



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

GEOCLECIA FERREIRA CRUZ

**LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES
COM APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA A PARTIR DE ÁCIDOS
GRAXOS DO ÓLEO DE BURITI**

CUITÉ – PB

2015

GEOCLECIA FERREIRA CRUZ

**LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES
COM APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA A PARTIR DE ÁCIDOS
GRAXOS DO ÓLEO DE BURITI**

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. Dr. Wellington Sabino Adriano

CUITÉ – PB

2015

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

C957l Cruz, Geoclecia Ferreira.

Lipase de Rhizomucor miehei imobilizada para produção de ésteres com aplicação na indústria farmacêutica a partir de ácidos graxos do óleo de Buriti. / Geoclecia Ferreira Cruz. – Cuité: CES, 2015.

70 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Dr. Wellington Sabino Adriano.

1. Lipase. 2. Imobilização. 3. Quitosana. 4. Óleo de Buriti
5. Esterificação. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 577.1


GEOCLECIA FERREIRA CRUZ

**LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES
COM APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA A PARTIR DE ÁCIDOS
GRAXOS DO ÓLEO DE BURITI**

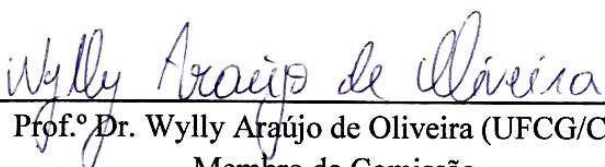
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovado em, 17 / 06 / 2015


BANCA EXAMINADORA



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



Prof.º Dr. Wylly Araújo de Oliveira (UFCG/CES)
Membro da Comissão



Prof.ª Dr.ª Igara Oliveira Lima (UFCG/CES)
Membro da Comissão

**CUITÉ - PB
2015**

Dedico a Deus. A minha amada mãe Maria Gorete, por sempre está ao meu lado e me apoiar incondicionalmente em todas as minhas decisões, com todo carinho, paciência amor, dedicação, me mostrando sempre qual o caminho certo a seguir.

A senhora, todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus pela vida, pela sabedoria, por iluminar sempre os meus passos para conseguir minhas conquistas pessoais e acadêmicas, permitindo sempre vencer os obstáculos durante a graduação, bem como em outras situações vivenciadas e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar, apoiar durante a realização dessa monografia. A estas pessoas, meus sinceros agradecimentos.

À minha mãe Maria Gorete, um exemplo de mulher guerreira, humilde, perseverante, digna, honesta, dedicada que sempre esteve ao meu lado, não medindo esforços para que concluísse a graduação. Muitas vezes teve que abdicar de seus sonhos em razão dos meus. Espero um dia retribuir tudo de maravilhoso que a senhora concedeu em minha vida. É mais que uma mãe, é a minha melhor amiga, confidente e companheira. Sempre disposta a me apoiar, ajudar, com carinho, dedicação e amor incondicional não deixando que desistisse jamais do que sempre almejei. Sou eternamente grata por tudo o que sou hoje, por todas as minhas conquistas e sonhos realizados. Essa conquista não é só minha, e sim nossa. Sem a senhora jamais teria sido possível.

Ao meu pai José Ribeiro (*in memoriam*), obrigada por todos os ensinamentos, por ser tão maravilhoso e dedicado, mesmo não estando presente fisicamente nesse período de graduação, sempre soube que estava feliz e orgulhoso, por ter conseguido cumprir essa etapa. Eterna saudade, gratidão e lembrança.

Ao meu noivo Paulo Nilran, pela compreensão, amor, confiança, respeito, apoio moral, por acreditar sempre em meu trabalho, aceitar a distância, não deixando que desistisse jamais de alcançar os meus objetivos.

Aos meus amigos Shellygton Lima, Emily Lorrah e Fernando Amancio que estiveram ao meu lado durante o curso e na realização desse trabalho, sendo nos momentos bons ou ruins, na realização de trabalhos acadêmicos, bem como em publicações, sempre me apoiando em minhas decisões. Se tornando pessoas muito especiais para mim.

Ao orientador Wellington Adriano, não tenho palavras para agradecer todos os ensinamentos, recomendações, disponibilidade, acesso e confiança a mim ofertados durante a realização deste trabalho e demais produzidos. Por ter me dado a oportunidade de realizar projetos de iniciação científica, uma experiência enriquecedora, única, gratificante em minha vida acadêmica e profissional. Sou imensamente grata por todas as oportunidades concedidas.

Ao professor Wyly Araújo, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade, por acreditar em meu trabalho, por abrir às portas a iniciação à docência por meio da monitoria, onde pude vivenciar experiência gratificante para minha vida acadêmica e profissional.

À todos os Docentes do Curso de Bacharelado em Farmácia, em especial a Igara Oliveira, Júlia Beatriz e Fernando Oliveira, pelos ensinamentos, disponibilidade. Onde dividiram suas experiências e conhecimentos para que fosse possível me tornar uma futura profissional competente, baseada na ética e segurança.

Aos funcionários do CES, pela disponibilidade na prestação de serviços, sempre ajudando se necessário.

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.

“Se pensar é o destino do ser humano, continuar sonhando é o seu grande desafio. E isto, é lógico, implica em trajetórias com riscos, em vitórias, com muitas lutas, e não poucos obstáculos pelo caminho. Apesar de tudo, seja ousado. Liberte sua criatividade e nunca desista dos seus sonhos, pois eles transformarão sua vida em uma grande aventura.”

Augusto Cury

RESUMO

O uso de lipase imobilizada em processos de esterificação a partir de óleos vegetais leva a altos rendimentos de ésteres sob suaves condições de operação. Em meio aos diferentes suportes usados na imobilização, a quitosana, é um suporte orgânico, ou seja, consiste em um polímero natural, que tem sido amplamente empregada devido ao seu baixo custo. Tem-se como objetivo a aplicação de 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 Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) com potencial aplicação na indústria farmacêutica. Torna-se importante a realização desse estudo para promover uma alternativa de aproveitamento de produtos regionais como o suporte de imobilização, óleos, contribuindo para a expansão e diversificação da biotecnologia industrial. Inicialmente na realização desse trabalho caracterizou-se físico-quimicamente o óleo de buriti para avaliar a qualidade do óleo utilizado. Posteriormente foi quantificada a atividade da enzima livre e imobilizada previamente aos ensaios de esterificação, sendo esses, realizados a partir de ácidos graxos obtidos do óleo de Buriti em diferentes proporções de etanol, ou seja, em distintas razões molares sob agitação de 150 rpm a 37°C durante 24 horas. Os ensaios de esterificação foram realizados também com a presença do amido como agente adsorvente ou dessecante. Sendo determinada a acidez do meio reacional inicial e final para saber qual o rendimento de ésteres produzidos. A lipase em sua forma livre apresentou atividade de 450,04 U/mL e na forma imobilizada evidenciou atividade de 0,56 U/g. O óleo de buriti apresentou densidade relativa de 0,9213, umidade de 0,23%, índice de acidez de 7,66 mg KOH/g, índice de saponificação de 96,3 mgKOH/g e índice de peróxido com valor de 12,84 mEq/1000g, estando conforme o que descreveu a literatura. Foi obtido um rendimento de 87% de ácidos graxos obtidos. Ocorreu valor máximo de conversão nos ensaios realizados com a lipase em sua forma imobilizada na razão molar 1:1, sendo 73,2% de ésteres formados na reação sem agente dessecante e 80,12% de conversão em meio reacional com a presença desse agente. Com o aumento da razão molar, houve uma diminuição nos ésteres formados, devido o aumento do etanol utilizado que impede o acesso de ácidos graxos ao sítio ativo e retira a camada aquosa protetora da estrutura enzimática. Bem como, utilizou o amido para evitar que a presença de água residual formada em todas as razões molares na reação de esterificação promovesse a hidrólise dos ésteres formados diminuindo a conversão.

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

ABSTRACT

The use of immobilized lipase for esterification processes from vegetable oils leads to high yields of esters under mild operating conditions. Among the different media used in immobilization, chitosan, it is an organic support, or consisting of a natural polymer which has been widely used because of its low cost. It has been aimed at the application of *Rizhomucor miehei* lipase immobilized on chitosan aiming at its use in obtaining esters obtained from fatty acids from the hydrolysis of the Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L. f .) with potential application in the pharmaceutical industry. It is important to conduct this study to promote an alternative use of regional products such as immobilization support, oils, contributing to the expansion and diversification of industrial biotechnology. Initially in carrying out this work was characterized chemically - physical buriti oil to assess the quality of the oil used. Thereafter was quantified free and immobilized enzyme activity assays prior to esterification, these being carried out from fatty acids obtained Buriti oil in different proportions ethanol, or in different molar ratios under stirring 150 rpm at 37°C for 24 hours. The esterification assays were also performed with the presence of starch as adsorbent or desiccant. Being given the acidity of the initial reaction medium and end to find out what the income produced esters. The lipase in free form showed activity of 450,04 U/mL and immobilized form showed activity of 0,56 U/g. The burity oil showed relative density of 0,9213, moisture 0,23 %, acid value of 7,66 mg KOH/g, saponification number of 96,3 mgKOH /g and peroxide index value 12,84 mEq / 1000g , with results as that described in the literature. Yield 87% of fatty acids obtained was obtained. Maximum value conversion occurred in the tests carried out with the immobilized lipase in the ratio 1:1, 73,2% of esters formed in the reaction without desiccant and 80,12% conversion in the reaction medium in the presence of the agent. With the increase in molar ratio, there was a decrease in the esters formed because the increase of the ethanol used which prevents access to the active site fatty acids and remove the protective aqueous layer structure of the enzyme. As well, the starch used to prevent the presence of residual water formed in every molar ratios in the esterification reaction promoted hydrolysis of the esters formed by decreasing the conversion.

Keywords: Lipase; Immobilization; Esterification; Chitosan; Buriti oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	21
Figura 2: Estrutura tridimensional da enzima lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em sua forma aberta (A e C) e fechada (B e D).....	22
Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas.....	23
Figura 4: Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.....	26
Figura 5: Estrutura química da quitosana.....	28
Figura 6: Exemplos de ácidos graxos que ocorrem em óleos vegetais.....	29
Figura 7: Reação de saponificação.....	30
Figura 8: Reação de hidrólise ácida.....	30
Figura 9: Representação da reação de esterificação.....	31
Figura 10: Evidencia a esterificação enzimática.....	33
Figura 11: Ésteres usados como flavorizantes e produzidos a partir de lipases por reação de esterificação.....	34
Figura 12: Amostras analisadas do óleo de buriti juntamente de solução alcoólica de KOH 4% m/v em ultrassom.....	39
Figura 13: Síntese do organo-gel a base de solução de quitosana 5% m/v.....	41
Figura 14: Etapas de imobilização da lipase em organo-gel.....	42
Figura 15: Determinação da atividade de lipase livre e/ou imobilizada e autodegradação do pNPB.....	44
Figura 16: Óleo de buriti em solução de KOH a 10% m/v em balão de fundo redondo, inserido em aparelho de ultrassom.....	45
Figura 17: Separação de fase aquosa da fase de ácidos graxos (sobrenadante) na obtenção de ácidos graxos.....	45
Figura 18: Processamento de obtenção de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti.....	46
Figura 19: Amostras com razão molar ácido/etanol 1:15 com o derivado (A), razão molar 1:20 com derivado em presença do amido no meio reacional (B) e amostras em agitador de Kline para rotação na esterificação (C).....	48

Figura 20: Fluxograma referente ao ensaio de obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do óleo de buriti.....	48
Figura 21: Estrutura macroscópica do organo-gel a base de quitosana.....	53
Figura 22: Conversão em ésteres apresentados para cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na ausência de sagu no meio reacional.....	58
Figura 23: Percentual de conversão em ésteres apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na presença de sagu (amido) no meio reacional.....	60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Composição de ácidos graxos no óleo de Buriti..... 35
- Tabela 2:** Rendimento alcançado nos ensaios de extração de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti in natura..... 53
- Tabela 3:** Resultados referentes aos ensaios de esterificação preliminares para razão 1:10. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação..... 54
- Tabela 4:** Ensaio de esterificação com o óleo de buriti para cada razão molar (ácido graxo/etanol). Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação..... 56
- Tabela 5:** Ensaio de esterificação realizados com o óleo de buriti na presença de amido no meio reacional. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AG	Porcentagem de ácidos graxos livres, %
At	Atividade enzimática, U/mL ou U/g
ES	Enzima-substrato
IA	Índice de acidez, mg KOH/g
°INPM	Porcentagem de álcool em massa ou grau alcoólico
IS	Índice de saponificação, mg KOH/g
pNP	p-nitrofenol
pNPB	Butirato de p-nitrofenila
X	Conversão, %
SDS	Dodecilsulfato de sódio
U	Umidade, %

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 Lipases.....	19
3.2 Lipases de <i>Rhizomucor miehei</i>	20
3.3 Imobilização de enzimas.....	22
3.4 Organo-gel.....	25
3.5 Quitosana como suporte.....	27
3.6 Ácidos graxos livres.....	29
3.7 Esterificação.....	30
3.8 Ésteres na indústria farmacêutica.....	34
3.9 Óleo de buriti.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material.....	36
4.1.1 Enzima.....	36
4.1.2 Suporte.....	36
4.1.3 Substratos.....	36
4.1.4 Agente adsorvente.....	36
4.1.5 Reagentes utilizados para análises físico-química do óleo de buriti, tratamento do suporte, obtenção de ácidos graxos livres e esterificação.....	37
4.2 Métodos.....	37
4.2.1. Análise físico-química do óleo de buriti.....	37
4.2.1.1 Densidade relativa.....	37
4.2.1.2 Umidade.....	38
4.2.1.3 Índice de acidez.....	38
4.2.1.4 Índice de saponificação.....	39
4.2.1.5 Índice de peróxido.....	40
4.2.2 Preparo do suporte a base de quitosana.....	40
4.2.3 Imobilização da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em organo-gel.....	41
4.2.4 Determinação da atividade da lipase e autodegradação do substrato.....	42
4.2.5 Produção de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti.....	44
4.2.6 Ensaio preliminares de esterificação.....	46

4.2.7 Ensaio de esterificação utilizando ácidos graxos com a lipase imobilizada.....	47
4.2.8 Índice de acidez e porcentagem de ácidos graxos livres.....	49
4.2.9 Conversão.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Caracterização do óleo de buriti.....	50
5.1.1 Densidade.....	50
5.1.2 Teor de umidade.....	50
5.1.3 Índice de acidez.....	51
5.1.4 Índice de saponificação.....	51
5.1.5 Índice de peróxido.....	51
5.2 Atividade de lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em sua forma livre e em organo-gel.....	52
5.3 Obtenção de ácidos graxos livres do óleo de buriti.....	53
5.4 Ensaio preliminar de esterificação.....	54
5.5 Ensaio de esterificação utilizando ácidos graxos do óleo de buriti com lipase imobilizada.....	55
5.6 Esterificação com a presença de agente dessecante no meio reacional.....	58
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS.....	68
ANEXO A.....	68
ANEXO B.....	69

1. INTRODUÇÃO

As lipases são utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, têxtil, de detergentes, farmacêuticas, agroquímica e oleoquímica (PAULA et al., 2005). Apesar de possuírem excelentes perspectivas como catalisadores, quando utilizadas em sua forma livre apresentam características que limitam a sua utilização em escala industrial em sua forma livre, 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 a enzima está em baixas concentrações no meio, a sua recuperação se torna onerosa 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 (ADRIANO, 2008). Permitindo uma diminuição no custo do processo, devido o biocatalisador poder ser facilmente separado do meio reacional e ser reutilizado em outras reações (LI et al., 2009).

Nesse contexto as lipases (Triacilglicerol éster hidrolases E.C 3.1.1.3) se destacam entre as demais enzimas, por catalisarem a hidrólise de ligações éster presentes e triglicérides/acilglicéris, liberando ácidos graxos, glicerol e água. A reação é reversível, podendo ocorrer em ambientes não aquosos. Além disso, podem catalisar reações de esterificação, epoxidação, aminólise, dentre outras (PAIVA et al., 2000). São originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com a sua procedência (SAXENA et al., 2003). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato e facilidade de produção em escala, fazendo com que as enzimas possam modificar somente um só tipo de substrato dentro de uma mistura complexa de compostos similares e, inclusive, são capazes de diferenciar entre os estereoisômeros de um composto quiral. Se caracterizando como um dos grupos mais utilizados no segmento industrial, como em indústria de alimentos ou farmacêutica na síntese química de substâncias como os ésteres (HASAN et al., 2006; MALDONADO, 2006).

Dessa forma, os ésteres representam uma das mais importantes classes de compostos orgânicos e podem ser sintetizados por vários mecanismos, dentre eles, a reação entre ácido graxo e álcool, denominada esterificação. Possuem diversas aplicações, tais como aromas, biopesticida, biodiesel, cosméticos e medicamentos (CHANG et al., 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 organo-géis, para a formação de ésteres, utilizando alcoóis 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 requerem cofatores (JESUS et al., 1997).

Essa pesquisa estuda a síntese de ésteres por rota enzimática a partir de óleos presentes na região Nordeste, como o óleo de buriti utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada. Buscando, além de promover uma alternativa de aproveitamento de produtos regionais como os suportes de imobilização, óleos, contribuir para a expansão e diversificação da biotecnologia industrial, promovendo a síntese de compostos onerosos como ésteres a partir de matéria-prima de baixo custo, trazendo potenciais benefícios sócio-econômicos 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 esse projeto para o desenvolvimento de mais um polo de pesquisa no tema no nordeste do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Aplicação de catalisador estável de 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 na indústria farmacêutica.

2.2. Objetivos específicos

- Imobilização de lipase de *Rizhomucor miehei*, gerando menores custos industriais;
- Agregar valor a materiais de baixo custo como a quitosana, o amido (sagu);
- Realizar análise físico-química do óleo de buriti;
- Obtenção de ácidos graxos a partir do óleo de buriti para esterificação, por ser um óleo abundante na região Nordeste;
- Comparar aplicação da enzima livre com a imobilizada na produção de ésteres;
- Produzir ésteres que possam ser aplicados na área farmacêutica;
- Avaliar a influência na conversão em ésteres após a adsorção da água residual formada na reação de esterificação com o uso do amido.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Lipases

As lipases apresentam várias propriedades que as tornam atrativas como catalisadores para biotransformações. São catalisadores versáteis, existindo um processo enzimático equivalente para cada tipo de reação orgânica (DALLA-VECHIA et al., 2004). Dessa forma, essas enzimas quando obtidas de micro-organismos podem ser intracelulares ou extracelulares, conforme permaneçam no interior das células, ou seja, são secretadas no meio externo. Sendo originárias de um grande número de bactérias, fungos, plantas e animais, tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência (SAXENA et al., 2003). A sua produção varia com as cepas e é influenciada fortemente pela composição do meio (fontes de nitrogênio e carbono) além de fatores físico-químicos como temperatura, pH e oxigênio dissolvido (COLEN et al., 2006). Estudos de raio-X mostram que as lipases apresentam uma estrutura tridimensional formada por uma tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, que se repete em todas as estruturas. As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disto, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificação, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcóolise) e aminólise em solvente orgânico com alta especificidade (NUERNBERG, 2004).

Essas enzimas possuem aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos, química fina (síntese de ésteres), tratamento de efluentes e farmacêutica (MALDONATO, 2006). A utilização dessas enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos muito próximos aos eficientes processos executados pela natureza. A economia de energia e minimização da degradação térmica são provavelmente as maiores vantagens na substituição de tecnologias químicas atuais pelas biológicas (HASAN et al., 2006).

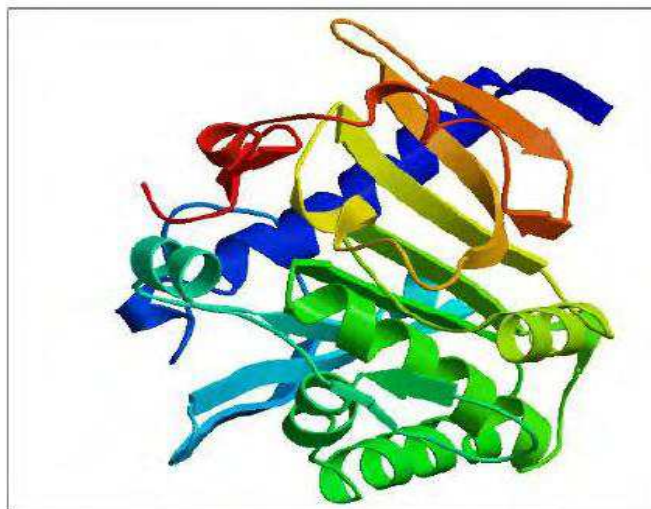
Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes de água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres apresenta-se como uma vertente bastante promissora (CASTRO et al., 2004).

3.2. Lipases de *Rhizomucor miehei*

Lipases de *Rhizomucor miehei* são enzimas extracelulares de origem fúngica, que são comercializadas na forma solúvel (20,000 L) ou na forma imobilizada (Lipozyme RM IM), por fabricantes como a Sigma e a Novozymes (RODRIGUES & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). São constituídas de 269 aminoácidos, com massa molecular de 29 kDa e um ponto isoelétrico de 3,8 (OLIVEIRA, 2012). Seus sítios catalíticos são formados pelos resíduos dos aminoácidos serina 144, histidina 257 e aspartato 203 (BRADY et al., 1990). Estudos têm sido intensificados devido à estabilidade destas enzimas em diversos solventes orgânicos, abrindo inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais. Foi evidenciado que a atuação dessas enzimas em reações de esterificação é promissora na produção de ésteres de interesse comercial na área de solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, indústria farmacêutica, herbicidas e pesticidas (CARVALHO, 2011).

Estudos mostram que 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. Hidrolisam as ligações éster, por meio de uma tríade catalítica, composta por um resíduo de serina (Ser 144) nucleofílico ativado por uma ligação de hidrogênio, em contato permanente com uma histidina (His 257) e um aspartato (Asp 203) (SCHMID & VERGER, 1998). Sendo sua estrutura evidenciada na figura 1.

Figura 1: Estrutura tridimensional da lipase de *Rhizomucor miehei*.

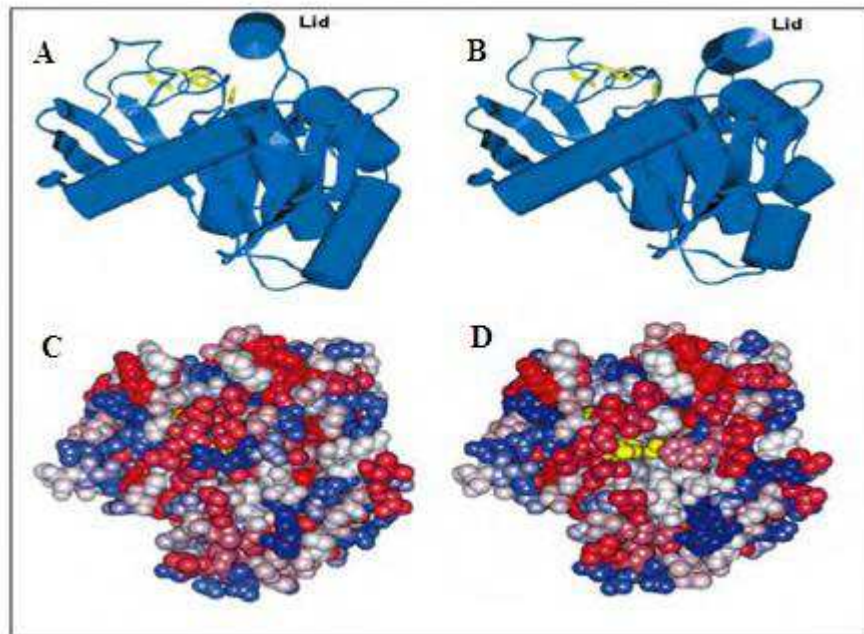


(Fonte: BERGAMASCO, 2013)

Embora sejam solúveis em água, essas enzimas são capazes de catalisar reações envolvendo substratos lipídicos insolúveis na interface óleo-água. Dessa forma As enzimas são caracterizadas por aumentar, drasticamente, sua atividade catalítica quando atua nessa interface. Ocorrendo um fenômeno chamado de “ativação interfacial”. Este aumento na atividade enzimática é desencadeado por rearranjos estruturais na região do sítio ativo da enzima que permite o acesso do substrato à região catalítica. Na ausência da interface óleo/água, o sítio ativo é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*”. Em contrapartida, na presença de substâncias hidrofóbicas, o *lid* é aberto, tornando os sítios ativos acessíveis ao substrato. Esta estrutura consiste em uma sequência de proteínas que recobre o sítio ativo, se movendo em contato com a interface óleo/água (RODRIGUES & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Na Figura 2, 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 ítems 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 2: Estrutura tridimensional da enzima lipase de *Rhizomucor mihei* em sua forma aberta (A e C) e fechada (B e D).



(Fonte: BERGAMASCO, 2013)

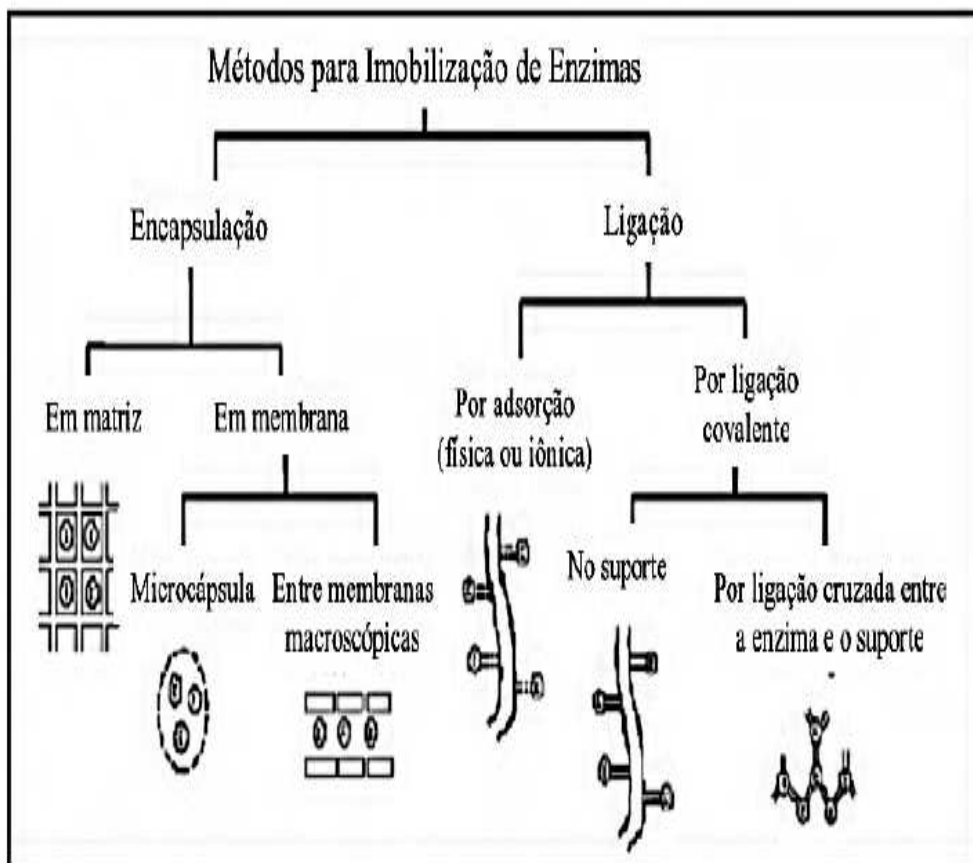
3.3. Imobilização de enzimas

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. Esse processo 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. Podendo ocorrer através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (figura 3). Onde quando imobilizadas retém sua configuração estrutural devido às ligações de hidrogênio que ocorrem na superfície do material. Isto leva a certa dificuldade de vibração da enzima, aumentando assim sua estabilidade térmica (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Dessa forma, as vantagens obtidas pelo processo de imobilização são o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo,

podendo serem 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 (ADRIANO, 2008). 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). Para alcançar bons resultados em um processo de imobilização enzimática é importante conhecer a enzima utilizada, suporte e a metodologia de imobilização (BEZERRA, 2012).

Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas.



(Fonte: DALLA-VECHIA et al., 2004)

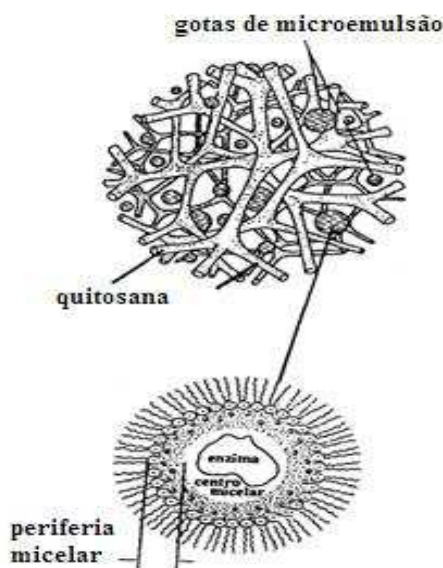
Entre os métodos de imobilização possíveis de serem utilizados, a adsorção física é o método mais simples e também o mais empregado para imobilizar enzimas. Nesse caso, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de Van Der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens que este processo de imobilização oferece são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. A grande desvantagem é a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (HANEFELD et al., 2009; CARDOSO et al., 2009). Outro método de imobilização é a encapsulação, que consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliácridamida, gelatina, quitosona, alginato, carragenana, resinas de poliuretano e silanos. As principais vantagens da encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e à possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa (HANEFELD et al., 2009; CARDOSO et al., 2009). A imobilização através de ligação covalente é baseada na ativação de suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com os grupos nucleofílicos da enzima. Esta técnica não é tão comum como o método de adsorção física, mas apresenta como vantagem evitar o fenômeno de dessorção. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente apresenta mais dificuldades que em outros métodos de ligação em suportes. É necessário conhecer tanto a densidade dos grupos ativos por unidade de área do suporte quanto a sua geometria para reduzir a formação do complexo enzima-suporte inativo. Este método pode também afetar a estrutura ativa da enzima, devido à alteração do centro ativo. Apresentando como principais vantagens a maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos; os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo e leito fluidizado e, a carga de enzima permanece constante após a etapa de imobilização (HANEFELD et al., 2009).

3.4 Organo-gel

Na última década, muitos estudos têm se voltado para a utilização de microemulsões para imobilização de enzimas. Uma microemulsão é uma dispersão isotrópica e opticamente transparente de óleo em água (O/W) ou de água em óleo (W/O), onde a fase oleosa é um solvente orgânico (hexano, heptano). O nome “microemulsão” deriva do fato de que gotas de óleo no sistema (O/W), ou gotas de água no sistema (W/O), possuem um diâmetro que varia de 50 a 500 Å. Como as microemulsões são sistemas organizados, elas são fáceis de serem preparadas. A estabilidade da microemulsão depende da razão da concentração de água pelo surfactante adicionado ao meio. O uso do sistema de organo-gel consiste, portanto em uma nova alternativa para a imobilização de enzimas, e para sua utilização na catálise enzimática em meio orgânico. Neste novo sistema a enzima está localizada no centro micelar (centro aquoso) da microemulsão água /óleo (W/O), eliminando o tradicional problema de estabilizar a enzima contra inativação por um solvente não-aquoso (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração relativa de polímero e água. Vários estudos foram realizados na tentativa de se compreender este novo sistema. A estrutura proposta para o sistema organo-gel ou MBG (do inglês “microemulsion-basedgels”) está representada na figura 4 e consiste de gotas de microemulsão aquosas em equilíbrio com uma estrutura de quitosana (suporte) e água, rodeada pelo surfactante Aerosol-OT (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Figura 4: Modelo proposto para a estrutura do organo-gel.



(Fonte: Adaptado de DALLA-VECCHIA et al., 2004)

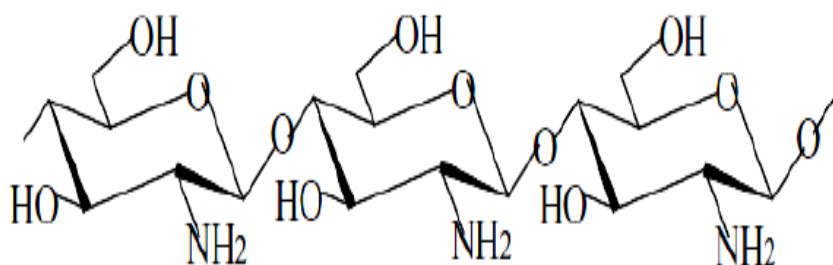
Os organo-géis são sistemas organizados, por isso, fáceis de serem preparados. São obtidos através de um tensoativo em solvente orgânico (hexano, heptano) e uma solução aquosa de um polímero, que pode ser a quitosana. O sistema final é um gel homogêneo, cuja consistência e propriedades físicas dependem da concentração do polímero e água. Portanto, as gotas aquosas do organo-gel encontram-se em equilíbrio com uma estrutura de polímero e da água, rodeada por um tensoativo (JESUS et al., 1997). Estes organo-géis são produzidos a partir da adição de agentes geleificantes, como por exemplo, a gelatina, derivados de celulose ou ágar, alginato de sódio, quitosana, obtendo-se uma matriz adequada para a imobilização de enzimas. O termo "gel" é utilizada para caracterizar os sistemas sólidos ou semi-sólidos consistindo em pelo menos dois componentes. São sistemas condensados composta por um líquido, enquanto que no seu interior ou outro solvente orgânico, moléculas podem ser transferidas (por exemplo, por meio de difusão). Quando o líquido é água, eles são chamados hidrogéis e quando o líquido é um solvente orgânico são chamados organo-géis. Lipases imobilizadas em organo-géis mantém sua atividade catalítica e estabilidade para longos intervalos de tempo. Além disso, na maioria das condições, a matriz de gel retém totalmente o surfactante, polímero, água e enzima, o que permite a difusão de substratos não polares até a enzima no centro micelar com a posterior formação de produtos (ZOUMPANIOTI et al., 2010).

Organo-géis contendo a enzima oferecem muitas vantagens, tais como a capacidade de dispersar o biocatalisador a um nível molecular e incorporar cofator enzimático (FADNAVIS & KOTESHWAR, 1999). No entanto, apresentam inconvenientes, tais como a sua baixa estabilidade térmica e mecânica e a sua baixa resistência em ambiente hidrofílico, o que leva à utilização de outros componentes de biopolímeros como os derivados de celulose (ZOUMPANIOTI et al., 2010).

3.5. Quitosana como suporte

A quitosana (poli-N-acetilglicosamina) é um oligosacarídeo derivado da quitina, polímero mais abundante na natureza depois da celulose, o qual pode ser facilmente obtido de fontes naturais como o rejeito de indústrias pesqueiras, principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos (KUMAR et al., 2000). No caso do Ceará, isto é uma grande vantagem devido à fácil aquisição e a grande atividade pesqueira existente no litoral cearense. Na figura 5 evidencia a estrutura química da quitosana. Esse oligossacarídeo é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo desses resíduos nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH₂) na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH₃⁺, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (MENDES et al., 2011).

Figura 5: Estrutura química da quitosana.



(Fonte: KRAJEWSKA, 2004)

A maioria das indústrias que produzem quitina e quitosana em escala comercial está localizada no Japão, onde mais de 100 bilhões de toneladas de quitosana são manufaturadas por ano, a partir de carapaças de caranguejo e camarão. Nessas indústrias, a quitosana é produzida a partir da quitina por hidrólise alcalina via processo termoquímico, que promove a desacetilação da quitina, normalmente com NaOH (40-50% m/m) a 110-115 °C. 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 toneladas de água para o processo e 0,9 toneladas 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 et al., 2011).

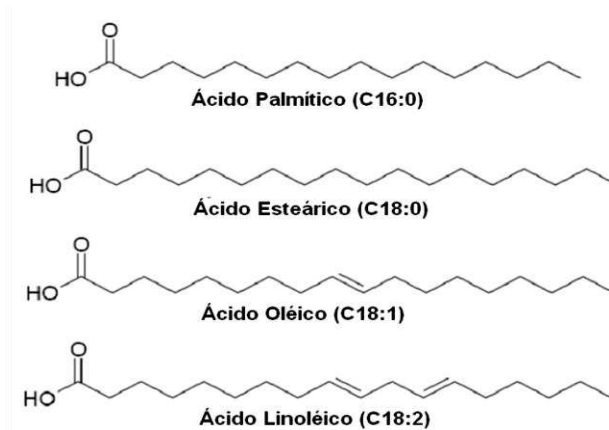
Dentre os diferentes suportes usados na imobilização de enzimas, a quitosana tem sido amplamente empregada devido ao seu baixo custo, atóxico e possuidor de grupos amino primários funcionais em potencial, disponibilidade em grandes quantidades, e possibilidade de aplicação em diversos processos industriais (SANTOS, 2011). Estes polímeros naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradabilidade e biocompatibilidade, porém podem exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos (ADRIANO, 2008). Devido a sua alta percentagem de

nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%), a quitosana é um potente agente geleificante, propriedade que é responsável por muitas aplicações desta em diversos setores de síntese e produção industrial, ou seja, suas propriedades atóxicas e sua fácil formação de géis são de grande interesse industrial (BERGER et al., 2004). O emprego de quitosana como suporte em imobilização de enzimas torna-se uma opção atrativa por apresentar uma maior afinidade por proteínas, por apresentar um maior número de grupos aminos livres reativos em sua molécula (BEZERRA, 2012).

3.6. Ácidos graxos livres

Os ácidos carboxílicos (matéria prima para a esterificação) são substâncias polares, que formam ligações de hidrogênio fortes uns com os outros e com a água. São as unidades fundamentais da maioria dos lipídios (óleos vegetais e gorduras animais). Contudo, eles ocorrem apenas em frações na forma livre (não esterificada), pois os lipídios são ésteres formados a partir de ácidos graxos e glicerol (VISENTAINER & FRANCO, 2006). A elevada presença de ácidos carboxílicos nos óleos vegetais e/ou gorduras animais indica o grau de pureza do lipídeo, ou seja, é uma variável intimamente relacionada com a natureza e qualidade da matéria-prima (MORETTO & FETT, 1989). As diferenças entre os ácidos graxos estão no comprimento da cadeia, no número e na posição de duplas ligações, na cadeia hidrocarbonada e na configuração (cis ou trans). Os ácidos graxos sem duplas ligações são conhecidos como saturados e aqueles que as possuem são chamados de insaturados ou polinsaturados (uma ou mais dupla ligações, respectivamente). Existem diversos ácidos graxos de ocorrência natural, sendo alguns exemplificados na figura 6 (SILVA, 2008).

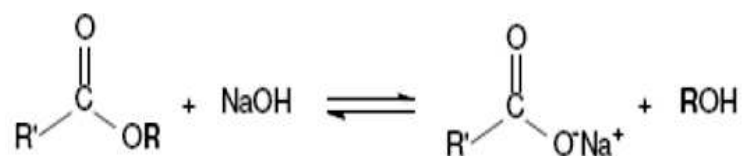
Figura 6: Exemplos de ácidos graxos que ocorrem em óleos vegetais.



(Fonte: SILVA, 2008)

De acordo com Lima (2010), o procedimento de extração de ácidos graxos a partir dos óleos vegetais e gorduras animais divide-se em duas etapas, reação de saponificação seguida de hidrólise ácida. Saponificação é a reação de um triglicerídeo com uma base forte, resultando na produção de sais de ácidos graxos e glicerol (Figura 7). Como esses sais são sabões, a reação é denominada de saponificação.

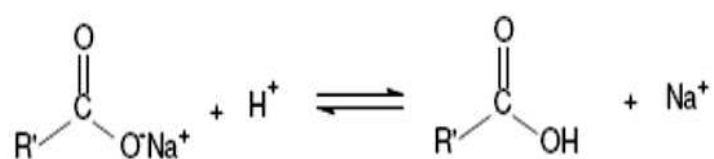
Figura 7: Reação de saponificação.



(Fonte: LIMA, 2010)

Depois de produzidos os sais de ácidos graxos, a adição de um ácido mineral (solução aquosa diluída ou concentrada) é feita ao meio reacional, produzindo, então, os ácidos graxos e um sal, dissolvido no meio aquoso (Figura 8) (LIMA, 2010).

Figura 8: Reação de hidrólise ácida.



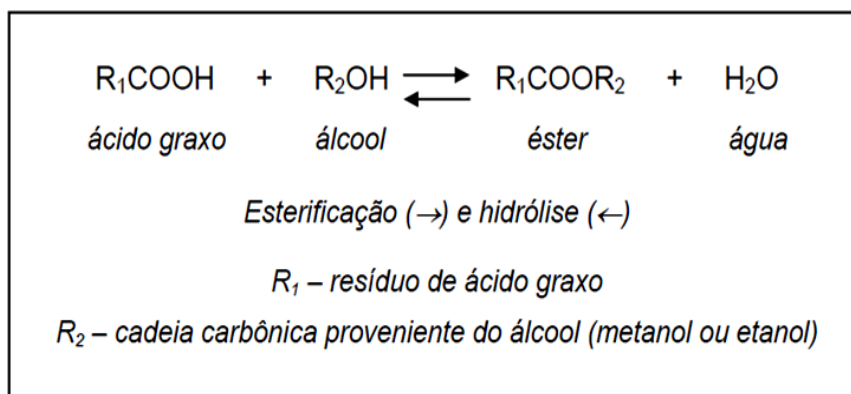
(Fonte: LIMA, 2010)

3.7. Esterificação

Os ésteres de ácidos graxos são compostos orgânicos formados pela reação de um ácido graxo e um álcool, com conseqüente liberação de água. Como apresentado na figura 9, 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 9: Representação da reação de esterificação.



(Fonte: SOUZA, 2008)

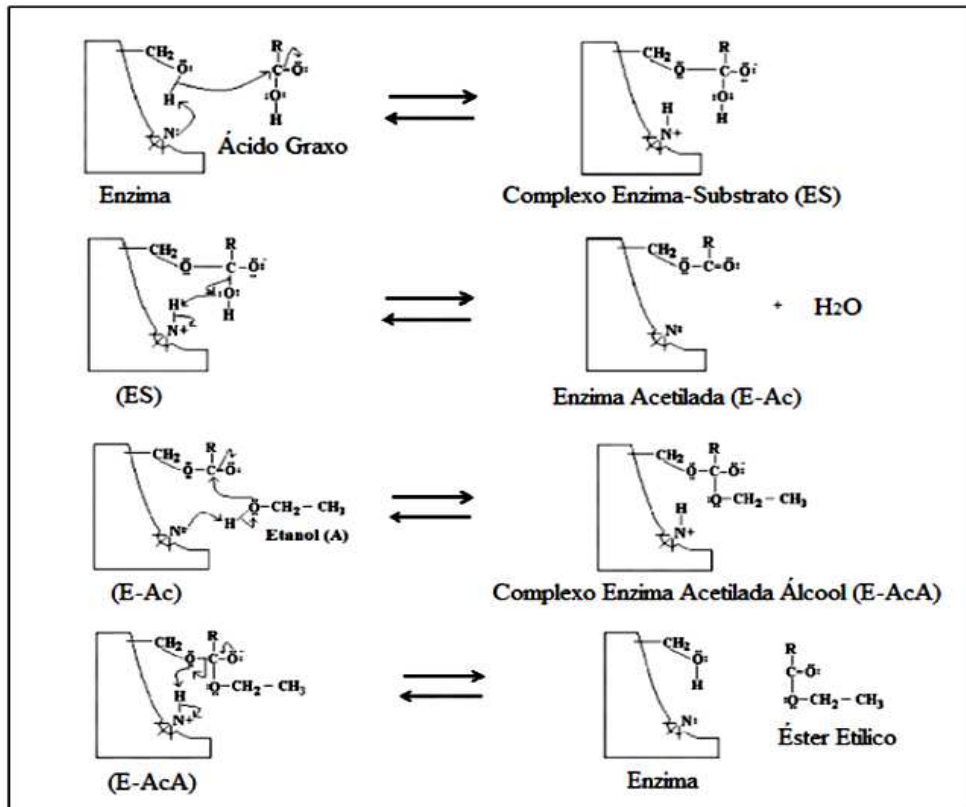
Como alternativa a rota química convencional, processos de conversão enzimática tem sido bem explorados para sintetizar ésteres de ácidos graxos a partir de óleos (WATANABE et al., 2007). Um desses processos consiste na transesterificação, um processo útil, mas que apresenta algumas desvantagens, tais como bloqueio da enzima imobilizada pelo subproduto glicerol e redução da capacidade catalítica pela presença de solvente orgânico, tal como o n-hexano (TAN et al., 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 triglicérido, o rendimento de ácidos graxos livres no final da hidrólise seria reduzido (AKOH et al., 2007).

Estudos recentes revelaram que em reações de esterificação a atividade das lipases está relacionada com os efeitos do microambiente. Sua atividade é atribuída à inacessibilidade do substrato, em vez que a enzima pode sofrer desnaturação. Onde, fatores como a ocorrência de água, que é um forte nucleófilo, não favorece a esterificação (STERGIOU et al., 2013). Dessa forma, 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, 1 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 (CASTRO et al., 2004).

Na esterificação enzimática, inicialmente ocorre uma adição nucleofílica a partir da enzima, para formar o complexo enzima-substrato (ES). O nucleófilo é o oxigênio da hidroxila da enzima, o qual ataca o carbono carbonílico do ácido graxo. Nesse momento, o par de elétrons do grupamento amino da enzima captura o hidrogênio da hidroxila. O par de elétrons do oxigênio do ácido graxo no complexo enzima-substrato captura o hidrogênio do grupamento amino, liberando uma molécula de água (grupo abandonador) e formando um composto intermediário enzima acetilada (E-Ac). Esse composto intermediário sofre o ataque do átomo de oxigênio do álcool, sendo adicionado ao átomo de carbono da carbonila do composto intermediário (E-Ac). Em seguida, o par de elétrons do nitrogênio captura o hidrogênio da hidroxila do álcool, formando o complexo enzima-acetilada-álcool (E-AcA). Finalmente, o próton é transferido do ácido conjugado da amina ($-NH_3^+$) para o átomo de oxigênio do complexo, reconstituindo a enzima e liberando o éster alquílico. Esse processo está apresentado na figura 10 (AL-ZUHAIR et al., 2007).

Figura 10: Evidencia a esterificação enzimática.



(Fonte: AL-ZUHAIR et al., 2007)

A velocidade de formação do éster depende do ácido orgânico e álcool utilizado. 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). 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 ligação do substrato, influencia a taxa de esterificação (STERGIOU et al., 2013).

3.8. Ésteres na indústria farmacêutica

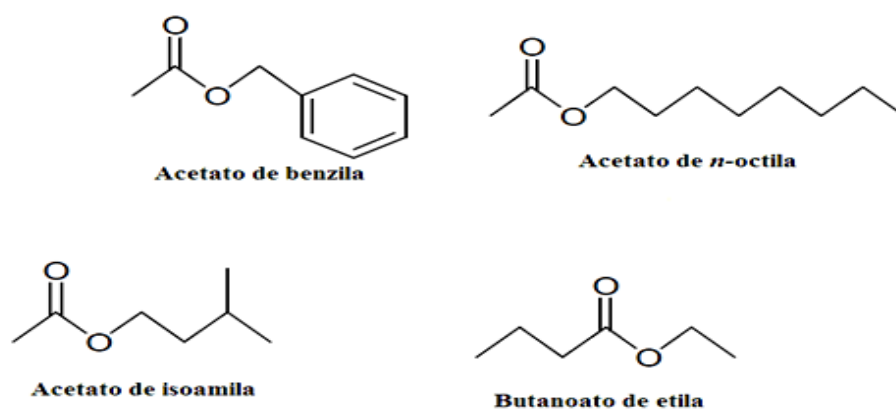
Na indústria de medicamentos, os ésteres obtidos a partir de reações catalisadas por lipases são utilizados como excipientes em medicamentos. Destacando-se como emulsificantes e flavorizantes sendo responsável pelo sabor e aroma usados em medicamentos que apresentam as seguintes formas farmacêuticas: como em xaropes, soluções e suspensões (MENEGATTI, 2001).

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 11.

Dessa forma, o emprego das lipases imobilizadas em reações de esterificações em solventes orgânicos tem sido utilizado para a produção de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta, os quais apresentam aplicação como flavorizante, como a produção de butil acetato (abacaxi) que foi obtido em outro estudo através da lipase produzida por *Rhizopus oryzae*. E a produção de monoacilgliceróis a partir de oleína de palma utilizando lipase obtida por *Pseudomonas* sp, sendo que os monoacilgliceróis são os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (COLLA et al., 2012).

Em trabalho realizado por Lopes (2009), sintetizou o oleato de oleila um éster utilizado como emulsificante e antimicrobiano a partir da lipase de *Rhizopus* sp.

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



(Fonte: GRIZ, 2010)

3.9. Óleo de Buriti

A palmeira buriti, frequente no Cerrado, pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida (Monocotyledonae), ordem Arecales, família Areaceae, espécie *Mauritia flexuosa*. Ela ocorre desde o norte da América do Sul, na região Amazônica e leste Andino, toda região central do Brasil, parte do Nordeste até os estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul; sendo considerada como uma palmeira típica de ecossistemas lacustres como várzeas, veredas e pântanos. Sua distribuição ocorre em altitudes de até 900m, caracterizada como uma espécie dominante (SARAIVA, 2009). O óleo do buriti é basicamente composto de tocoferol, carotenóides e em maiores quantidades de ácidos graxos de cadeia longa, sendo aproximadamente 18% de ácido palmítico (ácido graxo saturado - AGS) e 75% de ácido oleico (ácido graxo monoinsaturado - AGMI). Na tabela 1, são apresentados os principais ácidos graxos presentes nesse óleo seguido de seus percentuais. Devido a análises do espectro de absorção na região do infravermelho ser muito semelhante ao da trioleína, triglicerídeo do ácido oleico; este mesmo autor sugeriu que o óleo de buriti tem potencial para prevenir o colesterol LDL (ALBUQUERQUE, 2003).

Tabela 1: Composição de ácidos graxos no óleo de Buriti.

ÁCIDO GRAXO	PERCENTUAL (%)
Ácido Palmítico	17,3 – 19,2
Ácido Mirístico	0,1
Ácido Esteárico	2,0
Ácido Oleico	73,3 – 78,7
Ácido Linoleico	2,4 – 3,9
Ácido Linolênico	2,2

Fonte: ALBUQUERQUE et al., 2003.

Destaca-se a sua coloração vermelho-alaranjada, devido à presença do alto teor de carotenóides que são os pigmentos responsáveis pela coloração de muitas frutas, folhas e flores, variando a coloração entre amarelo-claro, alaranjado e vermelho. Alguns desses carotenóides, devido ao seu potencial antioxidante, quando consumidos através da alimentação, estão associados à redução de doenças crônico-degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares, outros, após sua conversão no intestino, têm atividade pró-vitamina A. Dentre os carotenóides, destaca-se o β -caroteno, por possuir potencial atividade antioxidante devido ao número de ligações duplas conjugadas, as quais proporcionam à molécula alta reatividade química (AISSA, 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

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. Material

4.1.1. Enzima

Para a imobilização foi utilizada a lipase (E.C 3.1.1.3) de *Rizhomucor 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 buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) obtido em feiras públicas de Picos-PI 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 para análise físico-química do óleo de buriti, tratamento do suporte, obtenção de ácidos graxos livres e esterificação

Éter etílico-etanol (2:1); hidróxido de potássio (KOH) 0,01 M; fenolftaleína 1% m/v; solução alcoólica de KOH 4% e 10% m/v; ácido clorídrico (HCl) 0,5N; solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) neutra; Solução de iodeto de potássio a 5% m/v; iodeto de potássio PA; solução de tiosulfato de sódio 0,1 N; amido solúvel 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. Análise físico-química do óleo de buriti

Os ensaios físico-químicos das amostras do óleo de buriti foram realizados em triplicata. Seguiram a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz, contida na quarta edição do livro Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO et al., 2008). Com exceção do índice de saponificação, determinado por meio de método adaptado utilizando ultrassom e a umidade, sendo ambos determinados segundo métodos da American Oil Chemist Societes (AOCS, 2000).

4.2.1.1. Densidade relativa

Este método determina a razão da massa da amostra em relação à da água por unidade de volume a 25°C e é aplicável a todos os óleos e gorduras líquidas. Essa técnica foi realizada aferindo a massa do picnômetro vazio, com água e com a presença do óleo de buriti. Calculou-se de acordo com a equação 1, onde foi subtraída a massa do picnômetro com a amostra de óleo pela massa do picnômetro vazio e, foi dividido esse valor pela diferença da massa do picnômetro com a água pela massa do picnômetro vazio, que resultou na massa de água. Dessa forma, o valor final é adimensional, pois foi obtido pela razão entre duas massas.

$$\text{densidade} = \frac{A - B}{C} \quad (1)$$

Onde: *A* é a massa do recipiente contendo óleo; *B* é a massa do recipiente vazio; *C* é a massa da água a temperatura de 25°C.

4.2.1.2. Umidade

A determinação da umidade é um dos parâmetros legais para a avaliação da qualidade de óleos. Esse método corresponde a perda em massa da amostra quando aquecida em condições nas quais a água é completamente removida. Foram utilizadas amostras com massa de 2g, colocadas em cápsulas de porcelanas dentro da estufa por 90 minutos a 110°C. Logo em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente, em dessecador, tendo sua massa novamente determinada, até obter uma massa constante. A umidade foi obtida pela Equação 2.

$$X = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde: *X* é a umidade, expressa em %; *M_i* é a massa inicial da amostra, em g; *M_f* é a massa final da amostra, em gramas.

4.2.1.3. Índice de acidez

A realização dessa análise evidencia um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Ocorrendo aceleração da decomposição dos glicerídeos com o aumento da acidez por aquecimento e pela luz, onde a rancidez quase sempre é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (ZENOBON et al., 2008). Esse ensaio definiu-se como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres presentes em dois gramas de amostra. Para esta determinação, dois gramas do óleo foram aferidos em erlenmeyers de 125mL e acrescidos de 25mL de uma solução de éter etílico associado a etanol 2:1 v/v e homogeneizado. Em seguida os ácidos graxos livres foram titulados com solução de hidróxido de potássio 0,01 M que foi previamente padronizada. Onde para a titulação foi usado solução de fenolftaleína 1% m/v como indicador. Com o volume consumido de KOH na titulação, foi realizado o cálculo para ser quantificado o índice

de acidez presente no óleo. Os resultados numéricos obtidos são determinados utilizando-se a fórmula descrita na equação 3.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{v \times f \times 5,61}{M} \quad (3)$$

Onde: v é o volume de KOH 0,01N consumido na neutralização da amostra; f é o fator de correção da solução de KOH; M corresponde a massa da amostra, em gramas.

4.2.1.4. Índice de saponificação

O índice de saponificação é a quantidade de hidróxido de potássio necessária para saponificar um grama de óleo. É inversamente proporcional a massa molecular dos resíduos dos ácidos graxos presentes no óleo e indica o comprimento da cadeia de ácido graxo. Foi determinado utilizando amostras de óleo com 0,5g de massa associado a 20mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) 4% m/v, que foram adicionados a erlenmeyers de 125mL e cobertos com plástico parafilme. Em seguida foram saponificadas em ultrassom com frequência de 40KHz e potência de 160W por 45 minutos e posteriormente tituladas com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,5N, como evidencia a figura 12. Os resultados foram obtidos a partir da equação 4.

Figura 12: Amostras analisadas do óleo de buriti juntamente de solução alcoólica de KOH 4% m/v em ultrassom.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

$$IS = \frac{56,11 \times N \times (B - A)}{M} \quad (4)$$

Onde: *IS* é o índice de saponificação (mg KOH/g amostra); 56,11 é o fator de correção com relação ao KOH; *N* é a normalidade da solução de HCl devidamente padronizada; *B* é o volume de HCl gasto na titulação do branco (mL); *A* é o volume de HCl gasto na titulação do amostra (mL); *M* é a massa da amostra (g).

4.2.1.5. Índice de peróxido

Esta análise evidencia o estado de degradação do óleo, sendo que todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação da gordura. Para realização do método primeiramente foi aferido 5g da amostra de óleo em um frasco erlenmeyer de 125mL. Em seguida acrescentou-se 30mL de solução ácido acético-clorofórmio 3:2 v/v e agitou-se até dissolução completa. Adicionou-se 1g de iodeto de potássio (KI) e foi colocado em banho-maria a uma temperatura de aproximadamente 50°C. Após verteu-se 20mL de solução de iodeto de potássio a 5% m/v com 25mL de água destilada com posterior homogeneização, verteu 0,5 g de amido PA e realizou titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N, com constante agitação, até desaparecimento coloração azul escuro. Para o ensaio foi realizada a preparação de uma prova do branco nas mesmas condições de análise, porém com ausência do óleo de buriti. Os dados referentes a quantificação de peróxido no óleo foram obtidos a partir da equação 5.

$$\text{Índice de Peróxido em mEq/1000g} = \frac{(A - B) \times N \times f \times 1000}{M} \quad (5)$$

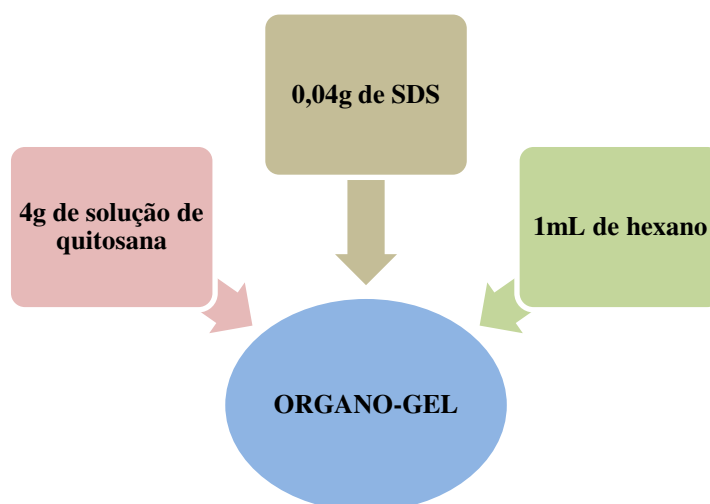
Onde: *A* é o n° de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra; *B* é o n° de mL da solução de tiosulfato de sódio 0,1 gasto na titulação do branco; *N* é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio; *f* é o fator da solução de tiosulfato de sódio; *M* é a massa em g da amostra.

4.2.2. Preparo do suporte a base de quitosana

Para o preparo do suporte, foi utilizada metodologia adaptada de Dalla-vecchia et al.(2004) e Cavalcante (2014). Onde primeiramente foi sintetizada uma solução de quitosana,

partindo de uma solução de acético glacial 5% v/v, ajustando em seguida o seu pH para 5,0. Após, sob agitação, verte-se a quitosana em pó nessa solução de ácido, formando uma solução final de quitosana 5% m/v com ausência de grumos no meio. Com isso, procedeu-se a formação do gel ou microemulsão por meio da solubilização de 0,04g de dodecilsulfato de sódio (SDS) em 1mL de hexano e foi homogeneizado em 4g de solução de quitosana, dessa forma obteve-se o organo-gel. A figura 13 mostra a produção do organo-gel utilizado para imobilização enzimática.

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



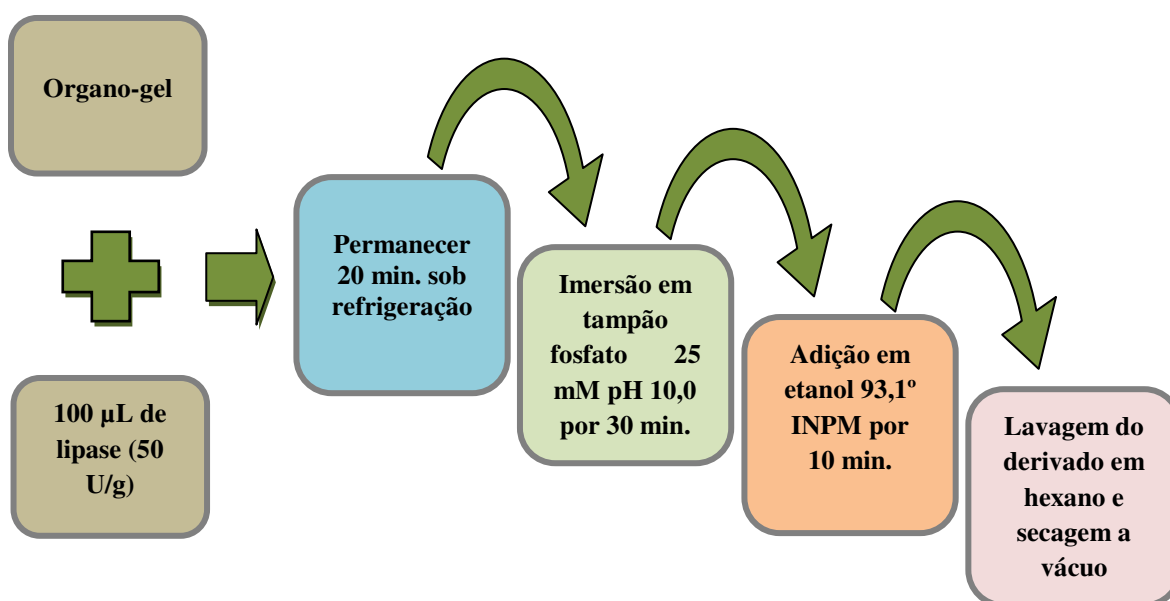
(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

4.2.3. Imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel

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 adicionada ao gel formado, onde o mesmo foi homogeneizado cuidadosamente. Em seguida, o organo-gel com a enzima passou por sucessivas etapas para que o derivado adquirisse consistência e a enzima ficasse imobilizada, ou seja, estável no suporte. Na figura 14 podem-se visualizar etapas de imobilização da lipase no organo-gel a base de quitosana. Primeiramente o gel passou por um período de 20 minutos sob refrigeração, após transcorrer o tempo necessário, o derivado foi imerso em tampão fosfato 25mM pH 10,0 por 30 minutos, para que ocorresse a neutralização do pH e coagulação da quitosana, em seguida o gel foi adicionado por 10 minutos em álcool

etílico, para que o organo-gel ficasse mais consistente. Em seguida, o derivado foi lavado em 3mL de solvente orgânico que é o hexano e filtrado em bomba de vácuo para retirar o excesso do solvente presente no suporte. Feito isso, o derivado estava pronto para aferição da atividade da enzima no gel, bem como para o uso nos ensaios de esterificação.

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



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

4.2.4. Determinação da atividade da lipase e autodegradação do substrato

Para aferir a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei*, foi utilizado meio reacional constituído por solução de butirato de p-nitrofenila (PNPB), sendo essa solução formada por 26µL do substrato que é o PNPB diluído em 10mL de álcool isopropílico, 1mL dessa solução foi adicionada à 29mL de tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0. Dessa forma, formou-se um reator com 30mL de meio reacional, onde foi realizada a atividade enzimática a uma temperatura de 25°C em triplicata, tanto em sua forma solúvel ou livre, bem como imobilizada. A esse meio foi adicionada a enzima livre em uma quantidade de 100µL de solução enzimática (2mL de solução de lipase em tampão fosfato de sódio 25mM pH 7,0, diluição 1:200) para determinar a atividade da enzima na forma livre ou solúvel, ou foi utilizado 0,2 g de suporte com lipase para a determinação da atividade da enzima imobilizada,

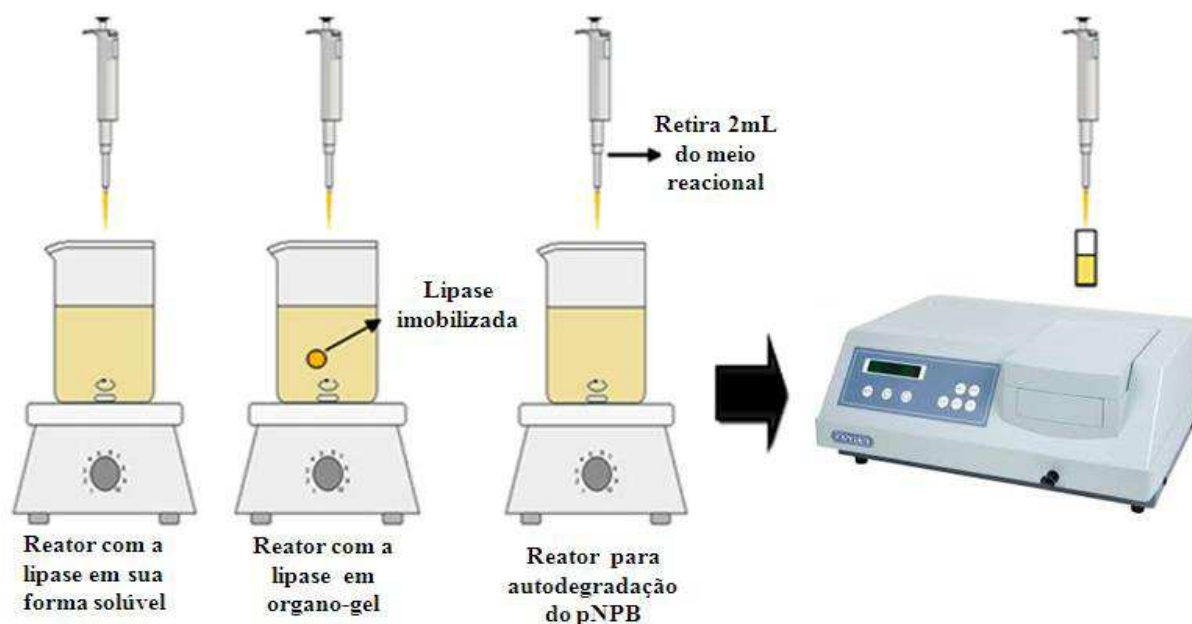
a reação foi acompanhada em espectrofotômetro UV-Vis ($\lambda = 400\text{nm}$) durante 10 minutos sob agitação, sendo medidas as absorvâncias a cada 2 minutos de alíquotas de 2mL, a fim de determinar a hidrólise do substrato pela lipase, que origina produtos como p-nitrofenol (pNP) e o ácido butírico, ou seja 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) (CARNEIRO, 2013; CAVALCANTE, 2014).

Foi realizado o branco da reação que consistiu 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 era hidrolisado pela lipase. Essa análise se procedeu nas mesmas condições da reação para determinação da atividade da lipase livre e imobilizada. Com isso, quatro gráficos lineares foram plotados, três com os dados obtidos no reator com a lipase livre e/ou imobilizada e o outro com as absorvâncias do branco. Com as equações das retas obtidas, foram identificados os valores da tangente para o reator com a enzima livre e/ou derivado e para o branco (autodegradação do substrato) (CARNEIRO, 2013; CAVALCANTE, 2014). Com esses valores calculou-se a atividade da enzima livre e /ou imobilizada por meio da equação 6, sendo em seguida realizada uma média das atividades da enzima livre e /ou imobilizada. Na figura 15 está evidenciado todo o processo de determinação da atividade da enzima solúvel ou livre e imobilizada em suporte, bem como a autodegradação do substrato.

$$At = \frac{(\alpha - \alpha_{\text{branco}}) \times 0,0922 \times V_{\text{reator}}}{V_{\text{enzima}} \text{ (mL) ou } m_{\text{derivado}} \text{ (g)}} \quad (6)$$

Onde: At é a atividade enzimática (U/mL ou U/g), α é a tangente da amostra, α_{branco} 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).

Figura 15: Determinação da atividade da lipase livre e /ou imobilizada e autodegradação do pNPB.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

4.2.5. Produção de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti

Esses ensaios foram realizados segundo metodologia adaptada de Carneiro (2013). Para obtenção dos ácidos graxos livres do óleo, foi necessário realizar a hidrólise do óleo. Dessa forma preparou-se 200mL de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10%, tendo o álcool etílico 93,1° INPM como solvente. Assim, essa solução foi levada juntamente com 30g de óleo de buriti in natura para o banho ultrassônico com frequência de 40KHz e potência de 160W em um balão de fundo redondo por 45 minutos, representado na figura 16. Essa consiste na primeira etapa que é uma reação de saponificação para obtenção de sais de ácidos graxos. A segunda etapa consiste na hidrólise com 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 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 uma hora, 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, representado na figura 17, 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 1 hora, até que ocorresse a evaporação da água presente na reação com os ácidos graxos obtidos, ou seja para que seja retirada a umidade do meio. Na figura 18 são evidenciados a 1ª e 2ª etapa do procedimento de obtenção dos ácidos graxos livres.

Figura 16: Óleo de buriti em solução alcoólica de KOH a 10% m/v em balão de fundo redondo, inserido em aparelho de ultrassom.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

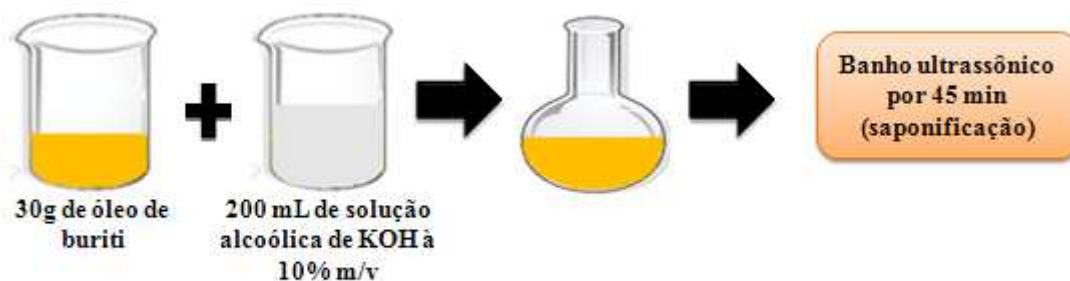
Figura 17: Separação da fase aquosa da fase de ácidos graxos (sobrenadante) na obtenção de ácidos graxos.



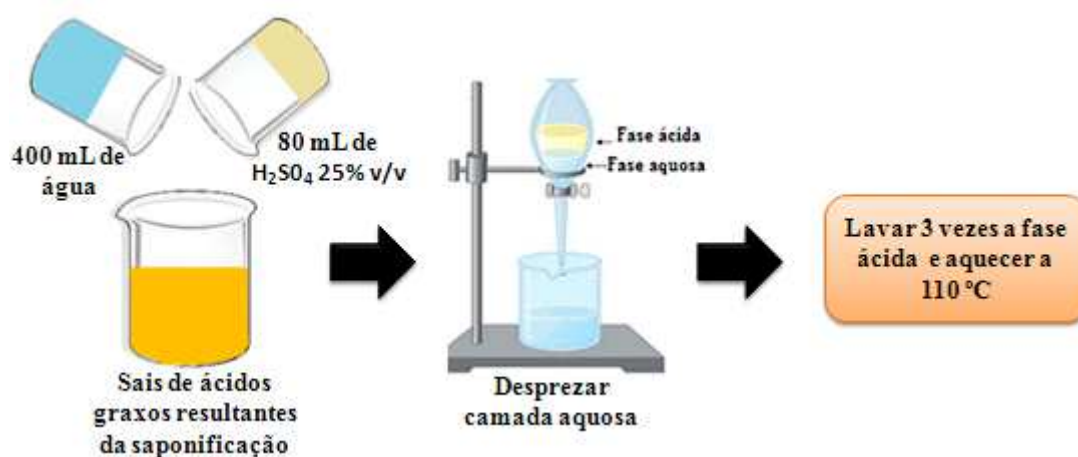
(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

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

1ª ETAPA



2ª ETAPA



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

4.2.6. Ensaio preliminares de esterificação

Esses ensaios de esterificação foram realizados em duplicata segundo metodologia adaptada de Souza (2013) utilizando o óleo in natura de buriti, bem como, com os ácidos graxos obtidos nas mesmas condições dos ensaios que utilizaram derivados, ou seja, as reações se procederam a 37°C sob agitação por 24 horas. Utilizou-se uma razão molar de 1:10 aleatoriamente, ou seja 5g de ácidos graxos ou óleo in natura de buriti para cada 9,30mL de álcool etílico 93,1°INPM, utilizando como catalisador no meio reacional a lipase de *Rhizomucor miehei*, usando uma quantidade de 20µL (450 U/mL) de extrato. Primeiramente, foi realizado ensaio de esterificação com óleo in natura. E dois ensaios com ácidos graxos livres obtidos, sendo um com a presença de amido no meio reacional para adsorver a água formada. Nesses ensaios evidenciou a importância de obter os ácidos graxos livres para poder

resultar em maior conversão de ésteres. Nos ensaios, foi utilizada uma quantidade de 4g de amido. Com isso é possível comparar a diferença da conversão em ésteres utilizando ácidos graxos ou óleo in natura com a presença ou não de amido no meio reacional que adsorve a água residual formada na reação de esterificação. Após o transcorrer da reação as amostras do tempo zero e 24 horas foram tituladas para se determinar os valores ou índices de acidez, porcentagem de ácidos graxos livres (AGL) e conversão das amostras.

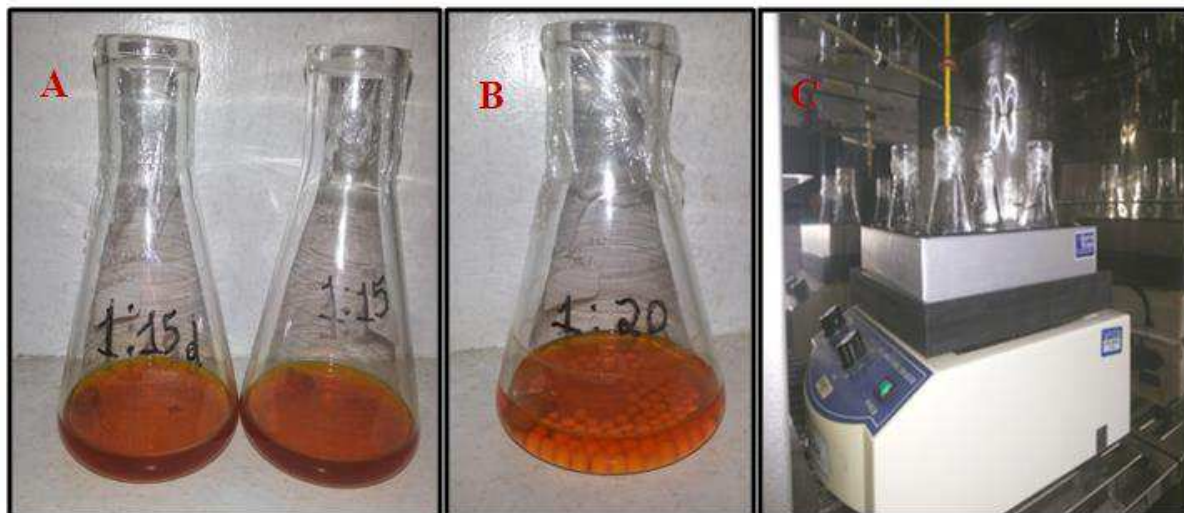
4.2.7. Ensaios de esterificação utilizando ácidos graxos com a lipase imobilizada

Os ensaios foram realizados segundo metodologia adaptada de Souza (2013). Esses testes foram realizados em duplicata, com esses valores obtidos calculava-se a média e o desvio padrão para cada ensaio. O procedimento de esterificação foi realizado utilizando uma quantidade de 5g de ácido graxo livre juntamente com várias quantidades de álcool etílico 93,1° INPM em diferentes proporções ou razões molares ácido/álcool na seguinte ordem: 1:1; 1:5; 1:10; 1:15 e 1:20 respectivamente. Os mesmos ensaios foram realizados novamente utilizando 4g de amido em meio reacional, a fim de ser adsorvida a água formada no meio reacional na reação de esterificação e obter maior conversão, observando a variação da porcentagem de ésteres formados com o uso desse agente adsorvente.

Sabendo a razão utilizada para cada ensaio, primeiramente foram calculados as quantidades respectivas de ácido graxo e etanol que equivale a cada razão molar. Foi adicionada a um erlenmeyer a quantidade necessária de ácido/etanol de acordo com a razão molar, homogeneizando o meio, onde em seguida foi retirada a amostra no tempo zero de aproximadamente 0,5g (incluindo ácido/etanol) para ser posteriormente titulada e quantificada o nível de acidez presente na amostra. Ao ser retirado o tempo zero, adicionou-se ao meio 0,5g de derivado (0,56 U/g), permanecendo sob agitação rotacional de 150 rpm em agitador de Kline em estufa a uma temperatura de 37°C por 24 horas, representado na figura 19. Após ter transcorrido o período da reação, retirou-se uma alíquota em torno de 0,5g do meio, onde essa consistiu na amostra após o transcorrer de 24 horas de reação, como se observa na figura 20, o procedimento de esterificação. Dessa forma, as amostras foram tituladas com hidróxido de sódio (NaOH) 0,0624 M para ver o nível de acidez existente após a reação, pois quanto maior a acidez inicial e menor a acidez final, maior foi a quantidade de ésteres formados. Esses ensaios foram realizados novamente, só que com adição de 4g de amido ao meio reacional. O amido promoveu a adsorção da água presente no meio, por ser higroscópico, favorecendo a formação de ésteres. Por esse motivo o amido foi utilizado nos ensaios. Esse

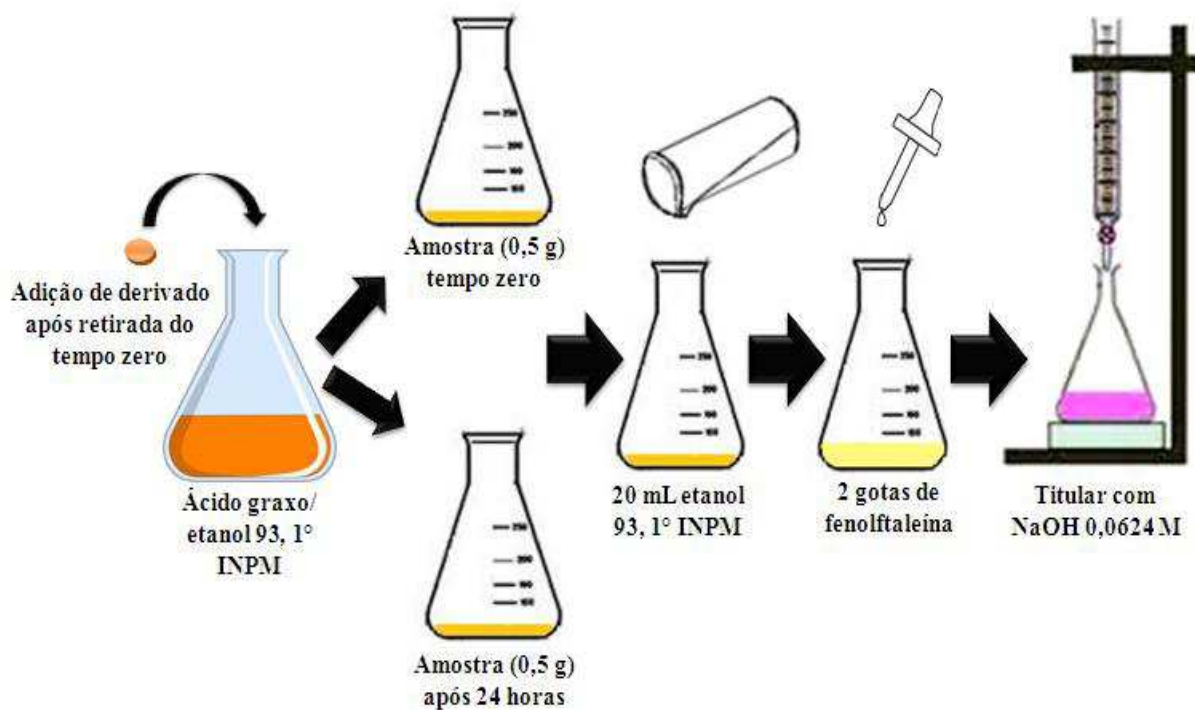
reagente foi adicionado após a retirada da amostra do tempo zero, e antes de ter colocado a enzima imobilizada no meio.

Figura 19: Amostras com razão molar ácido/etanol 1:15 com o derivado (A), razão molar 1:20 com derivado em presença do amido no meio reacional (B) e amostras em agitador de Kline para rotação na esterificação (C).



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

Figura 20: Fluxograma referente ao ensaio de obtenção de ésteres a partir dos ácidos graxos livres do óleo de buriti.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

4.2.8. 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 empregados para determinação do índice de acidez e teor de AGL de óleos e gorduras vegetais. Consiste na utilização de solução de NaOH para titulação do ácido graxo livre na amostra, segundo metodologia adotada por Moreto e Fett (1998). Feito esse procedimento e anotado o volume de NaOH gasto na titulação, o índice de acidez foi determinado de acordo com a equação 7 e os valores de porcentagem de ácidos graxos são calculados conforme a equação 8.

$$IA(\text{mg KOH/g}) = \frac{Vxfx 56,11 xM}{m} \quad (7)$$

$$\% AG(\%) = \frac{Vxfx 28,20 xM}{m} \quad (8)$$

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.

4.2.9. 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 9.

$$X(\%) = \left(\frac{IA_o - IA_f}{IA_o} \right) x 100 \quad (9)$$

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

Nesta seção serão apresentados os resultados e as discussões referentes aos experimentos realizados no estudo. Destacando a análise físico-química do óleo de buriti, os valores referentes à atividade de lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em suporte a base de quitosana, seguido por hidrólise dos triglicerídeos do óleo para obtenção de ácidos graxos livres. Por fim, a aplicação da lipase na forma livre em ensaios preliminares de esterificação.

5.1. Caracterização do óleo de buriti

Foi realizada a caracterização do óleo de buriti in natura, a fim de verificar a sua viabilidade para os ensaios de esterificação, comparando com valores encontrados em outros estudos que realizaram essa caracterização desse óleo. Entre os parâmetros analisados estão a densidade, o teor de umidade, o índice de acidez, índice de saponificação e o índice de peróxido. Os resultados a seguir evidenciam que esse óleo está adequado para ser utilizado nos ensaios de obtenção de ésteres.

5.1.1. Densidade relativa

A densidade determinada para o óleo de buriti a 24°C foi de $0,9213 \pm 0,007$. Em outro trabalho realizado com o mesmo óleo nas mesmas condições em sua forma bruta foi encontrada densidade em picnômetro a uma temperatura de 24°C foi $0,9200 \pm 0,02$. (AQUINO et al., 2012). Estando assim, bem próxima da encontrada nesse estudo.

5.1.2. Teor de umidade

A umidade obtida na pesquisa realizada foi de $0,23 \pm 0,05$ %, sendo calculada a média a partir dos valores obtidos em triplicata para o teor de água. Aroucha et al. (2010) obtiveram a umidade do óleo de buriti referente a $0,49 \pm 0,07$ %. Uma das prováveis causas dos baixos teores de umidade são decorrentes ao processamento da polpa antes de produção do óleo, já que, esse óleo não foi sintetizado durante a pesquisa, onde o excesso de umidade pode interferir nas etapas de hidrólise do óleo para obtenção dos ácidos graxos a fim de realizar a

esterificação. Logo, o ideal para o estudo deve ser um óleo com pequena porcentagem de água em sua composição para se obter uma maior conversão de ácidos graxos livres em ésteres.

5.1.3. Índice de acidez

Em relação ao índice de acidez foi obtido valor médio de $7,66 \pm 0,25$ mg KOH/g. De acordo com Albuquerque e Regiani (2006) o óleo apresentou uma acidez de $7,47 \pm 0,03$ mg KOH/g. O alto índice de acidez pode ser decorrente a vários motivos que podem ter ocorrido como a degradação da polpa do buriti, um reflexo entre o tempo de coleta e o processamento dos frutos para a síntese do óleo.

5.1.4. Índice de saponificação

Esse índice é inversamente proporcional ao massa molecular média dos ácidos graxos dos triglicerídeos presentes no óleo. Ou seja, quanto menor for o massa molecular do ácido graxo, maior será o índice de saponificação. Dessa forma, no estudo foi obtido um valor para índice de saponificação de $96,3 \pm 0,52$ mg KOH/g. Em estudo realizado por Albuquerque e Regiani (2006) foi determinado o índice de saponificação de $90,3 \pm 0,14$ mg KOH/g. Logo, esse valor de índice de saponificação indica que os triglicerídeos do óleo de buriti serão facilmente hidrolisados na etapa de obtenção dos ácidos graxos livres, resultando em um bom rendimento.

5.1.5. Índice de peróxido

Foi encontrado um valor de $12,84 \pm 1,11$ mEq/1000g para o índice de peróxido presente no óleo bruto de buriti. Em trabalho realizado por Aquino et al. (2012), o óleo de buriti apresentou índice de peróxido de $14,82 \pm 0,72$ mEq/1000g, e que esse índice é largamente utilizado para se avaliar o desenvolvimento primário da oxidação lipídica, onde nessa determinação em óleos vegetais torna-se importante à medida que servirá como estimativa do grau de degradabilidade da matéria-prima selecionada. De acordo com Verleyen (2005) estabelece valores de até 15 meq/1000g de peróxido para óleo de buriti em sua forma bruta são aceitáveis, acima desse valor já inicia-se o processo de degradação do óleo.

5.2. Atividade de lipase de *Rhizomucor miehei* em sua forma livre e em organo-gel

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 a base de quitosana com a lipase imobilizada em cada reator utilizado, que foi determinado em triplicata com o auxílio dos valores da autodegradação do pNPB que consistiu no branco da reação para a atividade enzimática. Na figura A1 no anexo A evidenciam-se os comportamentos gráficos das absorvâncias obtidas nos reatores em que foram realizados os ensaios de atividade enzimática, bem como, o gráfico com as absorvâncias referentes ao branco.

Inicialmente foi aferida a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* em sua forma livre ou solúvel, apresentando um valor de $450,04 \pm 1,1$ U/mL de extrato.

A atividade da lipase imobilizada em quitosana 5% m/v foi $0,56 \pm 0,11$ U/g⁻¹ unidades de enzima por grama de suporte. Carneiro (2013) determinou a atividade da lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em quitosana a 5% m/v, obtendo uma atividade 0,88 U/g. Em estudo realizado por Cavalcante (2014) relatou 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 analisado nesse mesmo estudo, como o alginato de sódio juntamente de 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.

O alginato de sódio, por formar organo-gel com estrutura mais rígida que o suporte a base de quitosana, faz com que dificulte a difusão do substrato até a enzima no interior micelar, resultando em uma menor atividade enzimática que o suporte a base de quitosana. Dessa forma, o suporte a base de quitosana se caracteriza como promissor, sendo um dos melhores para imobilização da lipase pelo método encapsulação em matriz polimérica de quitosana com a enzima confinada dentro do centro micelar em organo-gel. Representado na figura 21.

Figura 21: Estrutura macroscópica do organo-gel a base de quitosana.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

5.3. Obtenção dos ácidos graxos livres do óleo de buriti

Na extração dos ácidos graxos livres do óleo in natura de buriti foi obtido o rendimento médio final de $87\% \pm 2,49$. A tabela 2 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 2: Rendimento alcançado nos ensaios de extração de ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti in natura.

Massa óleo in natura(g)	Massa ácido graxo (g)	Rendimento (%)
30,01	25,76	85,84
30,02	24,98	83,21
30,01	26,37	87,84
30,01	26,25	87,47
30,01	26,97	89,87

Fonte: Dados do trabalho, 2015.

A hidrólise alcalina com KOH em ultrassom, como descrito por Lima (2009) é uma técnica que vem sendo utilizada e que tem fornecido resultados satisfatórios no final do procedimento reacional. 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.

5.4. Ensaio preliminares de esterificação

Esses experimentos foram realizados para evidenciar a importância da utilização dos ácidos graxos livres na reação de esterificação, pois, nessa reação para que ocorra é necessária a presença de ácidos graxos livres associados a um álcool, geralmente etanol ou metanol. Logo, nos ensaios foram obtidos maiores valores de conversão para os testes realizados com os ácidos graxos sem o amido e com a presença desse agente adsorvente no meio reacional com 15,72% e 25,17% de ésteres formados respectivamente, após as 24 horas de reação. No ensaio em que utilizou o óleo in natura os valores de conversão foram muito baixos, com 4,83% de percentual de ésteres formados, isso comprova a necessidade da hidrólise do óleo para obtenção de ácidos graxos livres que são essenciais para a reação de esterificação, sendo inviável a utilização do óleo in natura, como descrito por Lima (2010). Dessa forma, o índice entre os ensaios com ácidos graxos livres, o que apresentou maior conversão foi o que utilizou amido no meio reacional, o amido adsorve a água residual formada no meio reacional, fazendo com que sejam evitados o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de hidrólise dos ésteres formados na esterificação (VILLENEUVE, 2000). Na tabela 3 observam-se os valores de conversão obtidos nesses testes, bem como o índice de acidez final e inicial e a porcentagem de ácidos graxos livres finais e iniciais para a razão 1:10, escolhida aleatoriamente para os testes preliminares utilizando como catalisador 20 μ L (450 \pm 1,1 U/mL) lipase na sua forma livre nos ensaios, apenas para comprovação da utilização dos ácidos graxos livres a fim de se obter valores de ésteres consideráveis.

Tabela 3: Resultados referentes aos ensaios de esterificação preliminares para razão 1:10. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação.

Tipo de ensaio	Ia – inicial (mg KOH/g)	Ia – final (mg KOH/g)	% AG (%) – inicial	% AG (%) – final	X (%)
Óleo	4,38 \pm 0,08	4,17 \pm 0,02	2,20 \pm 0,04	2,10 \pm 0,01	4,83 \pm 1,28
Ácido sem amido	45,94 \pm 0,19	38,72 \pm 0,32	23,09 \pm 0,10	19,46 \pm 0,16	15,72 \pm 0,35
Ácido com amido	45,19 \pm 0,35	33,82 \pm 0,12	22,71 \pm 0,18	16,99 \pm 0,06	25,17 \pm 0,85

Fonte: Dados do trabalho, 2015.

5.5. Ensaio de esterificação utilizando ácidos graxos do óleo de Buriti com a lipase imobilizada

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

A síntese de ésteres a partir de ácidos graxos do óleo de buriti utilizando o etanol evidencia a aplicação da lipase imobilizada em um suporte de baixo custo, como a quitosana em um organo-gel, ocorrendo variações das concentrações molares de ácidos graxos e álcool utilizados em cinco razões molares diferentes. Foram analisadas essas razões frente à detecção de qual razão possui maior conversão em ésteres. Dessa forma, na tabela 4, mostra os resultados obtidos nos ensaios de esterificação com os dados obtidos para o 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 analisadas decresceu com o aumento da concentração de álcool etílico utilizado. De acordo com Wu (2003) o suporte no qual a enzima foi imobilizada pode ter adsorvido o etanol, 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 que impede 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 que estava com a menor concentração de etanol apresentou maior acidez inicial, com aproximadamente 98,07 (mg KOH/g) para o óleo de buriti. Na razão 1:5 foi a que apresentou maior acidez final com 50,37 (mg KOH/g). Isso não significa que essa razão apresentou uma baixa conversão, pois a diferença entre a acidez inicial e final não foi a menor entre as amostras, ocorrendo com a razão 1:20, onde a relação nessa razão foi mínima perante os demais ensaios. Com relação ao percentual de ácidos graxos livres na reação, se manteve proporcional ao índice de acidez do meio, as menores razões molares apresentaram os maiores resultados iniciais, em relação aos ácidos graxos livres finais entre as razões variaram conforme o índice de acidez final. Por meio da titulação das amostras foi possível aferir a acidez e constatar a maior conversão foi de 73,20% na razão 1:1 Nas demais razões molares ocorreu uma queda na

conversão de mais de 50% entre as amostras no óleo de buriti. Consequentemente na proporção 1:20 apresentou menor conversão com 21,19%, devido a elevada quantidade de etanol utilizada. O decréscimo na conversão pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração de etanol utilizada nas demais razões ou devido à quantidade de água formada no meio reacional na reação de esterificação. Segundo Oliveira (2004), a concentração de água representa uma provável inativação enzimática, pois a quantidade de água formada na reação de esterificação promove deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação, favorecendo a hidrólise dos ésteres formados. Também afirma que o excesso de etanol nas demais razões molares promove inibição da atividade enzimática desfavorecendo a síntese de ésteres.

Tabela 4: Ensaios de esterificação com o óleo de buriti para cada razão molar (ácido graxo/etanol). Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação.

Razão molar	Ia – inicial (mg KOH/g)	Ia – final (mg KOH/g)	% AG (%) – inicial	% AG (%) – final	X (%)
1:1	98,07 ± 2,25	26,27 ± 0,08	49,29 ± 1,13	13,20 ± 0,04	73,20 ± 0,54
1:5	68,53 ± 0,35	50,37 ± 0,64	34,44 ± 0,18	25,32 ± 0,32	26,50 ± 1,31
1:10	45,05 ± 0,72	28,65 ± 0,23	22,64 ± 0,36	14,40 ± 0,12	36,40 ± 0,50
1:15	35,41 ± 1,01	26,35 ± 0,15	17,80 ± 0,51	13,24 ± 0,08	25,57 ± 1,69
1:20	29,84 ± 0,04	23,51 ± 0,10	14,99 ± 0,02	11,82 ± 0,05	21,19 ± 0,42

Fonte: Dados do trabalho, 2015.

A ocorrência do efeito negativo no aumento da quantidade de álcool presente no meio reacional está de acordo com estudos anteriores disponíveis na literatura (OLIVEIRA et al., 2004). Provavelmente, o excesso de álcool provocou a inativação da enzima, pois esta pode sofrer inibição pelo álcool, de acordo com Wu (2003) o suporte no qual a enzima foi imobilizada pode ter adsorvido o etanol, que é um composto bastante polar, promovendo, devido às elevadas concentrações desse álcool, a formação de uma camada estagnada desse substrato em torno da partícula de enzima imobilizada, impedindo a entrada do ácido graxo ao sítio ativo da enzima e retirando a camada de água que serve como proteção da estrutura da molécula de enzima.

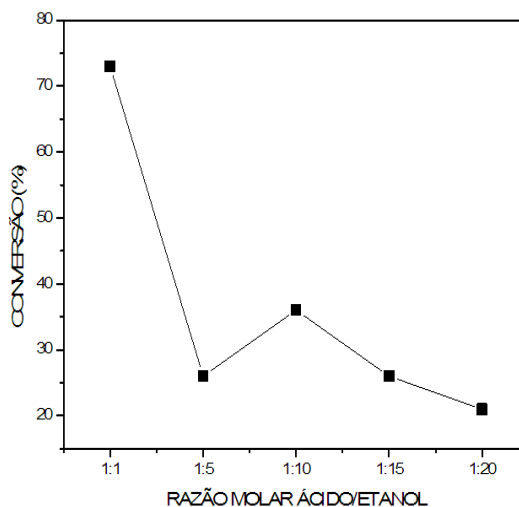
Wang et al. (2007), ao estudarem a produção enzimática de ésteres a partir de óleos residuais ácidos, também observaram que uma quantidade excessiva de álcool diminui a velocidade inicial de reação e tem um efeito negativo na enzima. Esse comportamento das lipases frente ao excesso estequiométrico de álcool pode ser explicado por efeitos inibitórios,

uma vez que, devido à elevada polaridade de álcoois de cadeia curta como o etanol, por exemplo, ao entrar em contato com a enzima o álcool 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.

Carneiro (2013) relatou que lipases de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em quitosana em meio reacional com ácidos graxos do óleo de coco e etanol para a reação de síntese de ésteres, também apresentou na razão 1:1 a maior conversão que foi 51,8%, ocorrendo diminuição da conversão nas demais razões. Segundo Cavalcante (2014), ocorreu o mesmo, obtendo na razão 1:1 o maior valor de conversão que foi de 80% em esterificação utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* com ácido oleico. Na figura 22 observam-se o comportamento gráfico em relação as amostras frente a formação de ésteres entre as razões molares utilizadas nos ensaios de esterificação para o óleo de buriti. Na figura B1 no anexo B 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.

Em trabalho realizado por Nascimento (2013) com a lipase de *Candida antarctica* suportada sobre resina acrílica macroporosa utilizando etanol e ácidos graxos do óleo de macaúba (*Acronomia aculeata*) apresentou maior conversão na razão 6:1 com valores de 96% em ésteres em 48 horas de reação. Em outro estudo feito por Nuernberg (2004) pode-se verificar que em ensaios de esterificação com lipase de *Motot javanicus* imobilizadas em filmes de CMC: PVA, tendo como meio reacional: ácidos carboxílicos saturados (decanóico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico) em n-pentanol, onde, apresentaram como melhor razão molar a 1:1 com 90% de conversão em 24 horas de reação.

Figura 22: Conversão em ésteres apresentadas para cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na ausência de sagu no meio reacional.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

5.6. Esterificação com a presença de agente dessecante no meio reacional

Nos ensaios realizados com o amido no meio reacional que consistiu no agente dessecante utilizado no estudo. Esse agente promoveu aumento da conversão em todas as razões molares analisadas. Assim, pode-se destacar que o amido é importante na síntese de ésteres, pois o mesmo adsorve a água residual do meio reacional, proporcionando um aumento da concentração de ésteres formados. Na razão 1:1 apresentou a menor acidez final e, conseqüentemente, a maior conversão, com valores de 19,62 (mg KOH/g) e 80,12 % respectivamente. A razão 1:20 continuou possuindo a menor conversão, porém também sofreu aumento da formação de ésteres com 27,22%. Logo, foi obtido um aumento razoável, apresentando maior conversão dos produtos formados no meio reacional. O índice de acidez inicial e a porcentagem de ácidos graxos livres iniciais no óleo se mantiveram praticamente idênticos por não terem sofrido alterações, em contrapartida o que foi alterado foi o índice de acidez final e porcentagem de ácidos graxos livres finais que diminuíram, favorecendo a elevação da diferença entre a acidez do meio inicial e final, resultando em maior conversão.

Santos (2011) relatou que na esterificação realizada com o ácido oleico em presença de zeólitas como agente adsorvente da água residual formada no meio reacional apresentou um aumento na conversão 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.

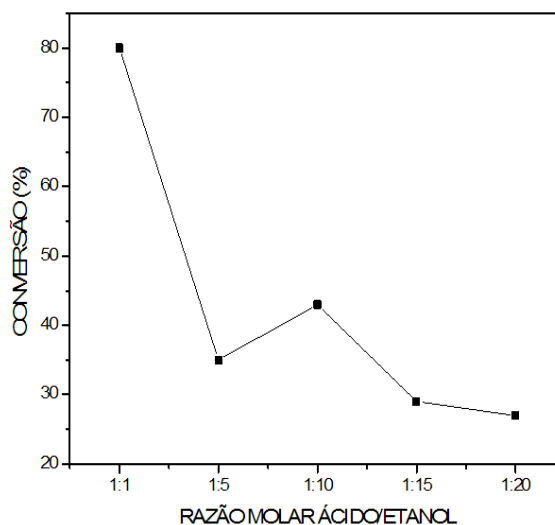
No trabalho realizado por Cavalcante (2014) foi evidenciado que com a utilização de agente dessecante do tipo zeólitas ocorreu uma redução da conversão em todas as razões molares como na razão 1:1 que passou de 80% para 70% em ésteres formados após adição de agente dessecante, dessa forma isso comprova que a quantidade desse agente dessecante utilizado removeu toda a quantidade de água formada no meio reacional, inclusive a concentração de água presente na estrutura da lipase. A quantidade de amido ou agente adsorvente adicionado ao meio reacional tem que ser ideal para que não ocorra diminuição da atividade enzimática, pois a lipase tem que está com a sua estrutura tridimensional ativa, mesmo quando está ligada covalentemente a um suporte sendo necessária uma quantidade mínima de água para isso ocorrer, que não pode ser adsorvida. Logo, 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 (GAO et al., 2006; TRUBIANO et al., 2007). Dessa forma foi utilizada nos ensaios uma quantidade de 4g de amido que não interferiu na atividade enzimática em todas as razões, ou seja, com essa quantidade utilizada promoveu aumento da conversão nos ensaios com o óleo de buriti. Na tabela 5, podemos observar a média obtida entre os ensaios realizados em duplicata, bem como o desvio padrão entre as amostras, onde o desvio se manteve baixo em praticamente todos os ensaios, mostrando a confiabilidade nos testes realizados. Em seguida, na figura 23, foi evidenciado 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. Na figura B2 no anexo B 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 5: Ensaios de esterificação realizados com o óleo de buriti na presença de amido no meio reacional. Sendo: Ia (índice de acidez), % AG (porcentagem de ácidos graxos livres) e X (conversão). Procederam-se com duração de 24 horas a 37°C sob agitação.

Razão molar	Ia – inicial (mg KOH/g)	Ia – final (mg KOH/g)	% AG (%) – inicial	% AG (%) – final	X (%)
1:1	98,69 ± 0,39	19,62 ± 0,50	49,60 ± 0,20	9,86 ± 0,25	80,12 ± 0,59
1:5	67,75 ± 0,41	44,22 ± 2,18	34,05 ± 0,21	22,23 ± 1,10	34,72 ± 3,62
1:10	46,85 ± 0,78	26,60 ± 0,28	23,55 ± 0,39	13,37 ± 0,14	43,22 ± 0,35
1:15	36,22 ± 1,95	25,79 ± 1,20	18,20 ± 0,98	12,96 ± 0,60	28,77 ± 0,54
1:20	29,02 ± 0,21	21,12 ± 0,72	14,59 ± 0,10	10,61 ± 0,36	27,22 ± 2,99

Fonte: Dados do trabalho, 2015.

Figura 23: Percentual de conversão em ésteres apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na presença de sagu (amido) no meio reacional.



(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

Em trabalho realizado por Meng et al. (2011) obteve-se 90% de conversão em ésteres utilizando 9 % (m/v) de peneira molecular (zeólitas) ou agente adsorvente da água residual. Neste estudo, os autores sugeriram que a água possui efeito no equilíbrio da esterificação, gerando hidrólise dos ésteres formados. Contudo, é evidente que a água possui duplo efeito no processo de esterificação: é essencial para a manutenção da conformação da lipase e da sua atividade catalítica e é um produto da esterificação, o qual pode alterar o estado de equilíbrio reacional. Sendo extremamente importante estabelecer a quantidade ideal para que se obtenha o máximo de conversão possível, ou seja, mantendo no meio reacional apenas a água responsável pela atividade enzimática.

6. CONCLUSÕES

Nesse estudo foi realizada a síntese de derivado com estrutura em organo-gel para a imobilização da lipase. A atividade da enzima imobilizada, bem como da enzima livre, foram aferidas, resultando em um suporte promissor. Dessa forma, com a utilização de enzimas imobilizadas o custo da reação de torna menor, pois permite uma fácil separação do catalisador imobilizado do meio reacional, aumentando a resistência mecânica da enzima, gerando menores custos para a indústria. Foram agregados valores a materiais de baixo custo como a quitosana, para a síntese do suporte ou imobilização do catalisador e o amido para adsorver a água residual formada durante a esterificação.

Com o óleo de buriti foi realizada previamente a análise físico-química desse óleo, onde em todos os parâmetros analisados (densidade, umidade, índice de acidez, índice de saponificação e o índice de peróxido) mostraram-se compatíveis com o que estava descrito em outros estudos realizados.

Foram obtidos ácidos graxos livres a partir do óleo de buriti com a utilização de metodologia em ultrassom ocorrendo catálise alcalina, com posterior catálise ácida, onde, o rendimento foi rentável, sendo viável para a esterificação. Dessa forma, nos ensaios de esterificação, em que foi utilizada a enzima livre, observou-se uma menor conversão em comparação aos resultados obtidos de percentuais de ésteres nos ensaios com a enzima imobilizada. Visto que a enzima livre perde atividade, por ocorrerem alterações em seu sítio ativo ou estruturais, ou seja, a enzima irá está desprotegida no meio reacional, podendo sofrer alterações, devido a elevada quantidade de etanol que está entrando em contato com a estrutura enzimática. Entre os ensaios realizados com a lipase em um suporte, a razão molar ácido graxo/etanol ideal é a 1:1, pois apresentou maior conversão, entre as demais, isso devido à menor concentração de etanol utilizado, indicando a não necessidade de um excesso estequiométrico do etanol na reação, tornando o processo enzimático, nesse aspecto, mais vantajoso que a catálise química convencional.

Nos ensaios de esterificação com a presença do amido como agente adsorvente no meio reacional, apresentou maior conversão em todos os ensaios em que foi utilizado. O amido, apesar de ser higroscópico, não apresentou o mesmo poder dessecante que as zeólitas. Entretanto, quantidades maiores devem ser estudadas. Necessita-se aumentar a carga enzimática e estudar as variáveis de reação de produção de ácidos graxos e esterificação. Bem

como devem ser realizadas análises espectroscópicas dos ésteres obtidos, para poderem ser evidenciadas, a composição química dessas substancias e as suas finalidades na indústria farmacêutica.

7. REFERÊNCIAS

- ADRIANO, W. S. **Preparação e Caracterização de Derivados de Enzimas Industriais em Quitosana**. 2008. 161f. Tese - (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- AISSA, A. F. **Avaliação da atividade antimutagênica do beta-carotenomicroencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa**. 2010. 46f. Dissertação - (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP, 2010.
- AKOH, C.C. et al. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8995–9005, 2007.
- ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil. **Vibrational Spectroscopy**. v.33, n.1-2, p.127-131, 2003.
- ALBUQUERQUE, S.R.S.; REGIANI, A.M. **Estudo do fruto do buriti (*Mauritia flexuosa*) para obtenção de óleo e síntese de biodiesel**. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006, São Paulo. Anais do 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2006. v.único.p-.
- AL-ZUHAIR, S. et al. 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.
- AQUINO, J.S. et al. Refining of Buriti Oil (*Mauritia flexuosa*) Originated from the Brazilian Cerrado: Physicochemical, Thermal-Oxidative and Nutritional Implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.23, n. 2, p.212-219, 2012.
- AROUCHA, I. et al. **Estudo da estabilidade oxidativa dos óleos de buriti (*Mauritia flexuosa*) e babaçu (*Orrbignya speciosa*)**. In: V CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 2010, Maceió. Anais do V Congresso de pesquisa e inovação da rede Norte Nordeste de educação tecnológica, 2010. v.único, p.-.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19-34, 2004.
- 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.

BEZERRA, C. S. **Imobilização de β - galactosidase de *Kluyveromyceslactis* em Diferentes Suportes de Ativação.** 2012.111f. Dissertação - Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

BRADY, L. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, p.146-156, 2004.

CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. **Química Nova**, v.32, p.175, 2009.

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.

CARVALHO, N. B. **Produção de ésteres etílicos e emulsificantes utilizando lipase imobilizada em matrizes hidrofóbicas.** 2011. 104 f. Dissertação - (Mestrado Em Engenharia de Processos), Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe, 2011.

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.

CHANG, S.W. et al. Optimal formation of hexyl laurate by lipozyme IM-77 in solvent-free system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7125-7129, 2006.

COLLA, L. M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n.2, p.1-14, 2012.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.881-885, 2006.

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

FADNAVIS, N.W.; KOTESHWAR, K. An unusual reversible sol–gel transition phenomenon in organogels and its application for enzyme immobilization in gelatin membranes. **Biotechnology Progress**, v.15,p. 98-104, 1999.

FIGUEIREDO, F. C.; OLIVEIRA, F. R. C; SANTOS, M. F. S.; SILVA, R. B.; REIS, D. N. S.; SANTOS JUNIOR, J. R. **Estudo da estabilidade do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*).** In: 51º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2011, São Luiz. Anais do 51º Congresso Brasileiro de Química, 2011. v.único, p.-.

GAO, Y. et al. Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media. **Chinese Journal of Biotechninology**, v. 22, p.114-118, 2006.

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

GUBICZA L. et al. Large scale enzymatic production of natural flavour esters organic solvents with continuous water removal. **Journal Biotechnology**, v.84, p.193-196, 2000.

HANEFELD, U.; GARDOSSI, L.; MAGNER, E. **Chemical Society Reviews**, v.38, p.453, 2009.

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

JESUS, P.C. et al. Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova**, v.20, p. 664-672, 1997.

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

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

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.

LOPES, D.B. **Estudo da síntese de ésteres de cera utilizando lipases em diferentes sistemas de reação**. 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MALDONATO, R.R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais**. 2006. 87f. Dissertação de Mestrado. Departamento de engenharia de alimentos, Universidade Federal de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos. Campinas: 2006.

MENG, Y. et al. Two-step synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil catalyzed by *Yarrowia lipolytica* lipase. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p. 6, 2011.

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

MENDES, A.A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n. 5, p. 831-840, 2011.

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

NASCIMENTO, R. F. **Fracionamento e transesterificação do óleo ácido de macaúba para produção sustentável de biodiesel**. 2013. 97f. Dissertação - (Mestrado em Ciências) – Departamento de Tecnologia de Processos Químicos e Tecnológicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

NUERBERG, G.B. **Imobilização de lípases em filmes de poli (álcool vinílico) e carboximetilcelulose**. 2004. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

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.

OLIVEIRA, D. et al. Influência das Variáveis de Processo na Alcoólise Enzimática de Óleo de Mamona. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p.178-182, 2004.

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, A. V.; BARBOSA, C. S. Estudo da influência do solvente carboidrato e ácido graxo na síntese enzimática de ésteres de açúcares. **Química Nova**, v.28, p.792 – 796, 2005.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-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.

SANTOS, F. F. P. **Produção de biodiesel assistida por ultrassom**. 2009. 128f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2009.

SANTOS, J. C. S. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. 2011. 102 f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011. 102 f.

SARAIVA, N. A. **Manejo sustentável e potencial econômico da extração do buriti nos lençóis maranhenses, Brasil**. 2009. 124p. Dissertação - (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável)- Universidade de Brasília- DF, 2009.

SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **Journal Microbiology Methodology**, v.52, p.1-18, 2003.

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

SILVA, T. O. M. **Síntese e caracterização de biocombustíveis obtidos a partir do arroz e seus derivados**. 2008. 85f. Dissertação - (Mestrado em Engenharia de Materiais), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, - RS. 2008.

SOUZA, M.S. **Produção de biodiesel a partir do Destilado de desodorização do óleo de Soja empregando catálise heterogênea.** 2008. 124 f. Dissertação - (Mestrado em Ciências). Departamento de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

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.

STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v.31, p.1846–1859, 2013.

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

TOLLEY, S. et al. A serine protease triad forms the catalytic center of atriacylglycerol lipase. *Nature*, v.343, n.6260, p.767-770, 1990.

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.

VERLEYEN, T.; VAN DYCK, S.; ADAMS, C. A. **Accelerated Stability Tests: Analysis of Lipid Oxidation**, 5ª Ed., AOCS Press: Champaign, 2005.

VILLENEUVE, P. et al. 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.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos graxos em óleos de gorduras: Identificação e quantificação**, São Paulo: Varela, p.14-17, 2006.

WANG, J. et al. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v.3, p.1121-1128, 2007.

WATANABE Y. et al. 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, 2007.

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.

ZENOBON, Odair et al. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4º Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organ gels as matrices for lipase immobilization. **Biotechnology Advances**, v.28, p.395–406, 2010.

ANEXOS

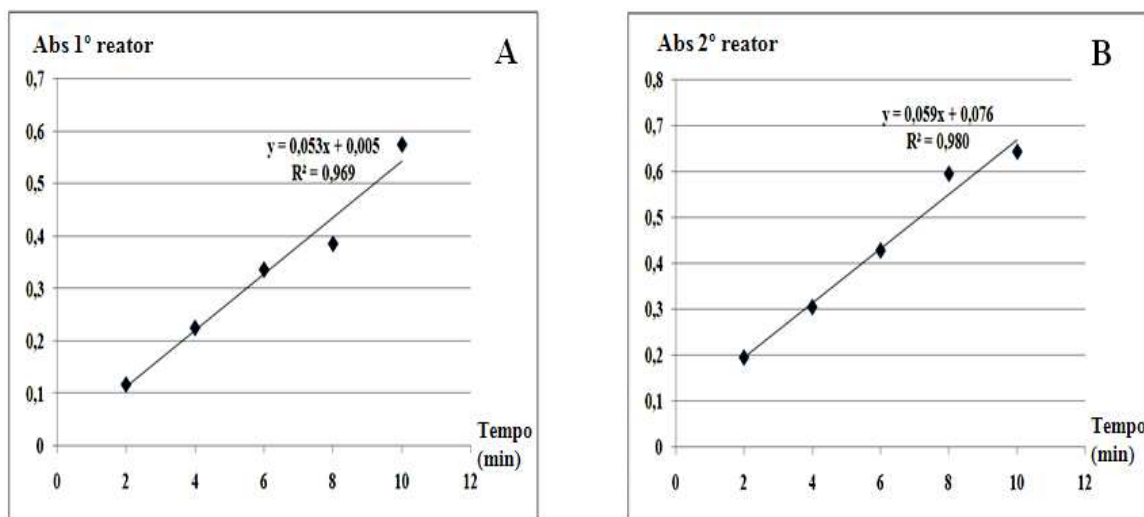
ANEXO A- Valores aferidos para absorvância em cada reator analisado, bem como a autodegradação do substrato (pNPB), com posterior comportamento gráfico dessas absorvâncias obtidas para realização do cálculo da atividade da enzima imobilizada.

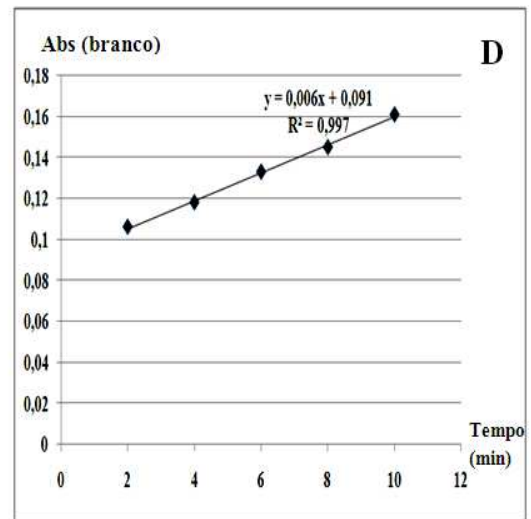
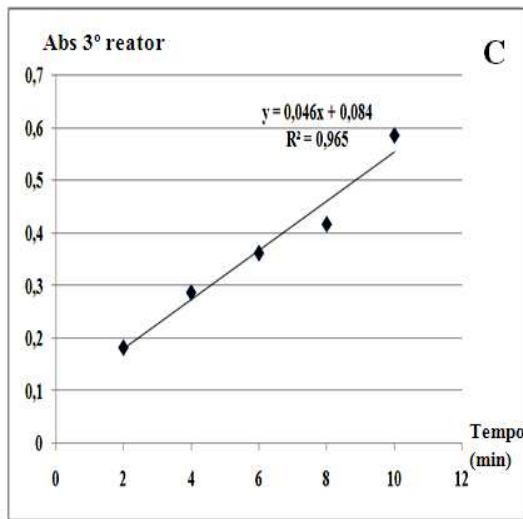
Tabela A1: Valores de absorvância apresentados pelos três reatores utilizados para a determinação de atividade do derivado a base de quitosana seguido da autodegradação do substrato que consistiu no branco para os ensaios.

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: Dados do trabalho, 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).

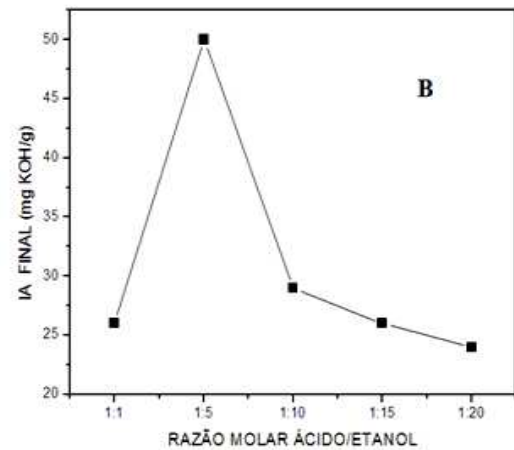
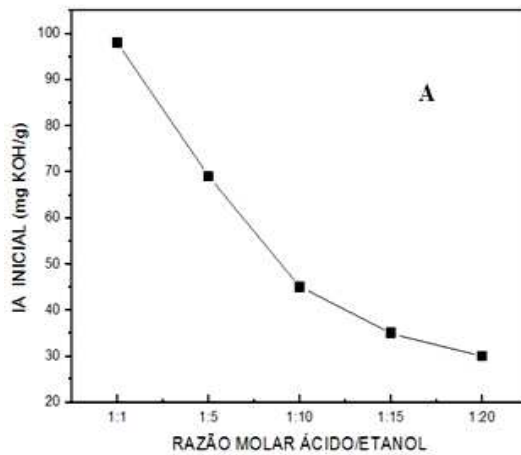


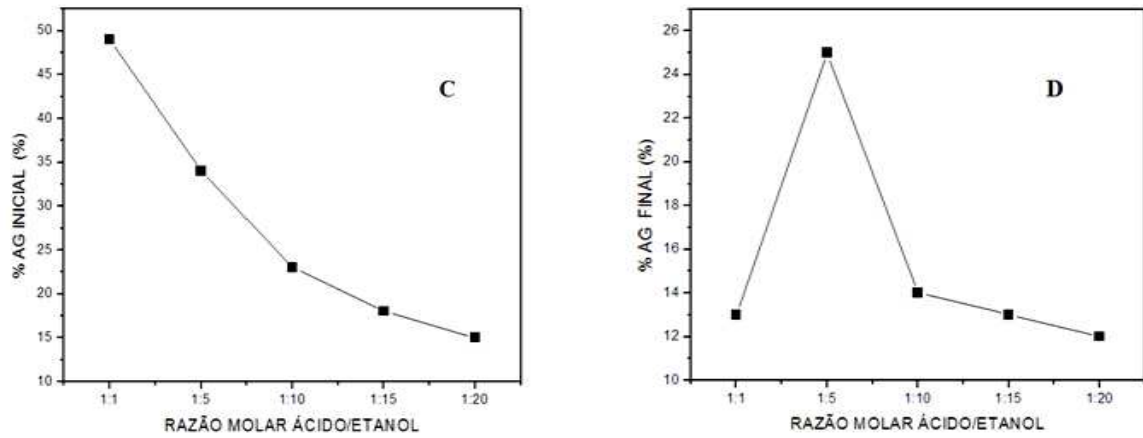


Fonte: Dados do trabalho, 2015.

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.

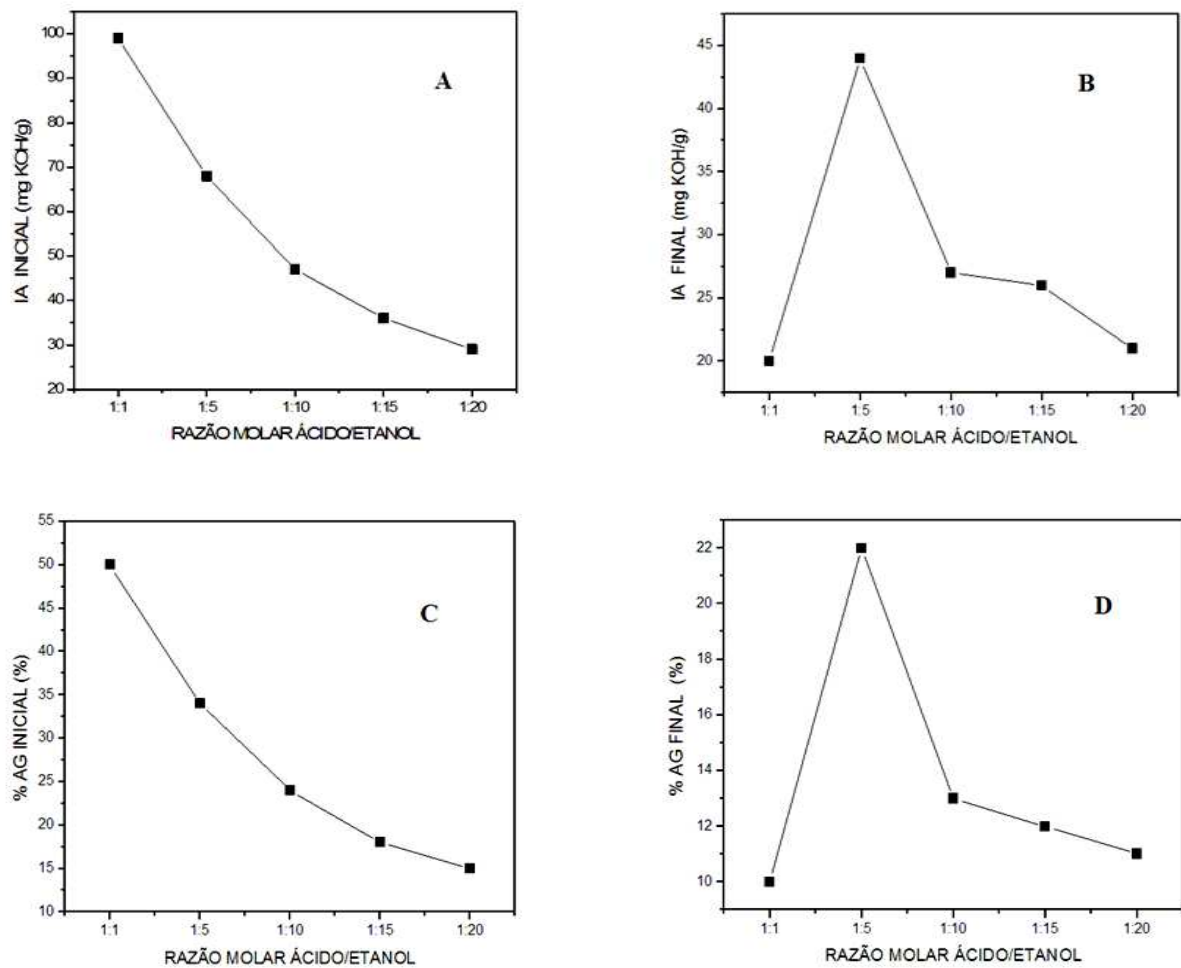
Figura B1: Gráficos referentes ao índice de acidez inicial (A), final (B) e porcentagem de ácidos graxos iniciais (C), finais (D) apresentados em cada ensaio realizado respectivamente com óleo de buriti na ausência de amido no meio reacional.





(Fonte: Dados do trabalho, 2015)

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, 2015)