comportamento gráfico dos resultados obtidos com o amido na reação, em relação ao percentual de ésteres formados após as 24 horas de reação de esterificação. No anexo B, especificamente na figura B2 mostra o perfil gráfico dos resultados obtidos em relação a acidez final e inicial, bem como a porcentagem de ácidos graxos livres iniciais e finais apresentados nos ensaios.

Tabela 6 -Média \pm desvio padrão referente aos ensaios de esterificação realizados em duplicata com óleo de pequí em presença de amido no meio reacional. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres).

| Razão molar | Ia – inicial (mg KOH/g) | Ia – final (mg KOH/g) | % AG (%) – inicial | % AG (%) – final | Conversão (%) |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| 1:1 | 95,50 \pm 0,03 | 28,14 \pm 1,04 | 47,99 \pm 0,02 | 14,14 \pm 0,52 | 70,53 \pm 1,08 |
| 1:5 | 68,05 \pm 0,36 | 32,18 \pm 1,78 | 34,20 \pm 0,18 | 16,18 \pm 0,90 | 52,70 \pm 2,87 |
| 1:10 | 45,79 \pm 0,23 | 29,73 \pm 1,07 | 23,02 \pm 0,12 | 14,94 \pm 0,54 | 35,08 \pm 2,02 |
| 1:15 | 31,91 \pm 0,22 | 22,55 \pm 0,32 | 16,04 \pm 0,11 | 11,34 \pm 0,16 | 29,30 \pm 1,50 |
| 1:20 | 26,52 \pm 0,10 | 19,82 \pm 0,45 | 13,33 \pm 0,05 | 9,97 \pm 0,22 | 25,23 \pm 1,96 |

Fonte: Dados do trabalho 2016.

Figura 22: Percentual de conversão em ésteres apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de pequí na presença de sagu (amido) no meio reacional.



Fonte: Dados do trabalho 2016.

A quantidade de amido ou agente dessecante adicionado ao meio reacional tem que ser ideal para que não ocorra diminuição da atividade enzimática, pois a lipase não pode sofrer alterações em sua estrutura tridimensional ativa. Dessa forma, as lipases necessitam de uma concentração mínima de água que é necessária para manter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando a enzima está covalentemente ligada a um suporte (Trubiano; Borio; Errazu, 2007).

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi sintetizado um derivado para a imobilização da enzima lipase de *Rizhomucor miehei*, para a aplicação nas reações de esterificação. Com base na atividade da enzima imobilizada, bem como da enzima livre, o derivado mostrou-se como um suporte promissor. Fazendo uso da imobilização enzimática pode-se diminuir o custo da reação, permitindo uma fácil separação do catalisador imobilizado do meio reacional, favorecendo o aumentando da resistência mecânica, gerando menores custos para a indústria.

Foram agregados valores a materiais de baixo custo como a quitosana, feito o uso para a síntese do suporte e/ou imobilização do catalisador, e o amido para adsorver a água residual formada durante a reação de esterificação, no intuito de aumentar os índices de conversão pela retirada de água do meio.

Obteve-se ácidos graxos livres a partir do óleo de pequí com a utilização de metodologia em ultrassom ocorrendo inicialmente catálise alcalina, com posterior catálise ácida, apresentando rendimento rentável, sendo viável para o processo de esterificação.

Dentre os cinco ensaios realizados a razão molar 1:1 mostra-se como a ideal, por apresentar resultados satisfatórios na presença de baixas concentrações alcoólicas, permitindo concluir que é desnecessário o excesso estequiométrico de álcool, tornando o processo enzimático de esterificação nesse aspecto mais vantajoso que a catálise química convencional.

Os ensaios de esterificação na presença do amido como agente dessecante no meio reacional, apresentou uma maior conversão em todas as amostras. Portanto, é necessário estudar esse dessecante em maiores quantidades, aumentar a carga enzimática e analisar afundo as variáveis de reação na produção de ácidos graxos e ésteres a afim de otimizar a metodologia bem como realizar a identificação das composições químicas dos produtos de reação formados através da espectrofotometria, bem como identificar suas finalidades na indústria alimentícia e farmacêutica.

7. REFERÊNCIAS

ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. 25 de abril de 2008. 161f.** 2008. Tese de Doutorado. Tese Faculdade de Engenharia Química. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.

ADRIANO, W. S.; MENDONÇA, D. B.; RODRIGUES, D. S.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. L. C. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170-2179, 2008.

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.

AOCS - **American Oil Chemists Society; Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**, 5th ed., Champaign: AOCS, 2000.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Compos. Analysis**, v.17, n.3/4, p.385-396, 2004.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 3, p. 400-6, 2006.

BASTOS, A. K. P. **Estudo da seletividade de lipases para a obtenção de ésteres de ácidos graxos.** Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

BERGAMASCO, J. **Síntese e caracterização de microesferas de poli (álcool vinílico) e sua utilização como suportes para imobilização de lipase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de**

biodiesel via rota etílica. 2013. 115f. Dissertação - (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2004.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3, p. 97-101, 2007.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia e Indústria. Coordenadoria de Informações Tecnológicas. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Brasília, DF, p.161, 1985.

CARDOSO, L. C. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.

CARRARA, R. C.; RUBIOLO, C. A. Immobilization of beta.-galactosidase on chitosan. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 2, p. 220-224, 1994.

CARNEIRO, E. A. **Preparação de Catalisadores Visando à Obtenção de Biodiesel Por Esterificação Enzimática de Ácidos Graxos de Óleo de Coco.** 2013. 116f. Tese - (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

CRONQUISTA, T. A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants.** 2° ed. New York: The New Botanical Garden. 1988.

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.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇON, F. Confirmando a esterificação de Fischer por meio dos aromas. **Química Nova na Escola**, v. 19, p. 36-38, 2004.

CAVALCANTE, K. F. **Estudo da imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel para aplicação em síntese orgânica.** 2014. 82f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

CRUZ, F. C. **Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada para produção de ésteres com aplicação na indústria farmacêutica a partir de ácidos graxos do óleo de buriti.** Cuité, 2015. ,71f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité –PB, 2015.

DALLA-VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DANDEVATE, V.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 349-352, 2009.

DEREWENDA, S. Z.; DEREWENDA, U.; DODSON, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 227, n. 3, p. 818-839, 1992.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil, Fev. 2006.

DURLI, E. **Tratamento de efluente de indústria de laticínios utilizando lípases de *Burkholderia cepacia* LTEB11.** 2007.111 f. 2007. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. [Links].

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v. 21, n.1, p.16-19, 1998.

FEHÉR, E.; ILLEOVÁ, V.; KELEMEN-HORVÁTH, I.; BÉLAFI-BAKO, K.; POLAKOVIC, M.; GUBICZA, L. Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid–alcohol biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, n. 1, p. 28-32, 2008.

FERRAZ, L. I. R.; POSSEBOM, G.; ALVEZ, E. V.; CANSIAN, R. L.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 44-48, 2015.

FIGUEIREDO, E. V. C. **Desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados de lipases e sua aplicação na resolução cinética de mandelato de etila**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2013.

FORESTI, M. L.; PEDERNERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple Effects of Water on Solvent-free Enzymatic Esterifications. **Enzymes and Microbial Technology**, V. 41, p. 62-70, 2007.

FRANKEN, L. P. G.; MARCON, N. S.; OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; DARIVA, C.; DESTAIN, J.; OLIVEIRA, J. V. .Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 511-520, 2010.

GRIZ, D. **Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas em filmes de amido/PVA**. 2010. 47f. Projeto de estágio supervisionado II - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

HANEFELD, U. L. F.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HASAN, F; SHAH, A. A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HEDFORS, C. **Lipase chemoselectivity-kinetics and applications**. Licentiate Thesis. School of Biotechnology - Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2009.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. TIBTECH 1998, 16, 396. **CrossRef, PubMed, CAS, Web of Science® Times Cited**, v. 316.

JESUS, P.C.; JOÃO, J. J.; SILVA, P. L. F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M. G. Organogel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova**, v.20, p. 664-672, 1997.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, W. P.; KUMAR, A. P. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 52, n. 6, p. 315-320, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and microbial technology**, v. 35, n. 2, p. 126-139, 2004.

KUMAR, G.; BRISTOW, J. F.; SMITH, P. J.; PAYNE, G. F. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. **Polymer**, v. 41, n. 6, p. 2157-2168, 2000.

LEDRA, C. G. A. **Preparação de ésteres de aroma catalisada por lipases imobilizadas em filme de amido de batata**. Relatório Estágio Supervisionado II, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Novembro, 2009.

LEHNINGER, A.L.; COX, M.L.; NELSON, D.L. **Princípios de Bioquímica**. Traduzido por Lodi, W.R.; Simmes, A.A., 4ª edição, Sarvier, São Paulo, 2006.

LIMA, L.P. **Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando à produção de biodiesel**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

MARTINS, V.G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31(8), p. 1942-1947, 2008.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L.C. **Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus***. *Quim. Nova*, v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A Importância da síntese de fármacos. *Química Nova na Escola*, v.16, 2001.

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.

MIRANDA, M. **Aprimoramento do Procedimento de Imobilização da Lipase Microbiana em Óxido de Nióbio para Modificação de Óleos Vegetais**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Química de Lorena. Lorena-SP-Brasil: 2004.

MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**, 1ª Ed. São Paulo: Editora Varela, p.114-133, 1998.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**, 3ª ed, p. 189-224, Sarvier, 2002.

NUERNBERG, G. B. **Imobilização de lipases em filmes de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose**. Univerisidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Química, Florianópolis – SC, Brasil, Fev. 2004.

OLIVEIRA, M. E. B.; GUERRA, N. B.; BARROS, L. M.; ALVES, R. E. Aspectos Agronômicos e da qualidade do pequi – Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, Documentos 113, ISSN 1677-1915, Fevereiro, 2008.

OLIVEIRA, U. M. F. **Síntese de Ésteres de Interesse Comercial Utilizando Lipases Imobilizadas em Quitosana**. 2012. 191 f. Tese Doutorado em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

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.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADELPICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, suppl., p.625-630, 2006.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, v. 77, n. 1, p. 149-162, 1999.

PEIXOTO, A. R. O pequi e a lavoura no Cerrado. In: PEIXOTO, A. R (Ed.). **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, p. 197-226, 1973.

PEREIRA, A. F. **Imobilização de lipase de Rhizomucor miehei em organo-gel: desenvolvimento de um catalisador para produção de ésteres**. Cuité, 2015. , 72f. Trabalho de Conclusão de Curso, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – PB, 2015.

PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

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

SANTOS, J. S. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Univerisdade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil, 2011.

SANTOS, J. C. S. **Optimação de biocatalisadores: desenvolvimento de estratégias para modulação de propriedades de enzimas por técnicas físicas e químicas**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

SCHMID, Rolf D.; VERGER, Robert. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, A. E. **Estudo do processo enzimático de produção de biodiesel a partir de óleos e gorduras residuais de fritura**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília: EMBRAPA – CPAC. 178p. 2001.

SOUZA, M.C.M. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em Nanopartículas Magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Tese (Doutorado em Engenharia Química- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TAN, T.; NIE, N. 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.

TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the Operating Conditions and the External Mass Transfer Limitations on the Synthesis of Fatty Acid Esters Using a *Candida antarctica* Lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.716-722, 2007.

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.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; 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.

VIEIRA, Danielle Cristina. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Veríssimo, L. A. A. **Métodos de imobilização de enzimas e ativação de suportes**. Tese de Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Mg, Agosto, 2012.

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.

WU, X. Y.; JAASKELAINEN, S.; LINKO, Y. Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v.59, n. 2, p.145-158, 2003.

APÊNDICE

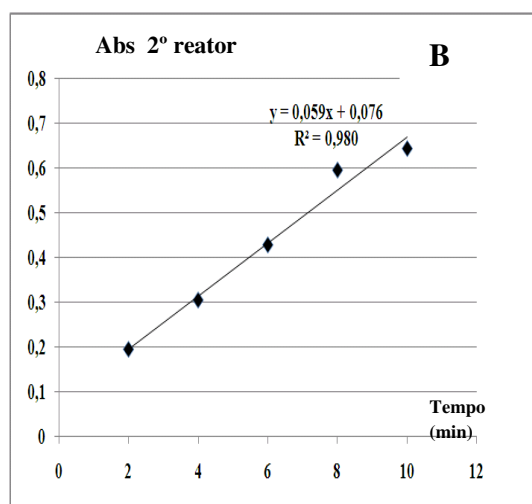
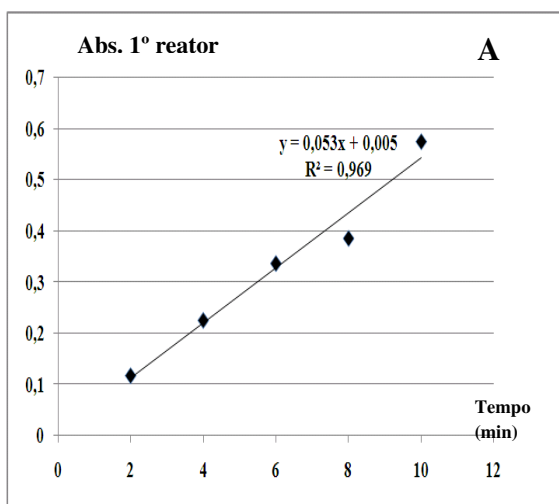
ANEXO A - Valores aferidos para absorvância em cada reator analisado, bem como a autodegradação do substrato (pNPB), com posterior comportamento gráfico dessas absorvâncias obtidas para realização do cálculo da atividade da enzima imobilizada.

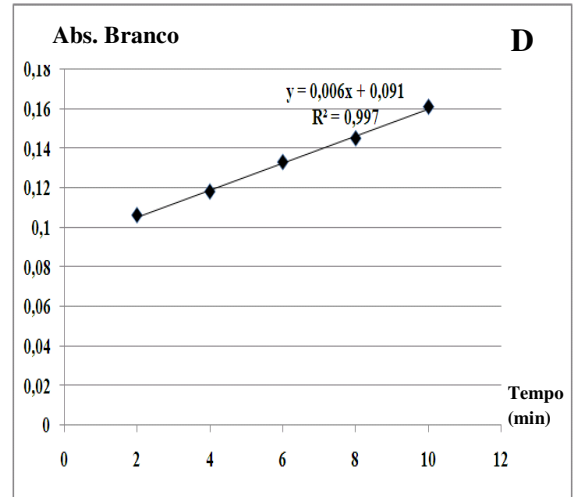
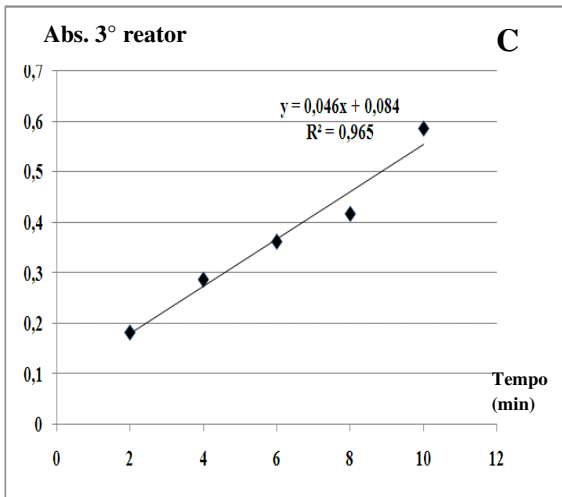
Tabela A1 - Valores de absorvância apresentados pelos três reatores utilizados para a determinação de atividade do derivado a base de quitosana seguido da Autodegradação do **pNPB** (substrato) que consistiu no branco para os ensaios.

| Reator/tempo (min) | Reator 1 (abs) | Reator 2 (abs) | Reator 3 (abs) | Autodegradação (pNPB) |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| 2 | 0,117 | 0,194 | 0,181 | 0,106 |
| 4 | 0,225 | 0,304 | 0,286 | 0,118 |
| 6 | 0,336 | 0,427 | 0,361 | 0,133 |
| 8 | 0,385 | 0,594 | 0,416 | 0,145 |
| 10 | 0,574 | 0,642 | 0,585 | 0,155 |

Fonte: Cruz, 2015.

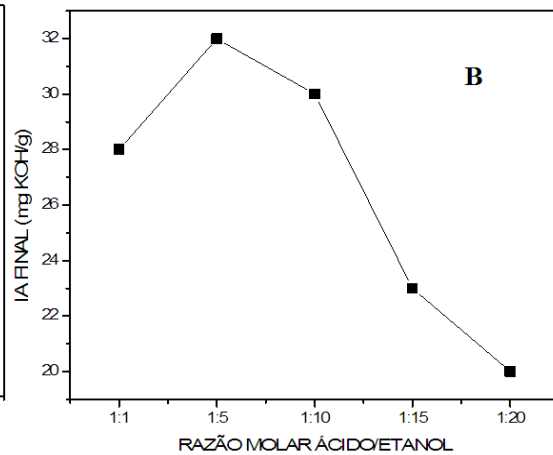
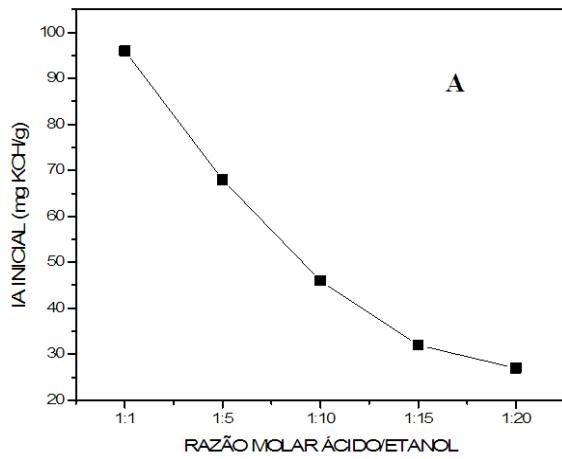
Figura A1: Comportamento gráfico das absorvâncias do primeiro (A), segundo (B) e terceiro (C) reator utilizado para verificar a atividade do derivado, bem como os valores obtidos da autodegradação do pNPB (D).

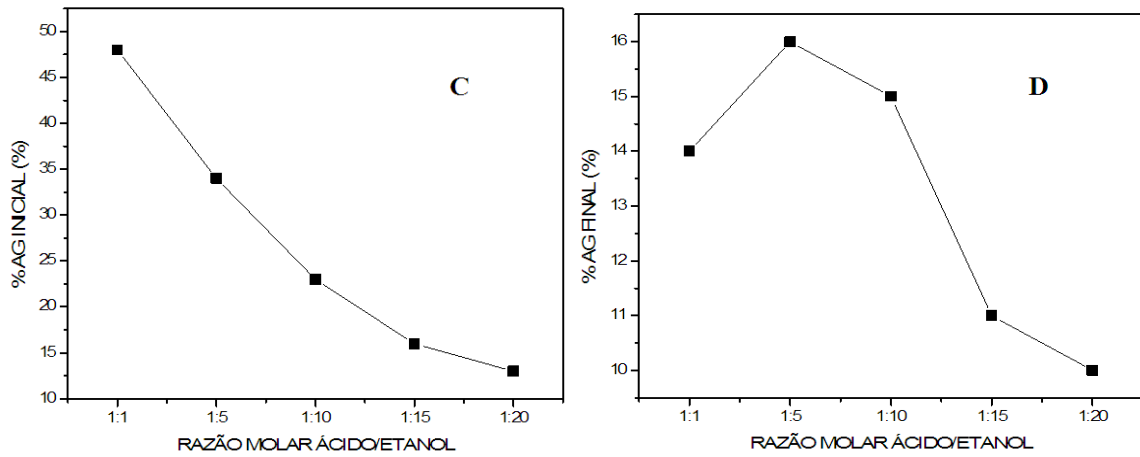




ANEXO B - Perfis dos resultados obtidos com as razões ácido/etanol utilizadas na esterificação com a ausência do amido e presença do amido no meio reacional.

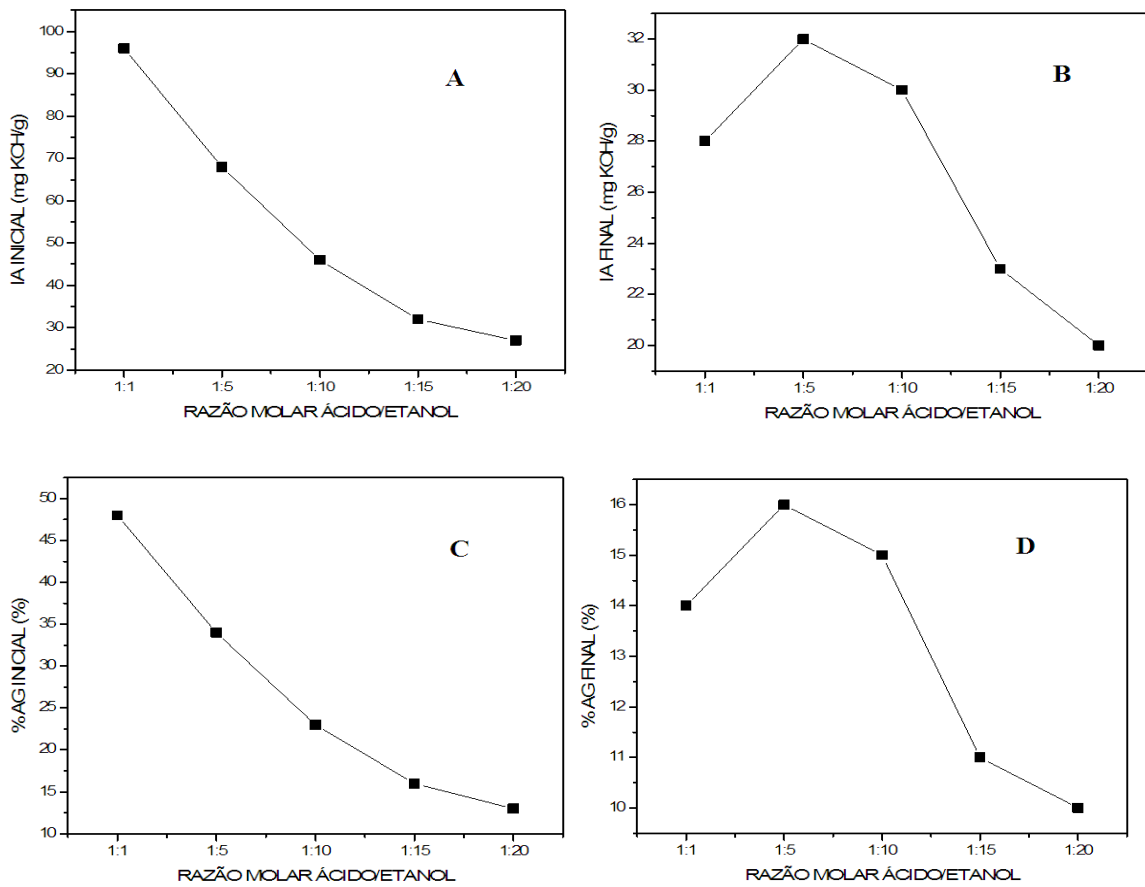
Figura B1: Gráficos referentes ao índice de acidez inicial (A), final (B) e porcentagem de ácidos graxos iniciais (C), finais (D) apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de pequí na ausência de amido no meio reacional.





Fonte: Dados do trabalho 2016.

Figura B2: Gráficos referentes ao índice de acidez inicial (A), final (B) e porcentagem de ácidos graxos iniciais (C), finais (D), apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na presença de sagu (amido) no meio reacional.



Fonte: Dados do trabalho 2016.