

KÁTIA RASERA

**UTILIZAÇÃO DE SÓLIDO FERMENTADO OBTIDO A PARTIR DE FUNGOS
DO GÊNERO RHIZOPUS COMO CATALISADOR PARA MODIFICAÇÃO DE
ÓLEOS E GORDURAS**

Curitiba
2012

KÁTIA RASERA

**UTILIZAÇÃO DE SÓLIDO FERMENTADO OBTIDO A PARTIR DE FUNGOS
DO GÊNERO RHIZOPUS COMO CATALISADOR PARA MODIFICAÇÃO DE
ÓLEOS E GORDURAS**

Tese de doutorado encaminhada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
– Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dra. Nadia Krieger

Curitiba
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

KATIA RASERA

Utilização de sólido fermentado obtido a partir de fungos do gênero Rhizopus como catalisador para modificação de óleos e gorduras

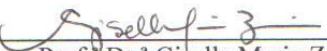
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.

Banca examinadora


Dr.^a Nadia Krieger (orientadora)
Departamento de Química da UFPR


Prof.^a Dr.^a Débora de Oliveira
Departamento de Engenharia Química da UFSC


Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Departamento de Engenharia Química da UFSC


Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin
Departamento de Engenharia Química – UEM


Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Departamento de Bioquímica e Biologia Celular – UFPR

Curitiba, 25 de janeiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Nadia Krieger pela oportunidade e pela orientação neste trabalho.

À CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa de estágio de doutorado no exterior.

À Professora Suzana Ferreira-Dias do Instituto Superior de Agronomia (Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal) pela oportunidade e pela atenção durante meu estágio de doutorado.

Ao Professor David Alexander Mitchell pela orientação e ensinamentos durante o doutorado e estágio de docência.

Aos amigos do laboratório pela ajuda nos experimentos, paciência, pelas conversas e por tudo o que aprendi. À Day e ao Doumit pela ajuda com os delineamentos.

As alunas de iniciação científica Bianca e Alexandra pela ajuda com os experimentos de fermentação.

À equipe da Professora Suzana Ferreira-Dias e ao pessoal do laboratório vizinho, pelas conversas, pela amizade e pelos passeios. À Carla e à Natália pela ajuda nos experimentos.

Ao meu namorado Terêncio por todo apoio e compreensão. Aos meus pais Luiz e Ivete e a minha irmã Karine, que sempre me ajudaram. Ao meu primo Samuel pelas conversas e pelo apoio. Aos meus tios Roberto e Adélia que sempre me esperam com aquele churrasco especial. Aos meus avós que eu amo muito e que sempre me apoiaram, em especial à minha vó Ernesta que sempre diz que “a fila anda...”

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Aos professores Lucimara, Guilherme e Marcelo pelo acompanhamento do

meu trabalho e sugestões.

Aos professores Agenor, Débora, Gisella e Marcelo que aceitaram participar da banca examinadora.

RESUMO

Lipídios estruturados, basicamente compostos por triacilgliceróis (TAG), tem sido sintetizados com a incorporação de novos ácidos no glicerol ou reestruturados para alterar a composição dos ácidos graxos do seu estado natural. Estas gorduras modificadas apresentam alto valor nutricional por apresentarem ácidos essenciais em sua composição ou valor calórico reduzido. Neste trabalho, as lipases de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* foram produzidas por fermentação em estado sólido (bagaço de cana e farinha de semente de girassol). A produção de lipases por *R. oryzae* foi otimizada utilizando um delineamento fatorial 2^3 , tendo como variáveis a umidade, temperatura e concentração de substratos, tornando possível obter atividades de hidrólise de 150 a 380 U por grama de substrato seco em trioleína e tricaprilina respectivamente, e a atividade de esterificação entre o etanol e o ácido oléico de 11 U por grama de substrato seco. Os sólidos fermentados secos foram então utilizados como catalisadores para a produção de lipídios estruturados, obtidos por transesterificação ácida do óleo de oliva extra virgem com o ácido butírico, ácido caprílico e cáprico em meio livre de solvente. Após 24 h de reação, a incorporação observada dos ácidos foi maior com o aumento do comprimento de cadeia carbônica. A reação de transesterificação, utilizando ácido cáprico e o óleo de oliva como substratos, foi otimizada por meio de um delineamento fatorial 2^2 , sendo as melhores condições estabelecidas como 30°C e 55 % (m/m) de ácido cáprico com incorporação de 26 % (m/m) deste ácido. Os sólidos fermentados também foram utilizados para a interesterificação de estearina de palma, óleo de palmiste e um concentrado rico em ácidos graxos ômega-3 (EPAX 4510TG), dando origem a um produto com as características físicas adequadas para a produção de margarinas. As reações foram realizadas em meio livre de solvente, monitorando-se o teor de gordura sólida 35°C (SFC_{35°C}) por ressonância magnética nuclear. As melhores condições estabelecidas foram 65°C, 38 % de estearina de palma e 15 % de EPAX para o sólido fermentado por *R. oryzae*. O produto final apresentou um teor de SFC 35°C DE 2 %. Estes resultados sugerem que o sólido fermentado pode ser utilizado como alternativa de baixo custo às lipases comerciais para a produção de lipídios estruturados.

ABSTRACT

Structured lipids are triacylglycerols that are produced either through the esterification of new fatty acids with glycerol or through the modification of fatty acid composition of natural fats or oils. These modified fats have a high nutritional value because they contain either essential fatty acids or have a reduced calorific value. In the current work the lipases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* were produced in solid-state fermentation using a solid substrate based on a mixture of sugarcane bagasse and sunflower seed meal. The production of lipases by *R. oryzae* was optimized through a 2^3 factorially designed experiment, giving an esterification activity (using ethanol and oleic acid) of 11 U per gram of dry solid and hydrolytic activities of 150 and 380 U per gram of dry solid against triolein and tricaprylin, respectively. The fermented dried solids were used as catalyst to produce structured lipids through the acidolysis of extra virgin olive oil with butyric, caprylic or capric acids in a solvent-free reaction medium. The longer the carbon chain of the fatty acid, the greater the degree of incorporation after a 24 h reaction time. The acidolysis reaction with capric acid and olive oil as substrates was optimized with a 2^2 factorially designed experiment. The best reaction conditions, namely a temperature of 30°C and 55 % (w/w) of the acid, gave 26 % (w/w) incorporation of the capric acid. The fermented solids were also used to catalyze the incorporation of palm stearin, palm oil and a concentrate rich in omega-3 fatty acids (EPAX), producing a final product that was free of trans fatty acids and with appropriate physical characteristics for production of margarines. The reaction were done in a solvent-free medium, with the solid fat content at 35°C (SFC_{35°C}), being monitored during the reaction by nuclear magnetic resonance. The reaction conditions that gave the lowest final SFC_{35 °C} were 65°C, 38 % palm stearin and 15 % EPAX for *R. oryzae* fermented solid. The final product had SFC_{35°C}, value of 2 %. These results suggest that the fermented solid is a potential low cost alternative to commercial lipases for the production of structured lipids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO ÁCIDO CAPRÍLICO (SFA - SATURATED FATTY ACIDS) (A), DO ÁCIDO OLÉICO (MUFA - MONOUNSATURATED FATTY ACIDS) (B) E DO ÁCIDO LINOLÊNICO (PUFA - POLYUNSATURATED FATTY ACIDS) (C)	23
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OLÉICO (C18:1) E ELAÍDICO (C18:1).....	24
FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	26
FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS LINOLÊNICO (A) (C18:3) E LINOLÉICO (C18:2) (B).....	31
FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.....	32
FIGURA 6 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADA POR LIPASES.....	38
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>Rhizopus oryzae</i> MODIFICADA. AS FITAS β ESTÃO REPRESENTADAS COMO SETAS E AS α - HÉLICES EM ESPIRAL. OS RESÍDUOS DA TRIÁDE CATALÍTICA ESTÃO MOSTRADOS EM ROSA E A TAMPA <i>lid</i> EM VERMELHO.....	39
FIGURA 8 - REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICEROL CATALISADAS POR DIFERENTES LIPASES.....	41
FIGURA 9 - CEPA DE <i>Rhizopus sp.</i> CULTIVADO EM PLACA CONTENDO MEIO ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA) (A), MICROGRAFIA ELETRÔNICA VARREDURA DE ESPORÂNGIO DE <i>Rhizopus sp.</i> (B)..	42
FIGURA 10 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.....	52
FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS DE INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA.....	54
FIGURA 12 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA, CATALISADA POR LIPASES.....	58
FIGURA 13 - REATOR UTILIZADO EM REAÇÕES DE INTERESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA.....	70

FIGURA 14 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE <i>P</i> -NITROFENILA POR LIPASE, COM LIBERAÇÃO DE <i>P</i> -NITROFENOL E ÁCIDO PALMÍTICO.....	73
FIGURA 15 - PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES A TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS. “A” CORRESPONDE AO INÍCIO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, “B” E “C” CORRESPONDEM AO PRODUTO FINAL DE REAÇÃO.....	79
FIGURA 16 - PERFIL DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE CONTRA OS SUBSTRATOS TRIBUTIRINA (◆), TRICAPRILINA (■) E TRIOLEÍNA (▲) UTILIZANDO <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 34612 (A) E <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM (B) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	87
FIGURA 17 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> , QUANDO ARMAZENADO À TEMPERATURA DE 4°C (●) E À TEMPERATURA AMBIENTE (▲).....	90
FIGURA 18 - PERFIL DE ATIVIDADES DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DURANTE O CULTIVO DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	91
FIGURA 19 - PERFIL DE ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO DE <i>Rhizopus oryzae</i> EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	92
FIGURA 20 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>Rhizopus oryzae</i> EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, TENDO COMO VARIÁVEL RESPOSTA A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA.....	99
FIGURA 21 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA (A) E TRIOLEÍNA (B) CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i>	101
FIGURA 22 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA CONVERSÃO EM ÉSTER (B) CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i>	102
FIGURA 23 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE PROTEASE CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i>	106
FIGURA 24 - CINÉTICA DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO (●) E CONVERSÃO EM ÉSTER (□), UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO.....	110
FIGURA 25 - CINÉTICA DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE UTILIZANDO TRICAPRILINA (■) E TRIOLEÍNA (▲) COMO SUBSTRATOS E ATIVIDADE DE PROTEASE (○), UTILIZANDO SÓLIDO	

FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO.....	111
FIGURA 26 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO.....	112
FIGURA 27 - CINÉTICA DE INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS PRODUZIDOS POR (●) <i>Rhizopus microsporus</i> (SFRM) E (Δ) <i>Rhizopus oryzae</i> (SFRO).....	114
FIGURA 28 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DURANTE A REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS, CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS POR (▲) <i>Rhizopus microsporus</i> E (Δ) <i>Rhizopus oryzae</i>	115
FIGURA 29 - CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA (SFC _{35°C}) APRESENTADO DURANTE A CINÉTICA DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR <i>Rhizopus oryzae</i> E <i>Rhizopus microsporus</i> NAS MESMAS CONDIÇÕES REACIONAIS, MAS EQUILIBRADOS EM DIFERENTES VALORES DE a_w . ▲ <i>Rhizopus microsporus</i> (a_w 0,5); ● <i>Rhizopus microsporus</i> (a_w 0,7); Δ <i>Rhizopus oryzae</i> (a_w 0,5); ○ <i>Rhizopus oryzae</i> (a_w 0,7).....	119
FIGURA 30 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO QUANTIFICADOS DURANTE A REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR <i>Rhizopus oryzae</i> E <i>Rhizopus microsporus</i> NAS MESMAS CONDIÇÕES REACIONAIS.....	119
FIGURA 31 – EFEITO DA TEMPERATURA E DA MASSA DE SÓLIDO FERMENTADO NO TEOR DE GORDURA SÓLIDA (SFC _{35°C}) DA MISTURA REACIONAL. (■) <i>Rhizopus oryzae</i> 0.1 g; (▒) <i>Rhizopus microsporus</i> 0.1 g; (■) <i>Rhizopus oryzae</i> 0.3 g; (□) <i>Rhizopus microsporus</i> 0.3 g.....	120
FIGURA 32 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (A) E CONTEÚDO FINAL DE GORDURA SÓLIDA A 35 °C (B) E OBTIDOS PARA A GORDURA INTERESTERIFICADA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> . A CONCENTRAÇÃO DE EPAX FOI FIXADO EM 15 %.....	127
FIGURA 33 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE CONTEÚDO DE GORDURASÓLIDA A 35°C, OBTIDOS PARA A GORDURA INTERESTERIFICADA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PS E TEMPERATURA. O VALOR EPAX FOI FIXADO EM 15 %.....	134
FIGURA 34 - ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> . Condições utilizadas: PS 55 %, EPAX 15 % e temperatura de 65°C.....	138

FIGURA 35 - ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> . Condições utilizadas: PS 55 %, EPAX 15 % e temperatura de 65°C.....	138
FIGURA 36 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA CATALISADA POR LIPASES.....	140
FIGURA 37 - INCORPORAÇÃO (%) DOS ÁCIDOS BUTÍRICO (C4:0), CAPRÍLICO (C8:0), CÁPRICO (C10:0) E PALMÍTICO (C16:0) EM ÓLEO DE OLIVA, UTILIZANDO COMO CATALISADORES OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR <i>Rhizopus oryzae</i> (■) E <i>Rhizopus microsporus</i> (■).....	141
FIGURA 38 – EFEITO DA TEMPERATURA NA INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR (■) <i>Rhizopus oryzae</i> E (■) <i>Rhizopus microsporus</i>	143
FIGURA 39 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA OBTIDOS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> . TEMPO DE REAÇÃO: 24 h.....	149
FIGURA 40 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> COMO CATALISADOR DE REAÇÕES ENTRE ÁCIDO CÁPRICO E ÓLEO DE OLIVA.....	151

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS PRESENTES NA DIETA HUMANA.....	22
TABELA 2 -	PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS QUE PODEM SER OBTIDOS A PARTIR DA DIETA.....	25
TABELA 3 -	PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS, n-3 E n-6 PRESENTES EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS.....	27
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO (%) DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM ÓLEOS DE OLIVA.....	28
TABELA 5 -	PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM DIFERENTES POSIÇÕES NO ÓLEO DE SOJA.....	29
TABELA 6 -	PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS E POLIINSATURADOS PRESENTES EM DIFERENTES ÓLEOS DE PEIXE.....	30
TABELA 7 -	CARACTERÍSTICAS DE LIPASES FÚNGICAS DO GÊNERO <i>Rhizopus</i>	44
TABELA 8 -	REAÇÕES DE INTERESTERIFICAÇÃO REALIZADAS UTILIZANDO LIPASES ^(A)	56
TABELA 9 -	COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE OLIVA.....	60
TABELA 10 -	EXEMPLOS DA UTILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA (ACIDÓLISE).....	61
TABELA 11 -	VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³	69
TABELA 12 -	CONDIÇÕES UTILIZADAS NESTE TRABALHO PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³	71
TABELA 13 -	VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAL 2 ²	72
TABELA 14 -	ATIVIDADES ESPECÍFICAS DO EXTRATO BRUTO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 34612 E <i>Rhizopus microsporus</i> CPQBA 312-07 DRM.....	88

TABELA 15 - CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR <i>Rhizopus microsporus</i>	89
TABELA 16 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 34612 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.....	95
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 16).....	98
TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS OBSERVADOS PARA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA E TRIOLEÍNA.....	100
TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBSERVADA PARA CONVERSÃO EM ÉSTER (%).....	100
TABELA 20 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 34612 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS PARA ATIVIDADE DE PROTEASE (U.gSS ⁻¹).....	105
TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA ATIVIDADE DE PROTEASE (U.gSS ⁻¹) (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 20).....	107
TABELA 22 - OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.....	122
TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> : PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 22).....	124
TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> : CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 22).....	125
TABELA 25 - ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (%) PRESENTE NAS REAÇÕES DO PLANEJAMENTO FATORIAL, CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i>	128
TABELA 26 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PRIMÁRIOS (232 nm) E SECUNDÁRIOS (270 nm) QUANTIFICADOS PARA AS REAÇÕES	

	CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i>	129
TABELA 27	- OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.....	131
TABELA 28	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> : PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 27).....	132
TABELA 29	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> : CONTEÚDO FINAL DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 27).....	133
TABELA 30	- ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (%) PRESENTES NAS REAÇÕES DO PLANEJAMENTO FATORIAL CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i>	135
TABELA 31	- OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO DE ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA COMO SUBSTRATOS E CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS POR <i>Rhizopus microsporus</i> E <i>Rhizopus oryzae</i> : VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.....	144
TABELA 32	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus oryzae</i> (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 31).....	146
TABELA 33	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2 ³ PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR <i>Rhizopus microsporus</i> (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 31).....	150

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

a_w	atividade termodinâmica da água
AA	ácido araquidônico
AGL	ácidos graxos livres
ANOVA	análise de variância dos resultados
BDA	ágar batata dextrose
CCD	cromatografia de camada delgada
CEPPA	Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da Universidade Federal do Paraná
CLA	ácido linoléico conjugado
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP
DHA	ácido docosahexanóico
EPA	ácido eicosapentanoico
EPAX 4510TG	triacilglicerol contendo alto teor de ômega-3
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos
FES	fermentação em estado sólido
FFA	ácidos graxos livres
FS	fermentação submersa
LA	ácido linoléico
LNA	ácido linolênico
LT	leucotrienos
LTEB	Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise
MUFA	ácido graxo monoinsaturado
NPDEAS	Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Energia Auto-Sustentável
PG	prostaglandinas
p NPP	Palmitato de p -nitrofenila
PS	estearina de palma
PK	óleo de palmiste
PUFA	ácido graxo poliinsaturado
TAG	triacilgliceróis
RMN	ressonância magnética nuclear
SFA	ácido graxo saturado
SFC	conteúdo de gordura sólida
$SFC_{35^{\circ}C}$	conteúdo de gordura sólida a 35°C
$SFC_{35^{\circ}C}$ (% RED)	porcentagem de redução do conteúdo de gordura sólida a 35°C
SFRM	sólido fermentado por <i>Rhizopus microsporus</i>
SFRO	sólido fermentado por <i>Rhizopus oryzae</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 ÓLEOS E GORDURAS UTILIZADOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	21
2.1.1 Ácidos graxos essenciais e seu papel na dieta humana	30
2.1.2 Metabolismo de lipídios provenientes da dieta	34
2.2 LIPASES: DEFINIÇÃO E PRODUÇÃO	37
2.2.1 Definição, estrutura e mecanismo	37
2.2.2 Classificação de lipases	40
2.2.3 Lipases do gênero <i>Rhizopus</i>	42
2.2.4 Produção de Lipases.....	46
2.2.5 O sólido fermentado contendo atividade lipolítica como catalisador de reações em meios de solventes orgânicos	48
2.3 APLICAÇÕES DE LIPASES EM MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS	50
2.3.1 Reações de Interesterificação	51
2.3.2 Reações de Transesterificação Ácida	57
3 OBJETIVOS	62
3.1 Objetivos Específicos.....	62
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	63
4.1 CULTIVO DE CEPAS LIPOLÍTICAS.....	63
4.1.1 Micro-organismos, Manutenção e Preparo dos Inóculos	63
4.2 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA	64
4.3 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.....	65
4.3.1 Preparo dos substratos	65
4.3.2 Determinação da umidade dos substratos	66
4.3.3 Condições de cultivo para a fermentação em estado sólido	66
4.3.4 Preparo do sólido fermentado para utilização em reações de modificação de óleos e gorduras	67
4.3.5 Otimização do cultivo de <i>Rhizopus oryzae</i> em fermentação em estado sólido.....	67
4.4 APLICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO EM REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DE GORDURAS	68
4.4.1 Reações de Interesterificação	69
4.4.2 Reações de Transesterificação Ácida	71
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	72
4.5.1 Determinação de proteínas	72
4.5.2 Métodos de dosagem da atividade.....	73

4.6 ANÁLISES DOS EXPERIMENTOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS	77
4.6.1 Transesterificação ácida	77
4.6.2 Interesterificação	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR CEPAS DO GÊNERO <i>Rhizopus</i>	83
5.1.1 Ensaios prévios de produção de lipases pelos fungos do gênero <i>Rhizopus</i> em fermentação submersa	84
5.1.2 Produção e caracterização do sólido fermentado por <i>Rhizopus microsporus</i>	88
5.1.3 Otimização do cultivo de <i>Rhizopus oryzae</i> em fermentação no estado sólido	90
5.1.4 Validação dos resultados de otimização da produção de lipases por <i>Rhizopus oryzae</i> por fermentação no estado sólido	109
5.2 ESTUDOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR INTERESTERIFICAÇÃO	112
5.2.1 Ensaios prévios	113
5.2.2 Efeito da temperatura e da massa do biocatalisador	119
5.2.3 Otimização do processo de interesterificação por delineamento fatorial	121
5.2.4 Validação da otimização das reações de interesterificação	139
5.3 ESTUDOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA	140
5.3.1 Otimização das reações de transesterificação ácida por planejamento fatorial	142
5.3.2 Análise Estatística para reações de transesterificação catalisadas pelo sólido fermentado por <i>Rhizopus oryzae</i>	145
5.3.3 Análise Estatística para reações de transesterificação catalisadas pelo sólido fermentado por <i>Rhizopus microsporus</i>	147
5.3.4 Experimentos de reutilização dos sólidos fermentados	150
6 CONCLUSÕES	153
7 TRABALHOS FUTUROS	156
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1 INTRODUÇÃO

Alimentos marinhos, tais como peixes e algas, são considerados alimentos funcionais por apresentarem ácidos graxos da série ômega-3 (n-3) em sua composição [ácido linolênico (LNA, 18:3), ácido docosahexanóico (DHA, 22:6) e ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5)]. Estes ácidos são importantes constituintes de membranas celulares, atuando na prevenção e combate de diversas doenças (SPOLAORE et al., 2005).

O perfil de ácidos graxos ingeridos na dieta humana tem sido alterado ao longo do tempo. As sociedades ocidentais de 100 a 150 anos atrás ingeriam gorduras insaturadas, do tipo n-3 e ômega-6 (n-6) em uma relação de 1:1. Mas, com o passar do tempo, ocorreu uma alteração na proporção relativa de ingestão destes ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) sendo que, atualmente a ingestão de ácidos graxos do tipo n-6 é maior do que n-3, chegando a 20-30:1 (n-6/n-3). Esta alteração deve-se, principalmente, ao aumento de ingestão de óleos vegetais, e à redução da utilização de óleos de peixes na dieta. Atualmente, a recomendação de ingestão diária destes ácidos graxos varia entre 1,1-1,6g/dia de n-3 para 12-17g/dia de n-6, mas uma proposta mais atual, com base na experimentação animal, sugere uma razão de ingestão diária na ordem de 1:1 (n-3/n-6) ou o consumo de no mínimo 0,5g/dia de ácidos graxos n-3 (NAPIER, 2006; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

No organismo humano, os ácidos graxos da série n-3 e n-6 participam da síntese de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos), mensageiros secundários produzidos em quase todas as células, que podem atuar em

processos inflamatórios e na resposta imune. Os ácidos graxos n-3 favorecem a produção de eicosanóides da série ímpar, enquanto n-6 estimulam a produção da série par. Estudos indicam que estas duas séries apresentam funções diferenciadas no organismo. Enquanto prostraglandinas (PG) e leucotrienos (LT) da série par participam da resposta pró-inflamatória, PG e LT da série ímpar são mediadores inflamatórios menos ativos, apresentando características antiinflamatórias. O metabolismo dos ácidos graxos n-3 é diretamente influenciado pela concentração de n-6 e vice-versa, pois os ácidos destas duas famílias competem pelas mesmas enzimas, modulando a síntese de eicosanóides (JAMES et al., 2000).

Óleos de soja, milho e girassol são bastante utilizados na alimentação humana, mas possuem uma elevada concentração de ácidos graxos n-6 e baixa concentração de n-3. Uma composição balanceada entre n-3 e n-6, que favoreça as exigências nutricionais e comerciais, pode ser obtida utilizando processos de transesterificação ou interesterificação enzimática, que promovem a alteração na composição dos triacilgliceróis (TAG). As lipases podem ser utilizadas como catalisadores enzimáticos destas reações, pois a especificidade apresentada por essas enzimas permite a incorporação de ácidos graxos em posições específicas do TAG. Sabe-se que a estrutura e distribuição dos ácidos graxos determinam o metabolismo, a funcionalidade e as características físico-químicas dos óleos e gorduras. O lipídio gerado, conhecido como lipídio estruturado, pode apresentar vantagens nutricionais tais como maior absorção intestinal, favorecida pela presença de ácidos graxos de interesse em quantidade e posição correta dentro do TAG. Os ácidos graxos da série n-3 são encontrados em pequenas

quantidades em alguns óleos vegetais. Os peixes marinhos, principalmente de águas frias, são uma conhecida fonte destes compostos, assim como os óleos de marisco, algas ou microalgas, ricos em DHA e EPA derivados do n-3 (NAPIER, 2006), mas a incorporação direta destes óleos na dieta pode ser comprometida por alguns fatores, como por exemplo, pelo sabor desagradável que eles conferem ao alimento e sua instabilidade oxidativa.

Dentro deste contexto, a proposta geral desse trabalho foi a produção de lipases por cepas conhecidas, caracterizadas como regioespecíficas, que possam ser utilizadas na modificação de óleos vegetais, visando à produção de lipídeos estruturados ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série n-3, por meio de biocatálise.

Inicialmente foi realizada a otimização da produção de lipases por *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 em fermentação sólida logo após, o sólido fermentado obtido e o sólido fermentado por *Rhizopus microsporus* foram utilizados como catalisadores, em reações de transesterificação de óleo de oliva e ácidos graxos livres. Em uma última etapa, foram realizadas reações de interesterificação de óleos e gorduras utilizando os sólidos fermentados com atividade lipolítica como catalisadores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para melhor compreensão da importância da produção de lipídeos estruturados na alimentação humana e do papel das lipases na produção destes compostos, esta revisão está dividida nos seguintes tópicos: (I) óleos e gorduras utilizados na alimentação humana e (II) lipases: definição, produção e suas aplicações na modificação de óleos e gorduras.

2.1 ÓLEOS E GORDURAS UTILIZADOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Os óleos e as gorduras são compostos de estrutura orgânica formados na sua maioria pela união de três ácidos graxos e um glicerol. São indispensáveis na alimentação humana, pois, além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K. Além disso, são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico (LA, 18:2n-6) e linolênico (LNA, 18:3n-3) e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (TRIVEDI e SINGH, 2005; CASTRO et al., 2004). Os principais ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis (TAG) presentes em óleos e gorduras, utilizados para o consumo humano, estão apresentados na Tabela 1.

Os triacilgliceróis presentes na dieta podem conter ácidos graxos saturados (SFA – *Saturated Fatty Acids*), monoinsaturados (MUFA – *Monounsaturated Fatty Acids*) ou poliinsaturados (PUFA – *Polyunsaturated Fatty Acids*), cujas estruturas estão mostradas na Figura 1 (TRIVEDI e SINGH, 2005).

TABELA 1 - PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS E INSATURADOS PRESENTES NA DIETA HUMANA

Ácido	Representação
Butanóico (butírico)	4:0
Hexanóico (capróico)	6:0
Octanóico (caprílico)	8:0
Decanóico (cáprico)	10:0
Dodecanóico (láurico)	12:0
Tetradecanóico (mirístico)	14:0
Hexadecanóico (palmítico)	16:0
Heptadecanóico (margárico)	17:0
Octadecanóico (esteárico)	18:0
Eicosanóico (araquídico)	20:0
9-Hexadecanóico (palmitoléico)	16:1
8-Heptadecanóico (margaroléico)	17:1
9-Octadecanóico (oléico)	18:1
9-Eicosanóico (gadoléico)	20:1
9, 12-Octadecadienóico (linoléico)	18:2
9, 12, 15- Octadecatrienóico (linolênico)	18:3
5, 8, 11, 14-Eicosatetraenóico (araquidônico)	20:4
13-Docosenóico (erúcico)	22:1

FONTE: FENNEMA, 1993.

Segundo Kubow (1996), pesquisas realizadas na década de 80 relacionaram o consumo elevado de ácidos graxos saturados à incidência de doenças cardiovasculares, levando várias organizações governamentais a recomendarem a ingestão de uma quantidade reduzida de gorduras saturadas.

Para se adequar às exigências, a indústria alimentícia passou a utilizar o processo de hidrogenação, que se baseia na adição de átomos de hidrogênio à molécula, convertendo ligações duplas em ligações simples, alterando assim a composição de ácidos graxos saturados e insaturados, passando a utilizá-los em substituição às gorduras saturadas de cadeia longa. Mais tarde, observou-se que a hidrogenação levava à formação de gorduras *trans*, potencialmente mais prejudiciais do que as gorduras saturadas, quando ingeridas em altas quantidades. As gorduras *trans* são compostas por ácidos graxos insaturados que apresentam os grupos substituintes em lados opostos da dupla ligação (Figura 2). A maioria dos ácidos graxos encontrados na natureza apresenta a forma *cis* (RIBEIRO et al., 2007).

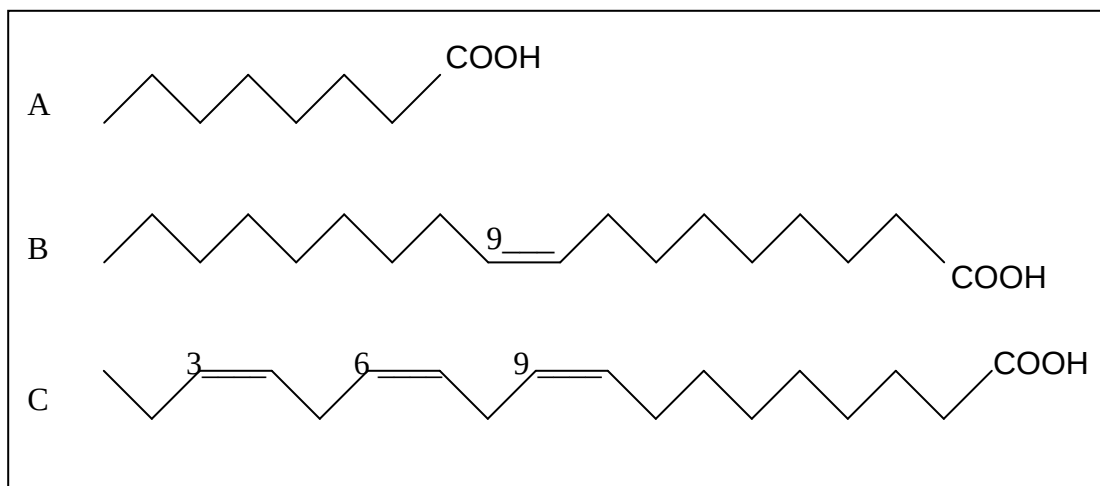


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO ÁCIDO CAPRÍLICO (SFA – ÁCIDO GRAXO SATURADO) (A), DO ÁCIDO OLÉICO (MUFA – ÁCIDO GRAXO MONOINSATURADO) (B) E DO ÁCIDO LINOLÊNICO (PUFA – ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO) (C).

Os ácidos graxos saturados podem apresentar cadeia carbônica curta (até C6), média (C6 – C10) ou longa (acima de C10). Os ácidos graxos de cadeia

média, ao contrário dos ácidos graxos de cadeia longa, são utilizados como fonte rápida de energia. Quando ingeridos, esses ácidos são rapidamente absorvidos pela mucosa intestinal e transportados diretamente para o fígado pelo sistema porta. A função desse sistema, formado pela veia porta hepática e suas ramificações, é receber o sangue proveniente de trato digestivo e transportá-lo para o fígado (MU e POSGAARD, 2005). Por produzirem uma quantidade calórica menor, quando comparados aos ácidos graxos de cadeia longa, os ácidos graxos de cadeia média podem ser utilizados no controle de obesidade e na dificuldade de absorção intestinal (TRIVEDI e SINGH, 2005). Entretanto, a utilização destes ácidos isoladamente para tratamento clínico, por um longo período, causa deficiência de ácidos graxos essenciais (MU e POSGAARD, 2005).

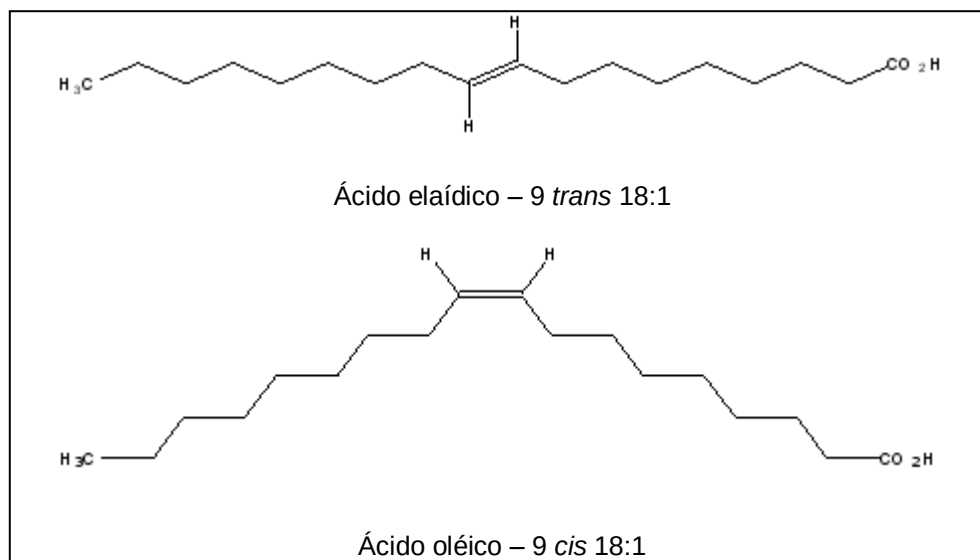


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS OLÉICO (C18:1) E ELAÍDICO (C18:1).

Os MUFAs estão presentes em diferentes concentrações nos vários tipos de óleos e gorduras, não estando implicados em nenhuma doença (TRIVEDI e

SINGH, 2005). Por sua vez, os PUFA's (Tabela 2) são compostos principalmente por ácidos graxos considerados essenciais obtidos a partir da dieta, em especial através do consumo de alimentos de origem marinha como peixes, óleo de peixe ou suplementos derivados de algas (TRIVEDI e SINGH, 2005).

Outro ácido graxo poliinsaturado, formado pela mistura de isômeros do ácido linoléico, foi descoberto na década de 1970 por pesquisadores da Universidade de Wisconsin, em Madison, EUA. O ácido linoléico conjugado (CLA) caracteriza-se por conter ligações *cis* e *trans* em sua estrutura, resultando em uma mistura de isômeros posicionais (Figura 3). Diferentes isômeros de CLA podem ser encontrados em vários alimentos como carnes, leite e derivados, frutos do mar e alguns óleos vegetais como canola, girassol, milho e algodão (CARVALHO et al., 2003; KELLY, 2001; KIM et al., 2001).

TABELA 2 - PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS QUE PODEM SER OBTIDOS A PARTIR DA DIETA.

Ácido	Abreviatura
<i>Família n-3</i>	
9, 12, 15- Octadecatrienóico) (linolênico)	C18:3
5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentanóico (EPA)	C20:5
4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexanóico (DHA)	C22:6
<i>Família n-6</i>	
9, 12-Octadecadienóico (linoléico)	C18:2
5, 8, 11, 14-Eicosatetraenóico (araquidônico)	C20:4

Os isômeros podem ter diferentes atividades biológicas, mas no geral, entre os benefícios à saúde atribuídos ao CLA, destacam-se a proteção contra arteriosclerose (MITCHELL e MCLEOD, 2008), o estímulo ao sistema imunológico, a inibição de radicais livres, atividade anticancerígena (KIM et al., 2001) e proteção contra a obesidade.

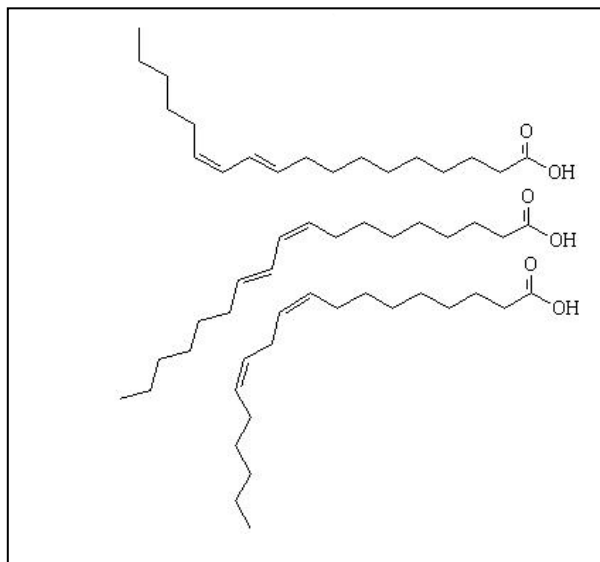


FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.

O ácido linoléico está presente de forma abundante nas sementes de vegetais e nos óleos que elas produzem, como o óleo de milho, canola (proveniente da extração do óleo de colza), soja e girassol (Tabela 4). O ácido linolênico, que também está presente em alguns óleos vegetais, ainda que em menor proporção que o ácido linoléico, é encontrado em castanhas e óleo de canola. Já os óleos de peixe, marisco, algas ou microalgas são ricos em DHA e EPA derivados do n-3 (NAPIER, 2006). Além de PUFA's, os óleos vegetais também apresentam elevada concentração de ácidos graxos saturados, como os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), além de ácidos graxos

monoinsaturados como o ácido oléico (C18:1) e palmitoléico (C16:1). As concentrações de ácido oléico no óleo de oliva e de soja podem variar de 20 a 70 % (Tabela 3).

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS, n-3 E n-6 PRESENTES EM DIFERENTES ÓLEOS VEGETAIS.

Óleos	Ácido graxo saturado	Ácido graxo monoinsaturado	Ácidos graxos poliinsaturados	
			Ácido Linoléico (n-6)	Ácido Linolênico (n-3)
CANOLA	6 %	58 %	26 %	10 %
GIRASSOL	11 %	2 %	69 %	-
MILHO	13 %	25 %	61 %	1 %
OLIVA	14 %	77 %	8 %	<1 %
SOJA	15 %	24 %	54 %	7 %

FONTE: REDA e CARNEIRO (2007).

Entre os óleos de origem vegetal, os óleos de soja (obtido dos grãos da soja - *Glycina maxima*) e de oliva (obtido do fruto da oliveira - *Olea europea*) - são atualmente os mais utilizados na alimentação humana. O óleo de oliva, obtido a partir da moagem e prensagem da azeitona, possui elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 3), sendo classificado em *óleo de oliva virgem* (acidez máxima de 3,3 %), *virgem fino* (acidez máxima de 2 %) e *extra virgem* (acidez máxima de 1 %). A acidez do óleo de oliva é calculada em termos de ácido oléico.

Dabbou et al. (2010) analisaram a composição em ácido graxo de óleos de oliva, obtidos de cinco cultivares diferentes (Tabela 4). Após as análises, verificaram a presença de, aproximadamente 99 % de ácidos graxos de cadeia

longa, principalmente de ácido oléico (75 %) e palmítico (15 %). Em nenhuma das amostras foi verificada a presença de ácidos graxos de cadeia curta.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO (%) DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM ÓLEOS DE OLIVA.

Ácidos graxos	Composição (%)
Palmítico (C16:0)	10 – 15
Palmitoléico (C16:1)	0,7 – 2,7
Margárico (C17:0)	0,05 – 0,1
Margaroléico (C17:1)	0,1 – 0,3
Esteárico (C18:0)	1,5 – 2,5
Oléico (C18:1)	61 – 76
Linoléico (C18:2)	7 – 20
Linolênico (C18:3)	0,7 – 0,8
Gadoléico (C20:1)	0,6 - 1
Araquidônico (C20:4)	0,2 – 0,4

FONTE: DABBOU et al., 2010

Gomez-Rico et al. (2009) observaram uma variação de 59 – 80 % na concentração de ácido oléico presente em duas variedades diferentes de azeitonas, utilizadas para a obtenção de óleo de oliva (*Olea european* var. Morisca e Cornicabra). Também não foi observada a presença de ácidos graxos de cadeias média ou curta.

Em óleos e gorduras naturais, normalmente os ácidos graxos obedecem a certas tendências de distribuição na molécula de glicerol. Ácidos graxos insaturados são encontrados em maiores concentrações na posição *sn* 2,

facilitando o processo de absorção intestinal. O óleo de soja apresenta aproximadamente 70 % de ácidos graxos n-6 (Tabela 5 - C18:2) na posição *sn* 2 (GIOIELLI et al., 2008).

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM DIFERENTES POSIÇÕES NO ÓLEO DE SOJA.

Óleo	posição <i>sn</i>	Ácidos Graxos (%)						
		C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0
Soja	1	13,8	-	5,9	22,9	48,4	9,1	-
	2	0,9	-	0,3	21,5	69,7	7,1	-
	3	13,1	-	5,6	28	45,2	8,4	-
	Total	3,2	-	2,6	29,7	42,7	28,5	-

FONTE: GIOIELLI et al., 2008.

Entre as fontes mais conhecidas de n-3 encontram-se peixes de água fria e seus derivados, principalmente o óleo produzido a partir do pescado. O conteúdo de ácidos graxos presentes no óleo de peixe varia dependendo da espécie analisada, origem do pescado e sua alimentação característica (pode conter altos teores de n-3). Óleo de peixes como sardinha, salmão, atum e fígado de bacalhau destacam-se por apresentarem uma concentração que varia de 15 a 20 % em n-3 (Tabela 6) (KRIS-ETHERTON et al., 2003).

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS, MONOINSATURADOS E POLIINSATURADOS PRESENTES EM DIFERENTES ÓLEOS DE PEIXE.

Óleo de Peixe	Ácidos graxos saturados	Ácidos graxos monoinsaturados	Ácidos graxos poliinsaturados	EPA	DHA
Arenque	19 %	60 %	16 %	7 %	4 %
Atum	26 %	33 %	30 %	6 %	18 %
Fígado de Bacalhau	18 %	51 %	26 %	9 %	10 %
Salmão	24 %	40 %	30 %	9 %	11 %

FONTE: Adaptada de KRIS-ETHERTON et al., 2003.

Segundo Kamal-Eldin e Yanishlieva (2002), uma das principais características que limita a utilização do óleo de peixe é o “flavor” indesejável apresentado pelo produto. Além disso, algumas espécies de peixes podem armazenar quantidades significativas de poluentes como metilmercúrio, a forma mais tóxica do mercúrio e organoclorados. Sua ingestão pode causar distúrbios visuais, perda de audição e distúrbios de mobilidade (KRIS-ETHERTON et al., 2003).

2.1.1 Ácidos graxos essenciais e seu papel na dieta humana

Os ácidos graxos essenciais são ácidos graxos poliinsaturados contendo de 18 a 22 carbonos (CONNOR, 2000). A nomenclatura ÔMEGA (ω ou n) é definida segundo a numeração do carbono associado à primeira dupla ligação (3°, 6° ou 9°) a partir do radical metila (Figura 4) (JANG e YANG, 2008).

Estes ácidos devem ser obtidos a partir da dieta, pois os hepatócitos de mamíferos conseguem adicionar a dupla ligação na posição 9, mas não nas outras ligações necessárias entre o carbono 10 e a extremidade metilterminal (NELSON e COX, 2002).

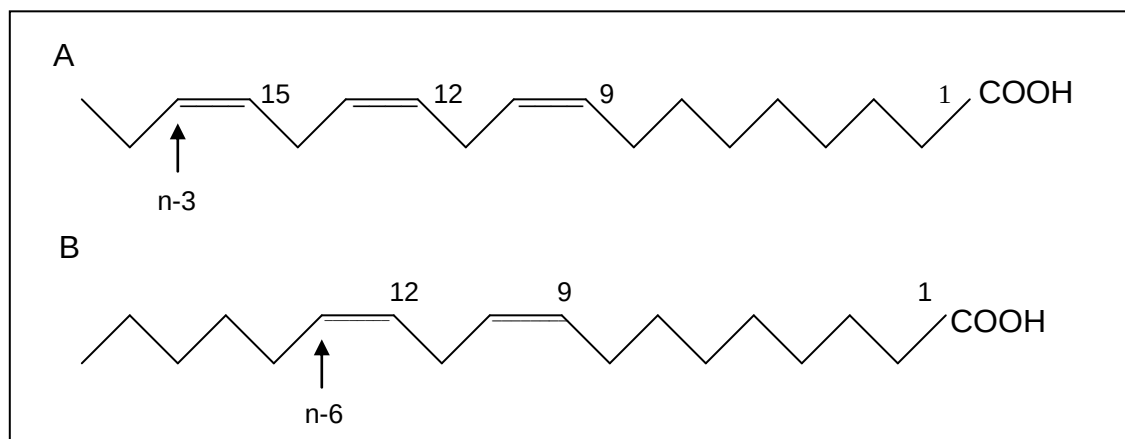


FIGURA 4 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS LINOLÊNICO (A) (C18:3) E LINOLÉICO (C18:2) (B).

Os ácidos graxos linoléico e linolênico são considerados precursores dos ácidos araquidônico (AA), EPA e DHA, precursores dos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) e constituintes das membranas celulares, sendo essenciais para o desenvolvimento cerebral e para o crescimento (BIONDO et al., 2008). Os derivados com 20 átomos de carbonos, EPA e AA (Figura 5), são sintetizados a partir destes lipídios de 18 átomos de carbonos (linoléico e linolênico) pelas enzimas dessaturases (E.C.1.14.19.2) e elongases (E.C.6.2.1.3), que catalisam a adição de duplas ligações na cadeia carbônica e são responsáveis pelo processo de alongação dos ácidos graxos, respectivamente (NELSON e COX, 2002).

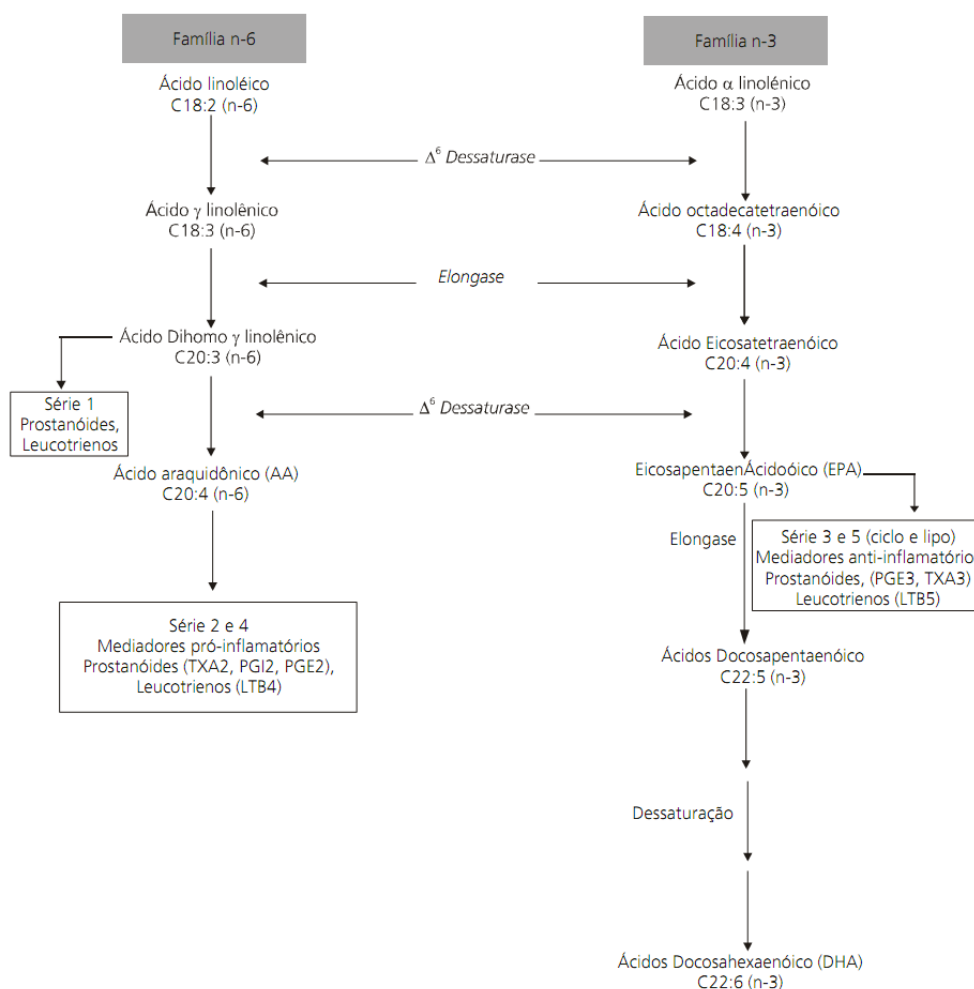


FIGURA 5 - BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS.

FONTE: GARÓFOLO e PELTRILLI, 2006.

O alto consumo de ácido linoléico favorece o aumento do conteúdo de AA nos fosfolípidios das membranas celulares, aumentando, conseqüentemente, a produção de prostaglandina (PG) e leucotrieno (LT) da série par e assim, a resposta pró-inflamatória. A ingestão de uma quantidade equilibrada de alimentos contendo ácido linolênico ou EPA inibe o metabolismo do AA por competição pelas mesmas vias enzimáticas, promovendo a formação de PG e LT da série ímpar, que são mediadores inflamatórios menos ativos apresentando, no geral,

características anti-inflamatórias (LOPES-HUERTAS, 2010; GORJÃO et al., 2009; JAMES et al., 2000). Segundo SILVA et al. (2006), crianças recém nascidas não possuem esta capacidade de desidrogenação, ou seja, capacidade de adicionar novas ligações duplas aos ácidos graxos e alongação; assim, fórmulas infantis devem conter ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa pré-formados.

Alguns estudos indicam que DHA e EPA estão relacionados a efeitos benéficos no controle de doenças cardiovasculares, renais, inflamatórias, alergias e hipertensão. O DHA participa do desenvolvimento do sistema nervoso (cérebro) e da visão infantil, especialmente em crianças prematuras (KARBOUNE et al., 2008; SAHIN et al., 2006). Por outro lado, efeitos citotóxicos de ácidos graxos poliinsaturados também foram relatados. Spector (1995) e Nanji (2004) relacionaram a ingestão de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados à propensão a doenças relacionadas à presença de altas concentrações de álcool no fígado. Segundo os autores, ácidos graxos saturados protegem o fígado contra os efeitos do álcool, enquanto ácidos graxos insaturados proporcionam um aumento dos sintomas causados pela ingestão de quantidades elevadas de álcool.

O perfil de ácidos graxos ingeridos na dieta humana tem sido alterado ao longo do tempo. Enquanto as sociedades primitivas ingeriam mais gorduras insaturadas, particularmente do tipo n-3, a alimentação atual baseia-se na ingestão de n-6 (20-30 vezes a quantidade de n-3). Esta alteração deve-se, principalmente, ao aumento de ingestão de óleos vegetais, associado à redução da utilização de óleos de peixes na dieta (WILLIS et al., 1998).

Segundo James et al. (2000), considerando que as duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas, o balanço entre n-6 e n-3 na dieta é de

grande importância. Níveis adequados de ingestão de ácidos graxos essenciais foram estabelecidos pelo Instituto de Medicina Norte-Americano (*North-American Institute of Medicine*), por meio do Consumo Dietético de Referência (*Dietary Reference Intakes*, DRIs), baseadas na ingestão média da população americana (PADOVAN et al., 2006). As DRIs constituem-se na mais recente revisão dos valores de recomendação de nutrientes e energia adotados pelos Estados Unidos e Canadá, e vêm sendo publicadas desde 1997 na forma de relatórios parciais elaborados por comitês de especialistas, em uma parceria entre o Instituto de Medicina Norte-Americano e a Agência de Saúde do Canadá (*Health Agency of Canada*). Estes dados estabelecem o consumo de 1,1-1,6g/dia de n-3 para 12-17 g/dia de n-6, mas uma outra proposta, com base em experimentação animal, sugere uma razão de ingestão diária na ordem de 1:1 (n-3:n-6) ou o consumo de no mínimo 0,5 g/dia (crianças) e 1,5 g/dia (adultos) de ácidos graxos n-3 com mais de 20 carbonos em sua cadeia (NAPIER, 2006; GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

O óleo de soja apresenta quantidades elevadas de n-6, em relação ao n-3, e o seu emprego, associado ao de outros óleos de fontes vegetais, torna necessária a utilização de alimentos ou suplementos alimentares que contenham n-3, visando à manutenção de proporções saudáveis destes ácidos graxos (POUZET, 1996).

2.1.2 Metabolismo de lipídios provenientes da dieta

Sabe-se que, na natureza, há uma distribuição posicional dos ácidos graxos nas diferentes moléculas de triacilgliceróis. A estrutura e distribuição dos ácidos

graxos determinam o metabolismo, a funcionalidade e as características físicas e químicas dos óleos e gorduras (OSÓRIO et al., 2008; MU e PORSGAARD, 2005; SHARMA et al., 2001).

A maior parte dos triglicerídeos ingeridos é inicialmente hidrolisada pelas lipases lingual e gástrica, específicas para a posição *sn* 3. Após isto, ocorre a hidrólise por lipases pancreáticas, *sn* 1,3 específicas, que clivam, preferencialmente ésteres de cadeia longa nestas posições do glicerol. Os produtos, ácidos graxos livres e 2-monoacilglicerol são ligeiramente solúveis em água, o que facilita sua absorção pelos enterócitos, no intestino delgado (DEVLIN, 2007; CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006; MU e PORSGAARD, 2005). Os TAG são, então, re-sintetizados e incorporados aos quilomícrons, lipoproteínas transportadoras, para serem transportados pelo sistema linfático. Segundo alguns autores (DEVLIN, 2007; KIM et al., 2001), o destino dos ácidos graxos pode depender do comprimento da sua cadeia. Enquanto ácidos graxos de cadeia média e curta chegam ao fígado diretamente pela veia porta hepática, ácidos graxos de cadeia longa chegam primeiro ao tecido adiposo, muscular e a outros tecidos via circulação sistêmica, antes de entrarem em contato com o fígado. Células adiposas e musculares captam grande quantidade de ácidos graxos da dieta para armazenamento ou metabolismo. Quando não é necessária a sua utilização como fonte de energia, via β -oxidação, os ácidos graxos n-6 são convertidos em ácido araquidônico, e os ácidos n-3, em EPA e, principalmente DHA. Estes compostos possuem função estrutural, fazendo parte dos fosfolipídios de membrana em diversas células. Se for necessária a síntese de eicosanóides,

estes ácidos graxos são retirados dos fosfolipídeos e utilizados para a conversão em prostraglandinas e leucotrienos (MONTGOMERY, 1994).

A utilização diferencial de ácidos graxos de cadeia média e longa por células intestinais pode ser explorada na modificação de óleos e gorduras, para fornecer ao fígado nutrientes altamente calóricos, na forma de ácidos graxos. Assim como a utilização de ácidos graxos de cadeia curta que, no geral, têm cheiro e gosto rançoso e, portanto, são difíceis de introduzir na dieta isoladamente mas, na forma de triacilgliceróis, não apresentam as características indesejáveis de forma tão intensa e assim, podem ser utilizados como parte da dieta (OSÓRIO et al., 2008; DEVLIN, 2007).

Segundo Mu e Porsgaard (2005), lipídios estruturados contendo ácidos graxos essenciais de cadeia longa, incorporados na posição *sn*-2 do glicerol e ácidos graxos de cadeia curta ou média, nas posições *sn*-1 e *sn*-3, são metabolizados mais facilmente pelo organismo, pois a presença destes ácidos graxos irá conduzir à hidrólise mais rápida de TAG. Os monoacilgliceróis compostos por ácidos graxos de cadeias longas, pela sua maior solubilidade, podem ser absorvidos mais rapidamente do que ácidos graxos de cadeia longa livres.

Segundo D'Agostini e Gioielli (2002), é benéfico incorporar ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn* 2 devido à baixa atividade da lipase pancreática em relação a esta posição. Na posição *sn* 2, o ácido graxo é mais facilmente absorvido como 2-monoacilglicerol. Esta característica é especialmente importante em triacilgliceróis utilizados na alimentação infantil, tanto que o leite humano apresenta o ácido palmítico na posição *sn* 2 do glicerol. A presença de ácido

palmítico nesta posição aumenta sua absorção, reduzindo a eliminação de cálcio e de gordura pelas fezes (SRIVASTAVA et al., 2006). Quando o ácido palmítico está localizado nas posições *sn* 1 e *sn* 3, a ligação éster é rapidamente hidrolisada pela lipase pancreática, mas a absorção do ácido graxo é mais lenta, possibilitando a formação de aglomerados com moléculas de cálcio que são pouco absorvidos pelo intestino. Assim, triglicerídeos contendo ácidos graxos essenciais na posição *sn* 2 e ácidos graxos de cadeia curtas ou médias nas posições *sn* 1 e *sn* 3 podem ser mais rapidamente absorvidos por células da mucosa intestinal (MU e POSGAARD, 2005).

2.2 LIPASES: DEFINIÇÃO E PRODUÇÃO

2.2.1 Definição, estrutura e mecanismo

Lipases (glicerol éster hidrolases E. C. 3.1.1.3) são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (Figura 6). Em meio apropriado, normalmente em meios onde a água não é o solvente (meios aquo-restritos ou de solventes orgânicos), as lipases têm se mostrado muito ativas em reações de síntese, como esterificação, transesterificação e interesterificação, apresentando alta especificidade, estabilidade e atuando em condições brandas (KRIEGER et al., 2004).

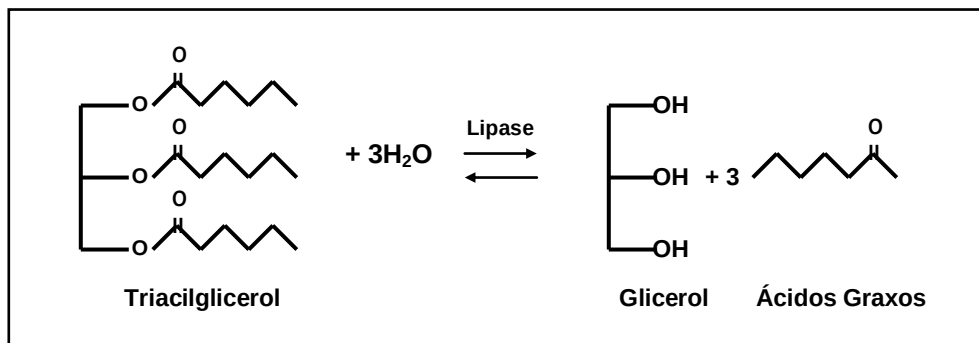


FIGURA 6 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADA POR LIPASES

Todas as lipases possuem resíduos de serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico no sítio ativo, assim como um dobramento característico na conformação α/β hidrolase, que também é encontrado em esterases e proteases. Esterases, no entanto, hidrolisam acilgliceróis de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono), enquanto lipases hidrolisam acilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa (JAEGER et al., 1999).

A Figura 7 mostra a estrutura tridimensional da lipase de *Rhizopus oryzae* modificada geneticamente. Segundo Bornscheuer (2008), esta estrutura possui os resíduos do sítio ativo característicos das lipases (Ser 145, Asp 204 e His257), localizados no centro da molécula. A maioria das lipases, possui uma parte da molécula da enzima que cobre o sítio ativo com uma curta α -hélice, chamada *lid* (tampa). Essa “tampa” possui cadeias laterais hidrofóbicas que, em ambientes aquosos, sem o seu substrato natural, sofrem um dobramento, fazendo com que a *lid* cubra o sítio catalítico. Neste estado, a lipase encontra-se inativa, e diz-se que ela está na sua forma “fechada”. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica, o que promove alterações em

sua conformação, levando à forma “aberta” da lipase, deixando a enzima ativa. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como “ativação interfacial”. Existem, no entanto, lipases como as de *Candida antarctica B* e de *Pseudomonas aeruginosa*, que apesar de possuírem a *lid*, não apresentam o efeito da ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998). Outras lipases, como a de *Staphylococcus hyicus*, mostram ativação interfacial somente com alguns substratos (VERGER, 1997).

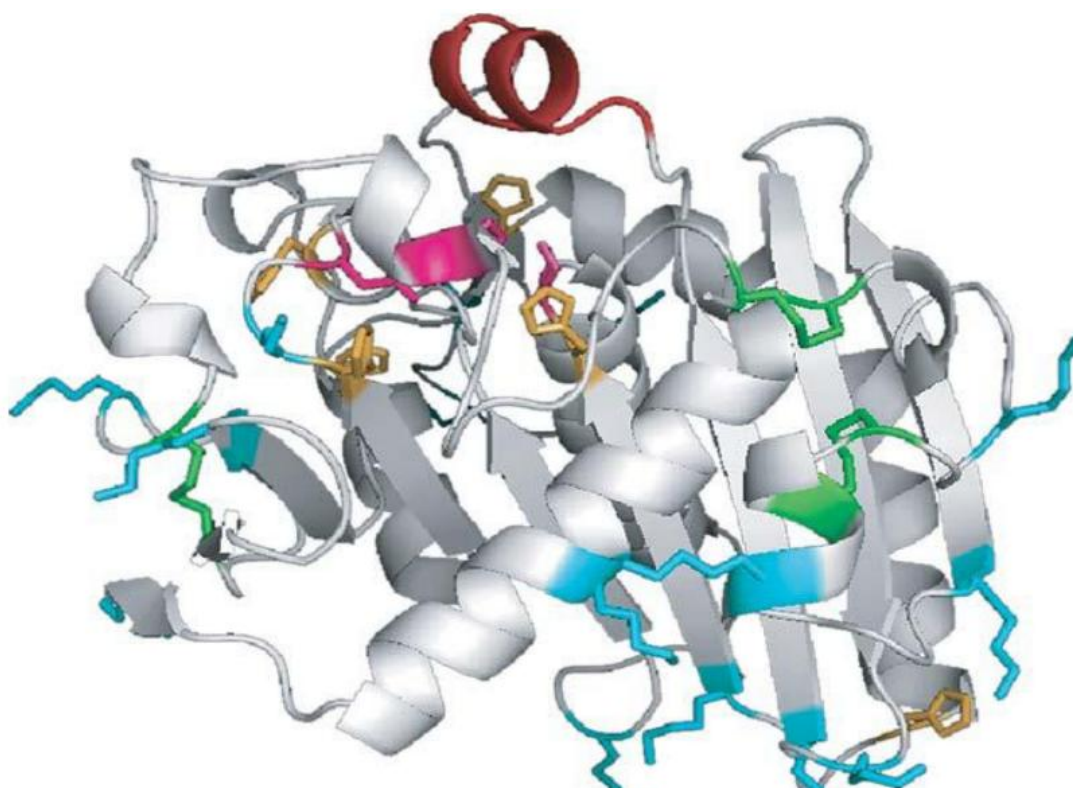


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Rhizopus oryzae* MODIFICADA. AS FITAS β ESTÃO REPRESENTADAS COMO SETAS E AS α - HÉLICES EM ESPIRAL. OS RESÍDUOS DA TRÍADE CATALÍTICA ESTÃO MOSTRADOS EM ROSA E A TAMPA *lid* EM VERMELHO.

FONTE: BORNSCHEUER (2008).

As lipases podem ser empregadas como biocatalisadores na síntese orgânica devido à característica destas enzimas de atuarem em meios orgânicos com baixo teor de água. Nestes meios, quantidades restritas de água reduzem a ação hidrolítica normal e, com o equilíbrio termodinâmico da reação deslocado para a síntese, a enzima passa a catalisar reações como esterificação, transesterificação e interesterificação (KOVAC et al., 2000). No processo de interesterificação, a reação ocorre pela sucessão de hidrólise e síntese de triacilgliceróis. A água é necessária em quantidade suficiente para garantir que a estrutura conformacional da enzima esteja ativa, permitindo a transferência de grupos acil, mas minimizando a hidrólise (GRAILLE, 1999).

2.2.2 Classificação de lipases

Uma das vantagens associadas à utilização de enzimas é a especificidade do biocatalisador, que evita a formação de produtos indesejáveis, catalisando reações em sítios e substratos específicos. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato.

Com relação à sua regioespecificidade, lipases podem ser classificadas (Figura 8) em lipases 1,3 específicas, que são aquelas que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn* 1 e *sn* 3 dos triacilgliceróis, lipases 2-específicas, que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn* 2 dos triacilgliceróis, e lipases não específicas, que catalisam a hidrólise de TAGs de

modo aleatório, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários (BERGER e SCHNEIDER, 1991).

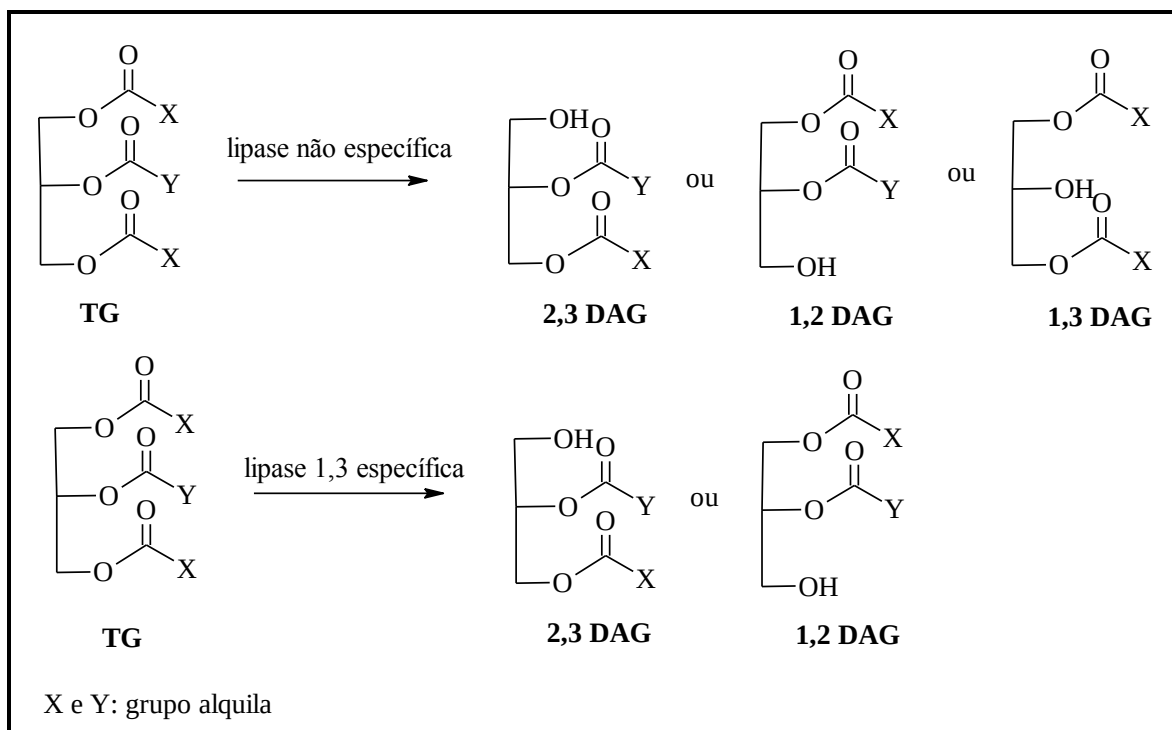


FIGURA 8 - REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE UM TRIACILGLICEROL CATALISADAS POR DIFERENTES LIPASES.

As lipases podem também ser classificadas em função de sua tiposseletividade ou seletividade quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou número de insaturações do grupo acila (WANG et al., 2008). Entretanto, este tipo de especificidade não é comum entre lipases. Um representante típico deste grupo é a lipase de *Geotrichum candidum*, que hidrolisa preferencialmente grupos acila de cadeia longa que contenham dupla ligação *cis* na posição 9 (CASTRO et al., 2004).

Algumas lipases também possuem a capacidade de discriminar enantiômeros de uma mistura racêmica, sendo classificadas como

estereoespecíficas. A discriminação entre dois enantiômeros é realizada pela enzima por meio da ligação do substrato ao seu sítio catalítico. Qualquer impedimento estérico devido à conformação da estrutura enzimática poderá auxiliar a enzima a diferenciar estruturas semelhantes durante o processo de interação com o substrato (KOVAC et al., 2000).

2.2.3 Lipases do gênero *Rhizopus*

Fungos do gênero *Rhizopus* são classificados como filamentosos, caracterizando-se pela presença de hifas e formação de micélio (Figura 9).

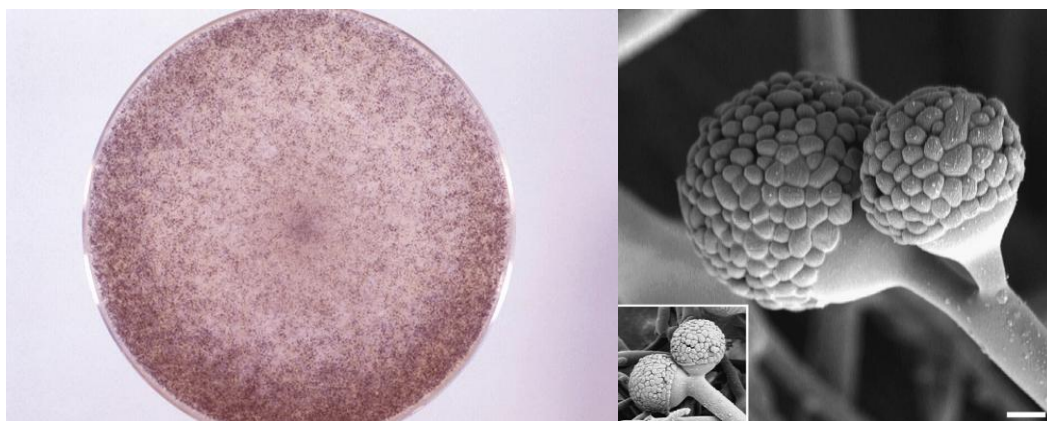


FIGURA 9 - CEPA DE *Rhizopus sp.* CULTIVADO EM PLACA CONTENDO MEIO ÁGAR BATATA DEXTROSE (BDA) (A), MICROGRAFIA ELETRÔNICA VARREDURA DE ESPORÂNGIO DE *Rhizopus sp.* (B).

FONTE: JENNESSEN et al. (2008).

As características bioquímicas e moleculares de algumas lipases do gênero *Rhizopus* são apresentadas na Tabela 7. De maneira geral, a massa molecular das lipases fúngicas provenientes do gênero *Rhizopus* varia entre 29 e 37 kDa, apresentando sua atividade máxima entre pH 5,5 e 8,0. Em especial, as lipases

provenientes do fungo *R. oryzae* apresentam melhor atividade em valores de pH entre 7 e 8 e temperaturas que variam de 30 a 40 °C. A termoestabilidade das lipases é uma das características requeridas para aplicação industrial, uma vez que muitos processos enzimáticos podem usar temperaturas em torno de 50 °C, que além de aumentar a velocidade da reação, diminui a viscosidade do meio (SALUM, 2010). Para o gênero *Rhizopus*, as lipases apresentam estabilidade a temperaturas entre 45°C e 50°C.

Dependendo do meio onde são mantidos, fungos do gênero *Rhizopus* são capazes de produzir muitas enzimas, entre elas diferentes isoformas de lipases intra ou extracelulares, como é o caso de *R. microsporus*. Diyorov et al. (1994) estudaram as diferentes isoformas de lipase produzidas pelas cepas de *R. microsporus* UzLT – 4B e 5C, pertencentes à coleção do Instituto de Microbiologia da Academia de Ciências do Uzbequistão, e seu mecanismo de exportação. Constataram que podem ser produzidas de quatro a cinco diferentes isoformas, em diferentes linhagens do fungo. Em uma das linhagens estudadas (UzLT – 4B), as lipases isoladas apresentavam massa molecular de 24, 32, 43, 66 e 98 kDa, sendo que as isoformas com 32, 66 e 98 kDa foram encontradas tanto no meio intra como extracelular. Das isoformas extracelulares, a enzima de massa 66 kDa foi secretada na fase de crescimento do micro-organismo, enquanto as outras duas isoformas, apenas na fase estacionária.

TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS DE LIPASES FÚNGICAS DO GÊNERO *Rhizopus*.

Fonte	Procedência	Massa Molecular, pH e Temperatura Ótima	Estabilidade ao pH e à Temperatura	Seletividade pelo substrato	Referências
<i>R. chinensis</i>	IFO 4768	28,4 kDa; 37°C; pH 5,5	Ativas até 60°C	Preferência por cadeias carbônicas C16:0; C12:0 e C8:0	Yasuda et al. 1999
<i>Rhizopus chinensis</i>	CCTCCM 201021	30 e 37 KDa; 37°C; pH 8	Estável entre pH 7,5 – 8,5	Alta especificidade à C6:0	Yu et al. 2009
<i>Rhizopus homothallicus</i>	IRD 13a	29,5 KDa; 40°C; pH 7,5	Estável a 50°C durante 0,72 h	Preferência por C6:0-C14:0	Diaz et al. 2006
<i>Rhizopus oryzae</i>	Isolado do açaí	32 KDa; 35°C; pH 7,5	Estável a valores de pH entre 4,5 a 7,5	Preferência por cadeias saturadas (C8:0 – C18:0)	Hiol et al. 2000
<i>Rhizopus oryzae</i>	AMANO	34 KDa; 40°C; pH 7 - 8	Mantém 60 % da atividade a 45°C e pH 7,25	Preferência por C8:0 – C12:0	Guillén et al. 2011
<i>Rhizopus oryzae</i>	Livre e Imobilizada em Celite 545	37°C; pH 8	Estável a 50°C quando imobilizada	Preferência por C18:0	Ghamgui et al. 2007
<i>Rhizopus oryzae</i>	Isolado de azeitonas em decomposição	37°C; pH 8	Estável à temperaturas entre 25°C e 60°C e pH quando imobilizada em sílica	Preferência por C18:0	Kharrat et al. 2011
<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 853	30 KDa; 30°C; pH 8 – 8,5	Estável à temperatura de 30°C	Alta atividade com C18:0	Beer et al. 1998
<i>Rhizopus oryzae</i>	Linhagem proveniente da Tunísia	29 KDa; 37°C; pH 8	Estável entre pH 5 - 8	Preferência por C18:0	Salah et al. 2006

Hama et al. (2007) extraíram e analisaram duas lipases presentes em *R. oryzae*. A primeira, chamada de ROL34, possui massa molecular de 34 kDa e está localizada junto à parede celular. A segunda lipase, ROL31, apresenta massa de 31 kDa e se encontra ligada à membrana celular. Os autores ainda sugerem que ROL31 origina-se da clivagem do resíduo N-terminal de ROL34, necessária para a excreção da enzima. Analisando a atividade de síntese dessas enzimas, foi possível relacionar a atividade sintética da lipase de *R. oryzae* com a lipase que permanece ligada à membrana (ROL31). Sun et al. (2009) estudaram *R. chinensis* e avaliaram que a cepa estudada (CCTCC M201021), além de produzir a lipase extracelular citada na Tabela 7, pode produzir uma lipase intracelular, quando o fungo é cultivado em fermentação no estado sólido. Os autores extraíram e analisaram a atividade da lipase intracelular, observando que, ao contrário da atividade lipolítica, a maior atividade sintética (aproximadamente 93 % da atividade sintética total) foi caracterizada como sendo proveniente da enzima intracelular.

Lipases provenientes das cepas de *Rhizopus* sp. são reconhecidamente sn-1,3 específicas mas podem apresentar diferentes estereosseletividades e tiposseletividades (seletividade quanto ao tamanho de cadeia carbônica do ácido graxo) (ROGALSKA et al., 1993). A estrutura e função das lipases extracelulares de *R. oryzae*, especificamente *R. oryzae* ATCC 34612, anteriormente conhecido como *R. delemar* (SCHIPPER, 1984) já foram estudadas (DEREWENDA et al., 1994 e SWENSON et al., 1994).

2.2.4 Produção de Lipases

As lipases são produzidas por muitos micro-organismos, plantas e animais. Entretanto, as lipases mais utilizadas industrialmente têm sido as microbianas devido à facilidade de manipulação genética, à possibilidade de altos rendimentos, ao suprimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos em meios relativamente baratos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

As principais fontes de micro-organismos produtores de lipases são as bactérias, fungos e leveduras, provenientes de ambientes diversos contendo, principalmente, altos teores de gorduras, como efluentes industriais, sementes contendo altos teores de óleo vegetal, indústrias de laticínios e solos contaminados com óleo (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Atualmente, a produção industrial de lipases é realizada utilizando-se fermentação submersa (FS), onde os meios de cultivo são líquidos contendo os nutrientes dispersos. O processo de FS torna necessária a utilização das etapas de extração, purificação e imobilização das enzimas (quando requerida), fazendo com que os processos enzimáticos passem a ser mais caros do que os processos químicos convencionais, como, por exemplo, no caso da produção do biodiesel (SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007; MITCHELL et al., 2006).

Tanto na FS quanto na fermentação em estado sólido (FES), o crescimento dos micro-organismos e a produção de lipases dependem de diversos fatores como pH, temperatura, umidade, aeração e do tipo de substrato (SINGHANIA et al., 2009; MITCHELL et al., 2006). Na FES, o substrato sólido é insolúvel e pode

atuar como um suporte físico além de fonte de nutrientes para o crescimento microbiano. Substratos sólidos naturais como resíduos agro-industriais podem ser utilizados no processo de FES, diminuindo significativamente o custo do processo de produção da enzima (MITCHELL et al., 2006; PANDEY, 2003).

Castilho et al. (2000) analisaram o custo de produção da enzima e concluíram que é possível obter uma redução de até 70 % do custo final de produção da lipase, se o processo de fermentação em estado sólido for utilizado.

Dentre os produtores de lipases, a grande maioria dos trabalhos utiliza fontes fúngicas para a produção por FES. Segundo Singhanian et al. (2009), fungos e leveduras são micro-organismos reconhecidamente mais adequados para o cultivo em fermentação no estado sólido, pois são mais adaptados a ambientes com baixa atividade de água (a_w). Entretanto, alguns trabalhos têm sido relatados com a produção de enzimas por bactérias em FES. Este é o caso de Fernandes et al. (2007) e de Salum et al. (2010), que estudaram a produção de lipases por FES utilizando a bactéria *Burkholderia cepacia* LTEB11. Em 2008, Mahanta, Gupta e Khare estudaram a produção de lipases por FES, utilizando uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, e torta de semente de pinhão manso como substrato

Na FES, o micro-organismo cresce em substratos sólidos umedecidos ou suportes inertes, na ausência de água livre, com umidade suficiente para manter o crescimento dos micro-organismos e produção de seus metabólitos. Os metabólitos são normalmente produzidos de forma concentrada, facilitando o seu processo de recuperação do meio de fermentação (MITCHELL et al., 2006). O material sólido é insolúvel, agindo como suporte físico e como fonte de nutrientes.

Pode ser um substrato sólido natural, como resíduos agroindustriais, ou um suporte inerte, como poliuretano ou resinas poliméricas (HAMA et al., 2007; YANG et al., 2005; PANDEY, 2003).

Os resíduos agrícolas são ricos em carbono e materiais celulósicos, portanto, podem ser utilizados como recursos renováveis para o crescimento de micro-organismos e a produção de metabólitos (YANG e YUAN, 1990; YANG e SWEI, 1996). O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo da cana obtido em grande quantidade no Brasil (5 a 12 milhões de toneladas) podendo ser utilizado na FES sem custos adicionais (SANTOS, 2005).

2.2.5 O sólido fermentado contendo atividade lipolítica como catalisador de reações em meios de solventes orgânicos

Alguns estudos têm sido feitos demonstrando a possibilidade da adição direta do sólido fermentado liofilizado com atividade lipolítica no meio reacional para catalisar reações de esterificação, de transesterificação (FERNANDES et al., 2007; MARTINEZ-RUIZ et al., 2008; SALUM et al., 2010; ZAGO, 2010) e separação de mistura racêmicas (NAGY et al., 2006). Utilizando o sólido fermentado diretamente no meio reacional, as etapas de extração da lipase, purificação e imobilização não são necessárias.

Os substratos para processos de FES são geralmente resíduos agroindustriais. Fernandes et al. (2007) e Salum et al. (2010), utilizaram pioneiramente o sólido fermentado contendo a lipase de *B. cepacia* LTEB11 como catalisador em reações de esterificação e transesterificação alcoólica. Nos

primeiros trabalhos (FERNANDES et al., 2007), as atividades de esterificação obtidas, tanto para as reações de esterificação como para as de transesterificação, foram baixas (90 % em 18 h) e as reações foram realizadas em presença do cossolvente *n*-heptano, no sistema de frascos agitados. Já os resultados de esterificação reportados por Salum et al. (2010) apresentaram uma atividade mais elevada (100% em 3 h) para a mesma reação e para reações em sistemas contínuos, utilizando reatores de coluna, recheados com o sólido fermentado.

Martinez-Ruiz et al. (2008) utilizaram o sólido fermentado por *Rhizopus* sp. como catalisador de reações de esterificação entre o ácido oléico e o etanol. O suporte utilizado para a fermentação no estado sólido foi perlite, um tipo de vidro vulcânico, tendo óleo de oliva como indutor para a produção de lipases. Os autores observaram 100 % de conversão do ácido oléico em oleato de etila após 60 min de reação a 45°C, utilizando uma razão de ácido oléico:etanol de 1:5 (50mM de ácido oléico) e 1 g de biocatalisador.

Em 2009, Sun et al., cultivaram o fungo *Rhizopus chinensis* em FES, utilizando uma mistura de farinha de trigo e farelo de trigo como substratos. Os autores quantificaram a atividade de esterificação, utilizando ácido oléico como substrato, por meio da adição direta do sólido fermentado no meio reacional e da adição da enzima purificada. Após 20 h de reação, quantificaram a atividade específica da enzima como sendo de 0,7 U.mg⁻¹, quando o sólido fermentado foi utilizado como biocatalisador e 96,8 U.mg⁻¹, utilizando a enzima purificada.

No entanto, para a utilização destes sistemas reacionais em larga escala, ainda são necessários estudos em escala de bancada que aumentem a

produtividade do processo e que possibilitem o dimensionamento de reatores (HOLKER e LENZ, 2005).

2.3 APLICAÇÕES DE LIPASES EM MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

Nos últimos quinze anos, tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras com a finalidade de melhorar suas propriedades nutritivas ou reológicas, visando à obtenção de lipídios com a composição em ácidos graxos ou sua distribuição nos triacilgliceróis conhecidos. Estes lipídios, conhecidos como lipídios estruturados, são alimentos modificados ou reestruturados para adquirirem funções especiais com aplicações nutricionais ou farmacêuticas.

Com o aumento do conhecimento sobre os efeitos dos ácidos graxos relacionados ao comprimento de cadeia carbônica, grau de insaturação e distribuição estereoespecífica, há um crescente interesse em usar lipídios estruturados para a redução do risco de doenças, bem como para a melhoria da saúde (CHIU et al., 2008; WILLIS et al., 1998).

Além disso, observa-se que os processos utilizados tanto podem ser de interesterificação como de transesterificação ácida, e os produtos obtidos são variados, desde a produção de substitutos do leite humano, até a produção de gorduras com propriedades semelhantes às da manteiga de cacau. A seguir relata-se o estado da arte destes dois processos.

2.3.1 Reações de Interesterificação

Atualmente, um dos processos industriais mais empregados para a obtenção de lipídios modificados é a interesterificação química (Figura 10) (XU et al., 2000). Os catalisadores químicos mais utilizados neste processo são os alquilatos metálicos (metóxido de sódio ou etoxilato de sódio), em temperaturas que variam de 50 °C a 120 °C e tempo de reação de 2 h (YANG et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008; CHIU et al., 2008).

Os substratos mais utilizados na produção industrial pelo processo químico são a estearina de palma (PS) e o óleo de palmiste (PK). A estearina de palma, devido ao seu alto grau de saturação, não apresenta a plasticidade necessária ao produto final. Possui alto ponto de fusão (44°C – 56°C) não sendo considerada uma gordura comestível isoladamente, tornando-se necessária a incorporação de outros óleos ou gorduras (MINGA et al., 2004). Outro composto que é frequentemente utilizado na produção de margarinas e *shortenings* é o óleo de palmiste. Com o aumento dos estudos sobre os benefícios causados pela ingestão de ômega-3, tem aumentado o interesse sobre a incorporação desses ácidos graxos em diferentes alimentos, entre eles, a margarina.

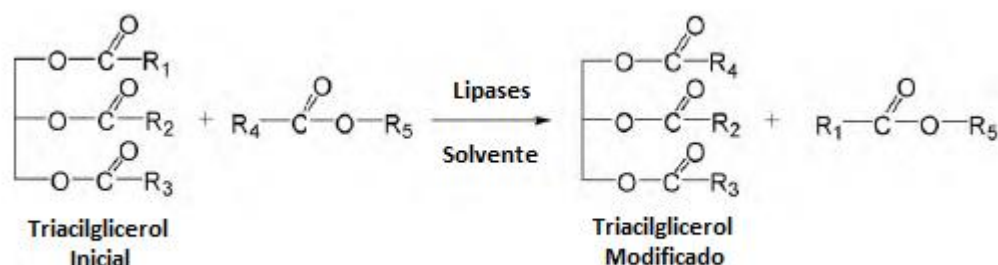


FIGURA 10 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR LIPASES.

FONTE: RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, (2010).

Entretanto, de acordo com Holm e Cowan (2008), a simples mistura de concentrados de ômega-3 com os substratos utilizados para a produção da margarina não é suficiente para que as propriedades físicas desejáveis sejam obtidas. Por isso, a incorporação química ou enzimática de ácidos graxos poliinsaturados torna-se a única alternativa para a indústria, pois, além de proporcionar os benefícios à saúde já conhecidos através da ingestão de ácidos graxos ômega-3, facilita a obtenção das características físicas necessárias à qualidade dos *shortenings*, como elevada plasticidade e ponto de fusão ideal às características desejadas.

A interesterificação química é um processo simples e barato, mas apresenta o inconveniente de falta de especificidade, oferecendo pouco ou nenhum controle sobre a distribuição dos ácidos graxos na molécula de triacilglicerol. Além disso, o catalisador utilizado pode permanecer como contaminante na etapa final do processo junto ao produto gerado, levando à necessidade de etapas posteriores de purificação para obtenção do produto de interesse (WILLIS et al., 1998; HOLM e COWAN, 2008).

Os processos enzimáticos que utilizam lipases são mais desejáveis em relação aos químicos por se tratarem de processos altamente específicos quanto à incorporação de ácidos graxos nas posições desejadas e não requererem condições reacionais agressivas envolvendo altas temperaturas.

No processo químico (Figura 11), praticamente todas as etapas (à exceção da etapa de lavagem) envolvem a utilização de temperaturas em torno de 100°C, enquanto no processo enzimático, a temperatura utilizada será a necessária para a catálise enzimática (normalmente 60 – 70°C) (HOLM e COWAN, 2008). Além

disso, as enzimas utilizadas são normalmente imobilizadas, o que proporciona uma redução da contaminação do produto final e a diminuição do custo do processo enzimático, pois podem ser reutilizadas. As etapas de lavagem e branqueamento, para remoção da cor passam a ser desnecessárias. A única etapa que ainda é necessária é a de desodorização, onde os ácidos graxos livres, remanescentes do processo, são removidos (CHIU et al., 2008; ALONSO, 2001; SHARMA et al., 2001) (Figura 11).

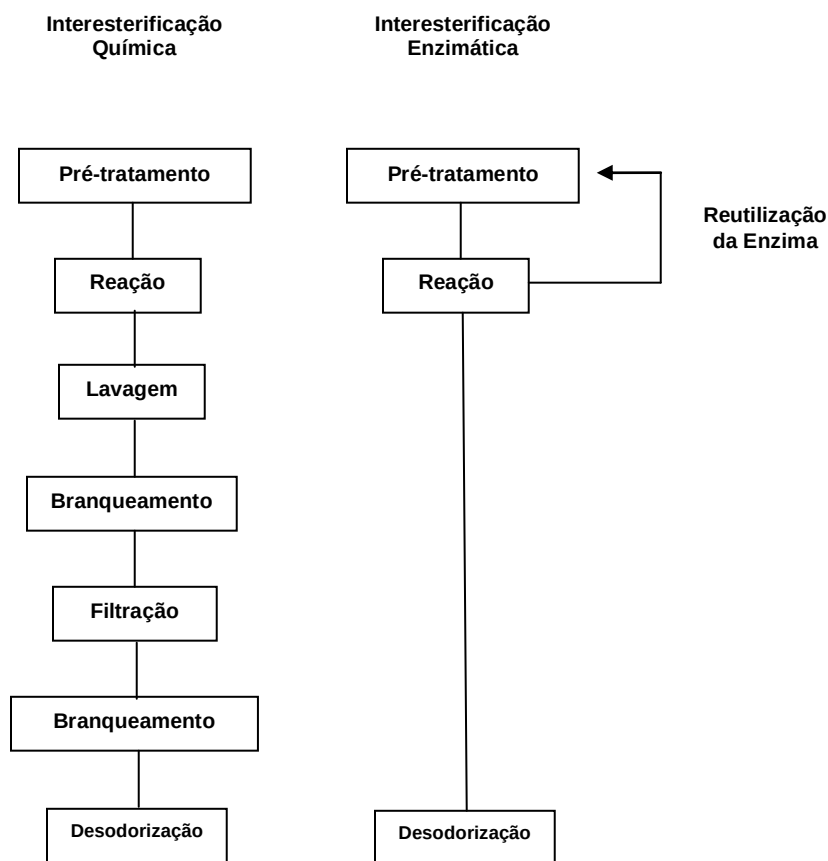


FIGURA 11 - COMPARAÇÃO DOS PROCESSOS DE INTERESTERIFICAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA.

FONTE: Adaptado de HOLM e COWAN, 2008

Os principais parâmetros avaliados no produto final, tanto por catálise química como por enzimática, são o teor de gordura sólida a 30°C ou 35°C (Solid Fat Content, SFC_{35°C}) e o teor de ácidos graxos livres (Free Fatty Acids, FFA) gerados durante as reações, provenientes de reações de hidrólise ou liberados na primeira etapa das reações de interesterificação. Além do SFC final, os autores quantificaram a presença de ácidos graxos livres. Os ácidos graxos livres gerados podem permanecer como contaminantes, alterando as características sensoriais do produto final por isso torna-se necessária a etapa final de desodorização (Figura 11). Além da retirada dos ácidos graxos livres do processo final, o controle da quantidade de água presente no sistema pode ajudar a reduzir os seus níveis durante a reação (NASCIMENTO et al., 2004 e OSÓRIO et al., 2001).

Vários autores vêm estudando a interesterificação enzimática de margarinas (Li et al., 2010; Laia et al., 2000; Minga e Ghazali, 1999; Zainal e Yusoff, 1999) ou a adição enzimática de ômega-3 a margarinas ou *shortenings* (OSÓRIO et al., 2001; Houmøller et al., 2007) (Tabela 8). Observa-se que as temperaturas dos processos são relativamente elevadas (de 45°C a 100°C), o que pode ser explicado pela necessidade de liquefazer o material de partida, e que, devido a isto, requer lipases ativas e estáveis nesta faixa de temperatura. Os teores de SFC são variáveis, estando normalmente abaixo de 7 %, um valor já aceitável para uma margarina comercial. Os tempos de reação para obtenção dos teores mínimos de SFC são relativamente elevados, com um mínimo de 6 h e um máximo de 48 h.

Em setembro de 2001, foi implantado o primeiro processo industrial de interesterificação enzimática, na Suécia, pela empresa Karlshamns, atualmente

AarhusKarlshamn (AAK), utilizando Lipozyme TL IM para a produção de margarina. Em julho de 2002, a ADM (Archer Daniels Midland Company), um conglomerado americano, com base em Decatur, Illinois, montou a primeira empresa nos Estados Unidos a utilizar a Lipozyme TL IM em reações de interesterificação (HOLM e COWAN, 2008).

Além das margarinas, existem alguns produtos comerciais, denominados alimentos funcionais, que correspondem a triacilgliceróis modificados por processos químicos ou enzimáticos utilizando lipases. Por exemplo, o Salatrim™ (*short and long acyltriglyceride molecules*) é um substituto de ácidos graxos (de baixa caloria), comercializado pela empresa Nabisco nos Estados Unidos e obtido por interesterificação de óleos vegetais altamente hidrogenados com triacilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia curta (triacetina, tripopionina, tributirina) (LEE et al., 2008). Do mesmo modo, a empresa Loders-Croklaan, sucursal da Unilever nos Estados Unidos, comercializa o Betapol® (substituto de leite materno) e o Marinol®, um óleo enriquecido com ácidos graxos poliinsaturados e com ômega 3 do tipo ácido alfa-linolênico, ácido eicosapentanóico e o ácido docosahexanóico (MU e POSGAARD, 2005). A Caprenina® produzida comercialmente tem sido utilizada como substituto da manteiga de cacau. Ela é composta pelos ácidos caprílico (C8:0 – 22 %), cáprico (C10:0 – 27 %) e behênico (C22:0 – 51 %).

TABELA 8 - REAÇÕES DE INTERESTERIFICAÇÃO REALIZADAS UTILIZANDO LIPASES ^(A).

Autores	Substratos	Lipase	Concentração de Lipase	Temperatura	Resultados	Tempo
Silva et al. (2009)	Óleo de soja, banha	Lipozyme TL IM	5 % (m/m)	60°C	SFC _{35 °C} – 0 %	6 h
Paula et al. (2010)	Óleo de soja e gordura do leite	<i>Rhizopus oryzae</i> lipase (L036P, Biocatalysts)	970 U/g de meio reacional	45°C	FFA < 2% Alto grau de interesterificação	48 h
Li et al. (2010)	Óleo de soja e óleo de girassol	Lipozyme TL IM	10 % (m/m)	70°C	SFC _{35°C final} : 7 % FFA 4- 6 %	24 h
Houmøller et al. (2007)	Estearina de palma, Óleo de coco, óleo de colza	Lipozyme TL IM	1 % (m/m)	70°C	SFC _{35°C final} – 6,65 % 0,2 – 2,2 % FFA	0,5 h
Osório et al. (2001)	Óleo de palma, estearina de palma, EPAX 2050TG, óleo de soja	Novozym 435B	5 % (m/m)	55-73°C	SFC _{35°C final} – 3,01 % 2-6 % FFA	2 h
Laia et al. (2000)	Estearina de palma, óleo de palmiste	Lipozyme IM 60	1 % (m/m)	60°C	SFC _{30°C} – margarina comercial – 5 %: margarina experimental 14 %	6 h
Zainal e Yusoff, (1999)	Estearina de palma, óleo de palmiste	Lipozyme IM 60	1 % (m/m)	100°C	SFC _{35°C final} – 0 – 4,1 % FFA 2,0 – 2,9 %	24 h
Minga e Ghazali, (1999)	Estearina de palma e óleo de girassol	Lipozyme IM 60, <i>Pseudomonas sp.</i> Lipase	1 % (m/m)	60°C	SFC _{35°C} 0 – 4,5 %	6 h - 8 h

(a) Enzimas imobilizadas. As reações foram realizadas em meio sem solvente.

2.3.2 Reações de Transesterificação Ácida

O processo industrial utilizado para as reações de transesterificação ácida é geralmente químico, estando associado à utilização de altas temperaturas (até 150°C) e catalisadores químicos (metóxido de sódio, etóxido de sódio, hidróxido de sódio ou de potássio) (ERICKSON, 1995).

Nos processos de transesterificação ácida são utilizados um triacilglicerol (óleo ou gordura) e um ácido graxo livre (Figura 12). O mecanismo envolvido nas reações de transesterificação ácida e de interesterificação ainda está sendo estudado. A hipótese mais aceita envolve uma primeira etapa de hidrólise, seguida de esterificação (XU, 2000). Por envolver reações de hidrólise, a umidade do meio reacional torna-se importante. Assim, um alto teor de água, normalmente expresso em atividade termodinâmica da água (a_w), desloca o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise; já uma baixa atividade de água, desloca o seu equilíbrio para a reação de síntese. Mesmo que a reação de interesse seja a de síntese, o meio reacional deve apresentar uma quantidade de água suficiente para manter a conformação da enzima.

Além da atividade de água, outros fatores estão relacionados com o rendimento da reação enzimática como a temperatura, concentração de enzima utilizada, solvente e composição do meio reacional (XU, 2003). Outro fator que afeta as características do produto final é a regiosseletividade da enzima utilizada. No geral, as lipases comerciais utilizadas para reações de transesterificação ácida

como a Lipozyme RM IM e a Lipozyme TL IM, são conhecidamente 1,3 específicas.

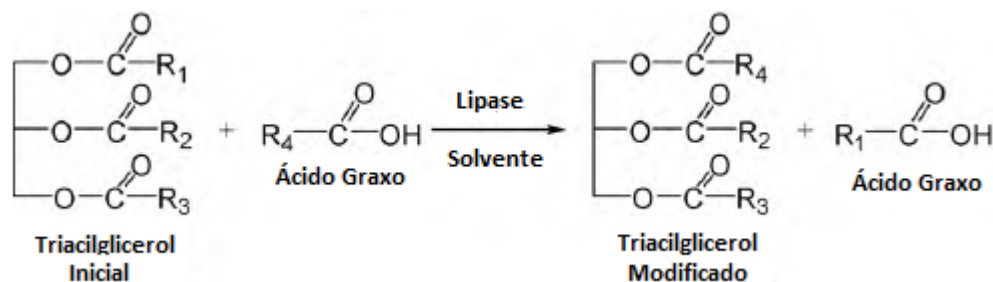


FIGURA 12 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA, CATALISADA POR LIPASES.

FONTE: RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010.

Entre os principais objetivos propostos pelos estudos relacionados à transesterificação ácida, destacam-se a incorporação de ácidos graxos ômega-3 e a redução do valor calórico das gorduras. Vários autores sugerem a utilização de óleos de baixo custo para a obtenção de produtos com maior valor agregado e características nutricionais interessantes.

Os ácidos graxos de cadeia curta ou média podem ser incorporados nas posições *sn* 1, 3 do triacilglicerol, utilizando lipases conhecidamente *sn* 1,3 específicas, facilitando a absorção dos ácidos graxos no trato intestinal (NUNES et al., 2011; FELTES, 2006; TURAN; KARABULUT; VURAK, 2006). Segundo Covas (2007), a ingestão do azeite de oliva virgem tem sido recomendada por proporcionar diversos benefícios à saúde como redução do colesterol e do efeito de doenças cardíacas. Este óleo não apresenta ácidos graxos de cadeia curta ou média em sua composição (Tabela 9) apresenta um alto conteúdo de ácido oléico (55,0-83,0 %) e de ácido linoléico (3,5-21,0 %), na posição *sn* 2 do triacilglicerol, o que torna interessante a inserção de ácidos graxos de cadeia curta

ou média por uma lipase *sn* 1,3 específica pois, além de reduzir o valor calórico do óleo de oliva, a sua digestão passa a ser facilitada por apresentar esses ácidos graxos nas posições *sn* 1,3 (NUNES et al., 2011).

Além disso, alguns autores (Tabela 10) têm adicionado ácidos graxos de cadeia média a um triacilglicerol que contenha ácidos graxos de cadeia longa na posição *sn* 2, para facilitar a absorção do TAG (GANDHI; MUKHERJEE, 2001; CAMACHO et al., 2007; JENNINGS; AKOH, 2001)

TABELA 9 - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE OLIVA.

Ácido graxo	Composição (%)
Ácido mirístico (C14:0)	< 0,05
Ácido palmítico (C16:0)	7,5 – 20
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,3 – 3,5
Ácido margárico (C17:0)	<0,3
Ácido heptadecanóico (C17:1)	<0,6
Ácido esteárico (C18:0)	0,5 – 5,0
Ácido oléico (C18:1)	55,0 – 83,0
Ácido linoléico (C18:2)	3,5 – 21,0
Ácido linolênico (C18:3)	<0,9
Ácido araquidônico (C20:0)	<0,6
Ácido eicosenóico (C20:1)	<0,4
Ácido behêmico (C22:0)	<0,2
Ácido lignocérico (C24:0)	<0,2

FONTE: Anvisa – Resolução 482

TABELA 10 - EXEMPLOS DA UTILIZAÇÃO DE LIPASES PARA A MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA (ACIDÓLISE).

Lipase	Substrato	Produto	Referência
Lipozyme RM IM e Novozym 435	Óleo de oliva, ácido cáprico e caprílico	25 % a 27 % de incorporação	Nunes et al. (2011)
Lipozyme RM IM	Tripalmitina e ácido cáprico	Mais de 40 % de inserção de ácido cáprico em tripalmitina	Foresti e Ferreira (2010)
Lipozyme TL IM	Óleo de palma, DHA e EPA.	TAG contendo CLA na posição <i>sn</i> -2 e ácido láurico nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3.	Osório et al. (2008).
Lipozyme RM IM	Óleo de girassol com os ácidos esteárico e palmítico	Incorporação de 60 % do ácido esteárico e 40 % de ácido palmítico ao óleo de girassol	Carrin e Crapiste (2008)
Lipozyme IM	Óleo de fígado de bacalhau, trioleína, ácido caprílico	56% de incorporação de ácido caprílico.	Camacho et al. (2007)
Lipozyme RM IM	Tripalmitina, EPA, DHA e ácido oléico	Até 6,9 % de incorporação de EPA e DHA e 41 % de ácido oléico em tripalmitina	Sahin et al. (2006)
Lipozyme RM IM Lipase de <i>C. rugosa</i> (CRL)	Tripalmitina, ácido oléico	49,4 % de incorporação do ácido oléico nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3 com Lipozyme e 37,7 % com CRL	Srivastava et al. (2006)
Lipozyme RM IM	Óleo de cártamo (safflower) e CLA	22,5 % de incorporação de CLA em 24 h.	Lee et al. (2004)
Lipase de <i>B. cepacia</i>	<i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3 dilaurina e dicaprilina, ácido oléico	50 % de incorporação de ácido oléico na posição <i>sn</i> -2.	Wongsakul et al. (2004)
Lipozyme IM60	Óleo de Palma, EPA e DHA	20,8 % de incorporação de EPA e 15,6 % de DHA em 24h.	Ramirez Fajardo et al. (2003)
Novozyme 435 Lipozyme IM Lipase PS-C	Tricaprilina, CLA	Maior incorporação de CLA por Lipozyme IM na posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -3 da tripalmitina e por Novozyme 435 em <i>sn</i> -2	Kim et al. (2001)
Lipase de <i>Carica papaya</i>	Tripalmitina, ácido caprílico	21 % de incorporação do ácido caprílico em tripalmitina após 24 h.	Gandhi e Mukherjee (2001)
Lipozyme IM	Óleo de peixe (<i>Brevoortia tyrannus</i>) e ácido caprílico	Produtos contendo 40 % de ac. caprílico 35 % de EPA e DHA e redução de 3 % do ac. caprílico na posição <i>sn</i> -2.	Jennings e Akoh (2001)

Lipozyme RM IM, Lipozyme TM, Lipozyme IM, Lipozyme IM60 - Lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipase *sn* 1,3 específica); Lipozyme TL IM - *Thermomyces lanuginosa* (Lipase *sn* 1,3 específica); Lipase B, Novozym 435 - *Candida antarctica* (Lipase *sn* 2 específica); Lipase PS-C - *Burkholderia cepacia* (Lipase não específica); CLA – ácido linoléico conjugado
EPA – ácido eicosapentaenóico ; DHA - ácido docosahexaenóico.

Sahin et al. (2006) sintetizaram lipídios estruturados semelhantes aos triacilgliceróis presentes no leite humano, enriquecidos com aproximadamente 7 % de ômega-3 (EPA e DHA), por meio de reações de acidólise enzimática entre a tripalmitina, óleo de avelã e uma solução concentrada de óleos marinhos contendo ácidos graxos n-3. Hamam e Shahidi (2008) observaram a incorporação de até 30 % de ácido oléico, LA, EPA e DHA em triestearina, utilizando cinco lipases regioespecíficas (Novozym 435, Lipozyme RM IM, PS-30, AP-12 e AY-30). Facioli e Gonçalves (1998) utilizaram uma lipase comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme TM) *sn* 1,3 específica para a obtenção de análogos da manteiga de cacau, pelo processo de interesterificação do óleo de piqui (*Caryocar brasiliense*) com ácido esteárico.

Osório et al. (2011) produziram lipídios estruturados utilizando óleo de oliva e ácido cáprico ou caprílico por transesterificação ácida, tendo como objetivo principal a redução do valor calórico do óleo de oliva. Os autores utilizaram lipases comerciais como catalisadores (Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435) em meio contendo *n*-hexano como cossolvente ou em meio livre de solvente. Após 24 h de reação, os autores verificaram uma maior incorporação de ácido cáprico ou caprílico em meio livre de solvente, chegando a 27 % de incorporação para o ácido cáprico e 25 % para o caprílico.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de lipases de *Rhizopus oryzae* e *Rhizopus microsporus* por fermentação no estado sólido e sua utilização na modificação de óleos vegetais, visando à produção de lipídeos estruturados ricos em ácidos graxos poliinsaturados da série n-3 e com baixo valor calórico.

3.1 Objetivos Específicos

- (1) Otimizar a produção de lipase por *R. oryzae* em fermentação no estado sólido;
- (2) Otimizar o processo de modificação de triacilgliceróis para inserção de ácidos graxos essenciais n-3 em óleos vegetais por interesterificação;
- (3) Otimizar o processo de modificação de triacilgliceróis para inserção de ácidos graxos de cadeia curta ou média em óleo de oliva, por transesterificação ácida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira parte deste trabalho foi realizada no Laboratório de Tecnologia Enzimática (LTEB) do Departamento de Química da UFPR e no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Energia Auto-Sustentável (NPDEAS) da UFPR. A otimização das reações de transesterificação e interesterificação foram realizadas no Instituto de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.

4.1 CULTIVO DE CEPAS LIPOLÍTICAS

4.1.1 Micro-organismos, Manutenção e Preparo dos Inóculos

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram *Rhizopus microsporus*, previamente selecionado como produtor de lipases em FES por Alberton et al. (2010) e caracterizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, UNICAMP), como *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM e *Rhizopus oryzae* ATCC 34612. Para manutenção, as cepas fúngicas foram inicialmente crescidas em meio ágar batata-dextrose (BDA) a 30°C, adicionadas de óleo mineral estéril e armazenadas a -18°C.

Para obtenção do pré-inóculo, as cepas de *R. microsporus* e *R. oryzae* foram crescidas em placas de Petri contendo BDA por sete dias, a 30 °C. Após esse período de incubação, os esporos foram coletados, suspensos em água destilada estéril contendo *Tween* 80 (0,01 % v/v) e submetidos à agitação magnética até a obtenção de uma suspensão homogênea. A concentração de

esporos na suspensão foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A concentração final de esporos utilizados para fermentação em estado sólido foi de $3,0 \times 10^7$ esporos por grama de sólido seco, enquanto para a fermentação submersa foi de $5,0 \times 10^7$ esporos/mL (ALBERTON et al., 2010).

4.2 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Com o objetivo de selecionar o melhor método de produção de lipases, as cepas fúngicas do gênero *Rhizopus* foram cultivadas tanto em fermentação submersa (FS) quanto em fermentação em estado sólido (FES).

Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio previamente esterilizado em autoclave por 15 min, a 120 °C e 1 atm. A inoculação desses meios de cultivo foi feita a partir da suspensão de esporos.

O meio de cultivo utilizado para o cultivo das cepas era composto por glucose (0,1 %); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 %); K_2HPO_4 (0,06 %); KH_2PO_4 (0,03 %); extrato de levedura (0,2 %) e 1 % de óleo de oliva como indutor. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30°C (*R. oryzae*) ou 40°C (*R. microsporus*) e 200 rpm por até 96 h.

A solução enzimática foi obtida por centrifugação do meio de cultivo durante 10 min a 10.000 *g*. O sobrenadante assim obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática pelo método do *p*NPP (item 4.5.2.1 a) ou titulométrico (item 4.5.2.1 b) e posteriormente liofilizado (liofilizador Jouan LP3® modelo 60, - 46°C).

4.3 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Após os experimentos iniciais, a técnica de fermentação no estado sólido foi selecionada para ser utilizada neste trabalho. O crescimento dos micro-organismos e a produção de lipase foram realizados utilizando farelo de semente de girassol e bagaço de cana como substratos, conforme descrito a seguir.

4.3.1 Preparo dos substratos

O bagaço da cana, fornecido pela Indústria Melhoramentos (Jussara, PR), foi peneirado para obtenção de partículas entre 1,7 mm e 1 mm. As sementes de girassol foram adquiridas no comércio local, trituradas em moinho elétrico, peneiradas e a granulometria adotada foi de 1,4 a 0,85 mm. A composição centesimal dos substratos foi determinada pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR). Para ambos os substratos, o resíduo mineral fixo e lipídios foram determinados segundo os métodos do Instituto Adolfo Lutz (2005), proteínas e fibras, segundo os métodos da AOAC (2005) e os carboidratos determinados de acordo com a Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003 (BRASIL, 2003).

O cultivo do fungo *R. microsporus* foi previamente otimizado por Alberton et al. (2010) que estabeleceram a razão de 1:3 (bagaço de cana:farelo de semente de girassol) como ideal para seu cultivo. Esta mesma razão foi utilizada nos ensaios de FES com este fungo neste trabalho.

O cultivo de *R. oryzae* em FES foi otimizado utilizando um delinamento estatístico, descrito no item (4.3.7), onde foram estudados os parâmetros razão

entre substratos, temperatura e umidade. Desta forma, a proporção dos substratos nos meios de cultura variou conforme os experimentos estabelecidos pelo delineamento. A solução umedecedora utilizada em todos os experimentos foi tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0.

4.3.2 Determinação da umidade dos substratos

A umidade inicial dos substratos antes dos cultivos, previamente embebidos em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0 e autoclavados, foi determinada em balança de infravermelho (Gehaka), utilizando-se 1 g de amostra.

4.3.3 Condições de cultivo para a fermentação em estado sólido

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 10 g de substrato umedecido. Os frascos foram esterilizados em autoclave, resfriados, inoculados com a suspensão de esporos e incubados a 30°C (*R. oryzae*) e 37°C (*R. microsporus*).

A produção de lipase nos cultivos foi determinada no extrato aquoso do sólido fermentado ou diretamente no sólido seco. Para o extrato aquoso, utilizaram-se os métodos espectrofotométrico (*p*NPP) e titulométrico; para o sólido fermentado, utilizou-se apenas o método titulométrico (itens 4.5.2.1). Em ambos os casos, a atividade lipolítica foi expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido seco (U.gSS⁻¹).

4.3.4 Preparo do sólido fermentado para utilização em reações de modificação de óleos e gorduras

Antes de ser utilizado diretamente no meio reacional, tanto para determinação da atividade como para utilização nos experimentos de modificação de triacilgliceróis, o sólido fermentado foi transferido para balões de fundo redondo, resfriado em congelador (-18°C) por 24 h e submetido à liofilização por mais 24 h a -40°C em um liofilizador Jouan LP3. O material obtido foi armazenado a 4°C. Para controle da estabilidade, amostras do sólido assim armazenado foram periodicamente coletadas para determinação da atividade.

4.3.5 Otimização do cultivo de *Rhizopus oryzae* em fermentação em estado sólido

Inicialmente, foi realizada uma cinética dos cultivos, avaliando-se a atividade lipolítica de hidrólise, utilizando tricaprilina e trioleína como substratos, e determinando-se a atividade de esterificação. Os cultivos foram mantidos por 72 h, tendo por objetivo principal selecionar o melhor tempo de cultivo para os ensaios seguintes.

Para a otimização da produção de atividade por *R. oryzae* foi utilizado um planejamento experimental 2^3 com o objetivo de determinar as melhores condições de produção da lipase. O planejamento utilizado foi elaborado contendo seis pontos axiais e quatro pontos centrais. As seguintes variáveis independentes foram estudadas: (1) temperatura de cultivo; (2) umidade do substrato e (3) proporção de substrato (Tabela 11). As faixas de variação das

variáveis basearam-se nos estudos de Alberton et al., (2010) para *R. microsporus*.

Nestes estudos, as fermentações dos cultivos foram analisados em termos de atividade lipolítica de hidrólise, medida pelo método titulométrico (item 4.5.2.1 b) utilizando um titulador automático pH Stat, tendo como substratos tricaprilina (1) ou trioleína (2), atividade de esterificação (3) (item 4.5.2.2 a) e produção de protease (4) (item 4.5.2.3).

TABELA 11 - VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³.

Nível	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Razão de substrato (bagaço de cana: semente de girassol)
-1,68	20	55	1 : 9
-1	26	61	2,6 : 7,4
0	35	70	1 : 1
+1	44	74	7,4 : 2,6
+1,68	50	90	9 : 1

4.4 APLICAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO EM REAÇÕES DE MODIFICAÇÃO DE GORDURAS

Os sólidos fermentados liofilizados produzidos por *R. microsporus* e por *R. oryzae* nas condições otimizadas (razão de substratos, temperatura, umidade, tempo de cultivo) foram utilizados diretamente como biocatalisadores nas reações de modificação de gorduras estudadas neste trabalho: interesterificação e transesterificação ácida. Todos os ensaios foram realizados à pressão atmosférica, em reatores cilíndricos de vidro com camisa de aquecimento, com circulação de água e temperatura controlada por meio de

um banho termostatzado (25 mL ou 50 mL), com agitação magnética (Figura 13).



FIGURA 13 - REATOR UTILIZADO EM REAÇÕES DE INTERESTERIFICAÇÃO E TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA.

4.4.1 Reações de Interesterificação

Visando otimizar a adição de um triglicerídeo contendo alto teor de  omega-3 (EPAX 4510TG) em bases utilizadas para margarinas, foram realizadas reações de interesterificação entre compostos tradicionalmente utilizados em sua produção - estearina de palma (PS) e óleo de palmiste (PK) e o EPAX 4510TG, utilizando os sólidos fermentados por *R. oryzae* e *R. microsporus* como catalisadores. O EPAX (EPAX Pharma UK Ltd.)   um produto comercial, com sua composição conhecida, contendo elevado teor de  -3 PUFA, apresentando 45 % de EPA e 10 % de DHA na forma de triacilgliceróis.

As reações de interesterificação foram realizadas em um reator cilíndrico (Figura 13), com o meio de reação (10 mL) composto por uma mistura ternária de PS, PK e "EPAX 4510TG". A mistura sólida foi previamente aquecida à temperatura reacional para liquefação. Em seguida, adicionou-se 0,3 g de sólido fermentado para iniciar a reação, que foi mantida durante 24 h na temperatura do ensaio, especificada pelo delineamento fatorial. Ao final, a mistura reacional foi aquecida a 70°C para remoção do sólido fermentado por filtração em papel filtro Whatman nº 1. O filtrado foi armazenado a -18 ° C para posterior análise.

Para otimização das reações de interesterificação, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 18 experimentos e quatro repetições do ponto central (GACULA & SINGH, 1984). As três variáveis independentes estudadas foram a concentração de PS, concentração de "EPAX 4510TG" e temperatura (Tabela 12). Para catalisar as reações, o sólido fermentado foi utilizado na concentração de 6 % (m/v). Após 24 h, o sólido fermentado foi removido do meio reacional e as amostras foram armazenadas como descrito anteriormente.

TABELA 12 - CONDIÇÕES UTILIZADAS NESTE TRABALHO PARA PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 .

Nível	Temperatura (°C)	Concentração de PS (%)	Concentração de EPAX 4510TG (%)
-1,68	56	38	06
-1	60	45	10
0	65	55	15
+1	70	65	20
+1,68	73	71	23

As temperaturas reacionais utilizadas variaram de 56°C a 73°C, a concentração de PS variou de 38 % a 71 %, A concentração de PK variou de 6 a 44% e a de EPAX 4510TG variou de 6 % a 23 % (Tabela 12).

A cinética das reações foi seguida por 30 h, retirando-se alíquotas de 5 mL em diferentes tempos. As amostras foram filtradas e armazenadas.

4.4.2 Reações de Transesterificação Ácida

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi estudar a inserção de ácidos graxos de cadeia curta ou média nas moléculas de triacilglicerol que compõem o óleo de oliva, por transesterificação ácida, com vistas à redução do seu valor calórico. Foram utilizados os sólidos fermentados por *R. oryzae* e por *R. microsporus*

Assim como as reações de interesterificação, as reações de transesterificação ácida foram realizadas em um reator cilíndrico, agitado magneticamente, com temperatura controlada (Figura 13). Cada meio de reação consistiu de 10 mL de uma mistura de ácido graxo e óleo de oliva e 0,3 g de sólido fermentado. Os ácidos graxos utilizados foram o ácido butírico, ácido caprílico, ácido cáprico e ácido palmítico.

Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^2 com doze experimentos, sendo quatro repetições do ponto central e quatro pontos axiais. As duas variáveis independentes estudadas foram a razão ácido graxo:óleo de oliva e temperatura (Tabela 13). No planejamento fatorial com o sólido fermentado por *R. oryzae* utilizaram-se os ácidos cáprico e caprílico, enquanto para *R. microsporus* utilizou-se apenas ácido cáprico.

Foram utilizados 0,3 g de sólido fermentado. Após 24 h, amostras de 5 mL foram retiradas, filtradas e armazenadas como descrito no item 4.3.1.

TABELA 13 - VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NOS PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAL 2².

Nível	Temperatura (°C)	Razão Ácido graxo: Óleo de oliva
-1,68	24	1,2:1
-1	30	2:1
0	45	4:1
+1	60	6:1
+1,68	66	6,8:1

4.4.3 Reutilização do sólido fermentado

As reações de interesterificação e transesterificação ácida foram repetidas por 7 e 6 vezes, respectivamente, utilizando-se o mesmo sólido fermentado. Após cada reação de 24 h, o produto foi escoado do reator e filtrado utilizando papel Whatman nº 1 como descrito no item 4.3.1. O sólido foi então reutilizado para as reações de interesterificação (4.4.1) e transesterificação ácida (4.4.2), utilizando a metodologia descrita anteriormente.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas no extrato lipolítico foi feita de acordo com o método proposto por Bradford (1976), onde 100 µL da amostra foram

adicionados a 1 mL da solução corante (solução de Bradford - Coomassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, 5 % (v/v) de etanol 95 % (v/v) e 10 % (v/v) de ácido fosfórico 85 % (m/v) em água). A mistura foi homogeneizada e a absorbância lida a 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina (BSA).

4.5.2 Métodos de dosagem da atividade

4.5.2.1 Atividade de hidrólise

(a) Método de hidrólise do *p*NPP

Este método, inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado por Lima et al. (2004), baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila pela enzima (Figura 14), em meio aquoso contendo surfactantes. A formação do *p*-nitrofenol (produto de hidrólise), de coloração amarela é quantificada a 410 nm.

O método consiste na preparação de duas soluções:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila em isopropanol (3 mg/mL);
- Solução B: tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 e surfactantes (polivinil álcool (PVA) 0,25 %).

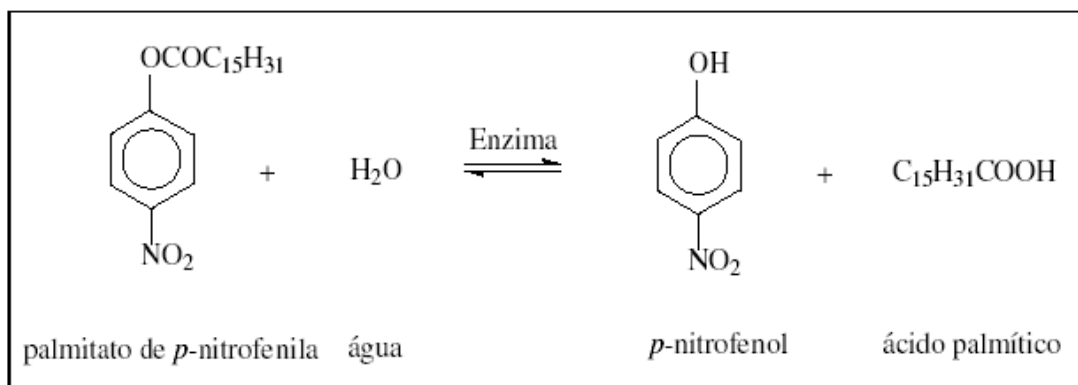


FIGURA 14 - REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PALMITATO DE *P*-NITROFENILA POR LIPASE, COM LIBERAÇÃO DE *P*-NITROFENOL E ÁCIDO PALMÍTICO.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que promove a liberação de 1 μmol de *p*-NP (*p*-nitrofenol) por minuto. A atividade enzimática será calculada a partir do coeficiente de absortividade molar do *p*-nitrofenol, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*-nitrofenol nas mesmas condições do ensaio. O coeficiente de extinção molar do *p*-NP em pH 7,0 ($9,78 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura de cada amostra.

(b) Método titulométrico

A determinação da atividade de lipases por titulometria foi realizada de acordo com o método proposto por Stuer et al. (1986), com modificações. O método baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis, na reação de hidrólise.

Foram utilizados como substratos, a trioleína (TC18), tricaprilina (TC8) e tributirina (TC4). Para todos os substratos, foi feita uma emulsão agitando-se 6,25% (v/v) do substrato ($0,06 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6,25% (m/m) de Triton-X 100, Tween

80 ou goma arábica e 74,5 % de tampão Tris-HCl 2,5 mM, pH 7,0 com 150 mM de NaCl. Volumes de 0,5 a 1 mL da solução enzimática ou 0,25 g de sólido fermentado foram adicionados em 20 mL da emulsão sob agitação magnética (300 rpm) a 37 °C; a reação foi seguida por 10 min. A solução foi titulada durante este intervalo de tempo em pH-Stat (titulador automático) com uma solução de NaOH 0,05 mol.L⁻¹, utilizada para manter o pH em 7,0. Por este método, uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min, a 37 °C. Para o sólido fermentado, a atividade é expressa como unidades de atividade enzimática por grama de sólido seco (U/gSS).

4.5.2.2 Atividade de esterificação

A síntese do oleato de etila foi realizada para determinar a atividade de esterificação dos sólidos fermentados utilizados. Para este ensaio utilizou-se 0,5 g do sólido fermentado, que foram adicionados ao meio reacional contendo 5 mL *n*-heptano, 70 mmol.L⁻¹ de ácido oléico e 210 mmol.L⁻¹ de etanol. A mistura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm e 37°C e acompanhada em diferentes intervalos de tempo pela retirada de alíquotas de 100 µL do meio reacional, que foram analisadas quanto ao seu teor de ácido oléico residual pelo método de Lowry-Tinsley (1976). A atividade de esterificação foi calculada a partir das velocidades iniciais da curva de desaparecimento do ácido graxo do meio reacional. A conversão em éster foi calculada através do consumo de ácidos graxos do meio reacional. Foi realizado também um controle sem a adição da enzima.

O método espectrofotométrico de Lowry-Tinsley (1976) mede a coloração do complexo azul-esverdeado (715 nm) formado entre os íons Cu^{+2} e os ácidos graxos, solúveis em fase orgânica. A concentração de ácido graxo no meio foi relacionada à absorbância por uma curva de calibração feita com o ácido graxo que será obtido na reação em *n*-heptano nas mesmas condições do ensaio.

Para o ensaio, foram adicionados 100 μl da amostra a ser analisada em tubos de ensaio contendo 1,15 mL de tolueno. Após agitação em vórtex por 20 s, adicionou-se o reativo de cor (250 μl), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) acertado previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex por 20 s e centrifugada por 10 min a 3000 g para separação das fases. A absorbância da fase orgânica deve ser lida a 715 nm.

4.5.2.3 Dosagem de Proteases

Para determinar a atividade de protease, 1 g de sólido fermentado foi adicionado em Erlenmeyers de 50 mL. Para extração enzimática, foi utilizada uma solução de NaCl 2 % como extratora. A solução e o sólido fermentado foram mantidos sob agitação por 1 hora a 37 ° C. A mistura foi então filtrada para remover os sólidos, e centrifugada a 5000 rpm por 10 min. Foram coletados 0,15 mL do sobrenadante e adicionados a 0,25 mL de solução composta por azocaseína (1 % m / v) em Tris-HCl, 0,1 M, contendo 0,001 M de CaCl_2 . Esta solução foi mantida incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de TCA 10 % para parar a reação. Após centrifugação (13000 rpm, 10 min), foram retirados 0,8 mL do sobrenadante e colocados em

tubos contendo 1,4 mL de NaOH 1M. A absorbância foi lida a 440 nm (LEIGHTON et al., 1973).

4.6 ANÁLISES DOS EXPERIMENTOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

4.6.1 Transesterificação ácida

Aproximadamente 200 µL de cada uma das frações retiradas foram separadas em cromatografia em camada delgada (CCD), metiladas pelo método de Christie (1989) e analisadas em cromatografia de camada gasosa (GC).

4.6.1.1 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Foram diluídas frações de 0,20 g de meio reacional em 25 mL de clorofórmio PA. Após, amostras de 200 µl foram aplicadas sobre placas de sílica preparativa (20 × 10 cm, Sílica gel F254, 0,25 mm de espessura, Merck, Darmstadt, Germany) e eluídas em fase móvel composta de *n*-hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1,5, v/v/v). As placas foram visualizadas em UV a 366 nm, utilizando 2,7-diclorofluoresceína (Sigma), como revelador. Os diferentes grupos de compostos (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres) foram identificados por comparação com padrões. A banda correspondente aos TAGs (Figura 15) foi coletada, hidrolisada e metilada de modo a permitir a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), por cromatografia de camada gasosa.

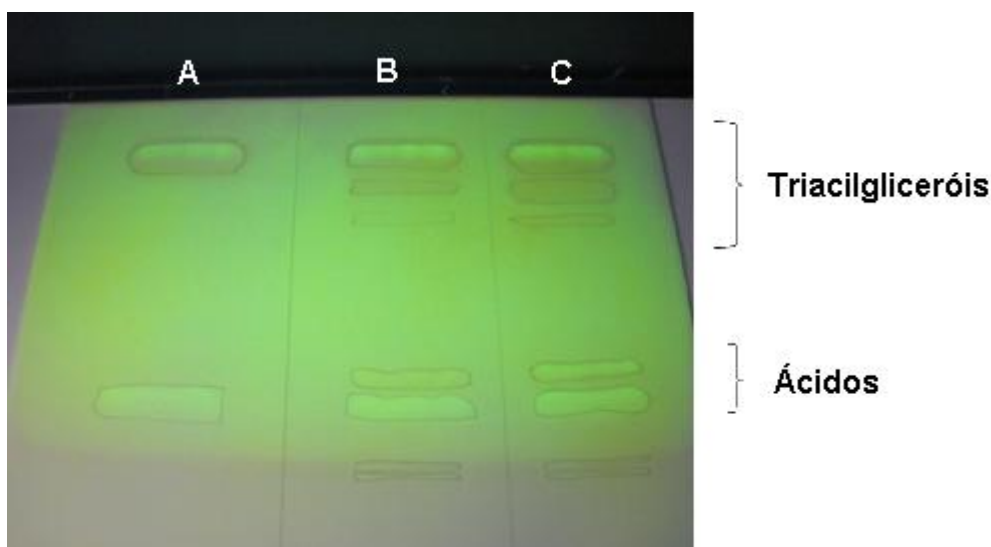


FIGURA 15 – PLACA DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA IDENTIFICANDO AS BANDAS CORRESPONDENTES A TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS. “A” CORRESPONDE AO INÍCIO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, “B” E “C” CORRESPONDEM AO PRODUTO FINAL DE REAÇÃO.

4.6.1.2 Metilação

Para a metilação, adicionou-se à sílica contendo TAGs, 5 mL do reagente de metilação (metanol anidro / *n*-hexano / ácido sulfúrico concentrado; 75/25/1, v / v / v). A mistura foi mantida em refluxo, durante 60 minutos em banho-maria a cerca de 80°C. Em seguida, 10 mL de água destilada e 10 mL de éter de petróleo foram adicionados e a mistura foi transferida para um funil de separação, que foi agitado vigorosamente e mantido em repouso para separação de fases. A fração orgânica foi recuperada, lavada duas vezes com água destilada (2 × 10 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O sulfato de sódio foi removido por filtração em papel Whatman nº 1, a solução foi transferida para um balão de 50 mL e o solvente foi evaporado em rotavapor a 30°C.

4.6.1.3 Análise por Cromatografia em Fase Gasosa

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram dissolvidos em 100 μ L de miristato de metila (padrão interno - 0,05% (m/v), em solução de *n*-hexano e 1 μ L dessa solução foi injetada em GC e analisada. O GC utilizado foi um Finnigan Trace GC Ultra cromatógrafo a gás (Thermo Electron Corporation), equipado com uma coluna capilar Thermo TR-FAME (30m x 0,25 mm ID $\times$ filme de 0,25 μ m), com amostrador automático AS 3000 da Thermo Electron Corporation e detector de ionização de chama.

Para análise, foi utilizado o modo splitless. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 250°C e 260°C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL / min. Ar e hidrogênio foram fornecidos para o detector a fluxos de 350 mL / min e 35 mL / min, respectivamente. Para a análise das amostras, a temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 60°C por 1 min, um aumento de temperatura para 150°C a 15°C / min, mantendo a temperatura por 1 min, seguido por aumento da temperatura para 180°C a uma velocidade de 5 °C / min, mantendo a temperatura a 180°C durante 3 min, aumentou-se então a temperatura até 220°C, a uma taxa de 10°C / min mantendo durante 1 min.

4.6.2 Interesterificação

As reações de interesterificação foram realizadas em reatores de 25 mL ou 50 mL. As condições reacionais iniciais foram: 70°C, agitação de 180 rpm. A atividade de interesterificação foi medida indiretamente analisando-se o teor de gordura sólida (SFC_{35°C}) de frações de 5 mL retiradas das reações. Além do

SFC_{35°C} foram analisados o conteúdo de ácidos graxos livres (AGL) e produtos de oxidação.

4.6.2.1 Teor de gordura sólida (SFC)

Princípio do método: A amostra é cristalizada a 0°C, atingindo um estado estável. Logo após, é aquecida até a temperatura que será utilizada para a análise (35°C). Quando o campo magnético do RMN estiver em equilíbrio, o sinal de relaxamento é medido após 12 e 70. O sinal após 12 é proporcional ao número de prótons na fase líquida e sólida. O sinal após 70 é proporcional ao número de prótons na fase líquida. O teor percentual do sólido presente é calculado automaticamente (FIEBIG e LUTTKE, 2003).

A interesterificação das misturas normalmente é quantificada pela determinação do teor de gordura sólida (% - m/m) a diferentes temperaturas ("Solid Fat Content", SFC). O conhecimento do SFC de uma gordura ajuda a caracterizá-la quanto ao seu estado físico durante as etapas de processamento. Os valores do SFC a 10, 20, 30 e 35°C (SFC_{10°C}, SFC_{20°C}, SFC_{30°C} e SFC_{35°C}) estão relacionados com o comportamento reológico das gorduras às temperaturas de armazenamento, embalagem, processamento e consumo, respectivamente. O SFC de uma gordura é avaliado por ressonância magnética nuclear, como definido pelos padrões internacionais (ISO 8292:1991; FIEBIG e LÜTTKE, 2003).

O teor de gordura sólida a 35°C (SFC_{35°C}) é particularmente importante para as margarinas de mesa pois está relacionado com a temperatura de consumo da margarina e a sua qualidade sensorial. Os valores do SFC_{35°C} das gorduras interesterificadas devem ser menores do que os das misturas iniciais,

e o mais baixo possível, a fim de evitar uma textura arenosa na margarina. Neste trabalho foi avaliado apenas o $SFC_{35^{\circ}C}$.

A análise das misturas interesterificadas foi feita por meio de um espectrômetro de RMN pulsado (Minispec P-20i, IBM) nos laboratórios da FIMA, Produtos Alimentares, Ltda. (Santa Iria de Azóia) (OSÓRIO et al., 2001). As amostras foram primeiramente derretidas a $60^{\circ}C$, mantidas a esta temperatura por cerca de 10 min. A temperatura foi, então, reduzida para $0^{\circ}C$ e mantida por 60 min e, finalmente, aumentada para $35^{\circ}C$ e fixada por 30 min. Após esse período as medidas de SFC foram realizadas (FIEBIG, 2003).

4.6.2.2 Ácidos graxos livres (AGL)

O teor de ácidos graxos livres do meio reacional foi determinado de acordo com o procedimento indicado por Perrin (1996), Sonntag (1982) e de acordo com a Norma Portuguesa de determinação da acidez em óleos e gorduras comestíveis (NP-903). O aumento da acidez durante as reações pode ocorrer devido ao primeiro passo da interesterificação enzimática, ou da reação competitiva de hidrólise (FERREIRA-DIAS e DA FONSECA, 1995).

Inicialmente foi preparada uma solução constituída por etanol a 95 % (previamente neutralizado) e éter dietílico na proporção de 1:1 (v/v), e neutralizada em seguida. Logo após 1 g de amostra (previamente fundida) foi transferida para um erlenmeyer e dissolvida em 30 mL da mistura inicial de etanol:éter dietílico. A solução foi então titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M e a acidez das amostras de gordura foi calculada, sendo expressa em percentagem (m/m) de ácido oléico livre:

$$A = (2,82 \times v)/m \quad (1)$$

onde “A” representa a acidez da gordura, “m”, a massa (g) da gordura e “v”, o volume (mL) da solução de NaOH 0,1 M gasto na titulação dessa amostra.

4.6.2.3 Produtos de oxidação

Durante o manuseio e acondicionamento, as margarinas, óleos e gorduras estão sujeitos à degradações resultantes da oxidação térmica, que levam a formação de cheiros e sabores pouco agradáveis.

A oxidação térmica da gordura foi avaliada indiretamente por absorvância em UV a 232 nm (Abs_{232nm}) e em 270 nm (Abs_{270nm}) de 1 % (m / v) da mistura em *iso*-octano (PERRIN, 1996; SONNTAG, 1982).

Considera-se que as absorvâncias correspondam à concentração de 1 g da gordura ou óleo em 100 mL da solução, no percurso óptico de 1 cm (Norma Portuguesa – 970).

Assim, a gordura foi solubilizada em *iso*-octano, pesando-se 0,1 g de amostra (previamente fundida a 80°C) em um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com *iso*-octano. As absorvâncias das amostras foram lidas a 232 nm e a 270 nm. A absorvância a 232 nm (Abs_{232 nm}) está relacionada com a presença de produtos de oxidação primários (iniciais), hidroperóxidos conjugados, e a absorvância a 270 nm (Abs_{270 nm}), com os produtos de oxidação secundários (finais), como ácidos graxos livres, aldeídos e cetonas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas do gênero *Rhizopus*, foram cultivadas em fermentação submersa e fermentação no estado sólido, conforme descrito nos itens 4.2 e 4.3. Após selecionar a fermentação em estado sólido como método de cultivo a ser utilizado no restante do trabalho, o cultivo do fungo *Rhizopus oryzae* foi otimizado e o sólido fermentado produzido foi utilizado diretamente no meio reacional, como catalisador para as reações de transesterificação ácida e interesterificação. O fungo *Rhizopus microsporus* também foi cultivado em FES, nas condições determinadas por Alberton et al. (2010) e utilizado como catalisador para as reações de interesterificação e transesterificação.

5.1 ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR CEPAS DO GÊNERO *Rhizopus*

As cepas do gênero *Rhizopus* utilizadas neste trabalho são reconhecidamente produtoras de lipases (ALBERTON et al., 2010; LORENZO et al., 2005; PABAI; KERMASHA; MORIN, 2005). Trabalhos anteriores de Alberton (2009) e Zago (2010) mostraram que a cepa de *R. microsporus* CPQBA 312-07 DRM apresentou atividade lipolítica em cultivos por fermentação submersa e fermentação no estado sólido, utilizando bagaço de cana e farelo de semente de girassol como substratos. Zago (2010) estudou a atividade de esterificação da mesma cepa, obtida por fermentação em estado sólido, com o objetivo de utilizá-la para a produção de biodiesel. Apesar disso, não foi realizado nenhum estudo prévio sobre a atividade de síntese utilizando esta cepa obtida por fermentação submersa. A caracterização da atividade

lipolítica e de síntese de *R. oryzae*, cultivado nos mesmos meios de FS e FES que foram utilizados para *R. microsporus* também não havia sido realizada. Por isso, neste trabalho, foram feitos estudos sobre a atividade lipolítica e de síntese dos cultivos em fermentação submersa, com a finalidade de caracterizar as cepas quanto à produção de lipases, e compará-las com as atividades obtidas por FES, com o objetivo de definir o melhor método de produção de lipases a ser utilizado no restante do trabalho.

5.1.1 Ensaios prévios de produção de lipases pelos fungos do gênero *Rhizopus* em fermentação submersa

As cepas do gênero *Rhizopus* foram inicialmente cultivadas em um meio de contendo extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio e óleo de oliva como fonte de carbono e indutor para a produção de lipases (item 4.2). A atividade lipolítica foi acompanhada pelo método de hidrólise do *p*NPP e pelo método titulométrico durante 72 h de cultivo.

Na Figura 15 observa-se o perfil de atividade lipolítica para os cultivos das duas cepas utilizadas. O máximo de atividade observado foi maior para *R. oryzae*: $9,1 \text{ U.mL}^{-1}$ e $6,5 \text{ U.mL}^{-1}$ equivalentes a atividades específicas de 29 e $21,4 \text{ U.mg}^{-1}$ (Tabela 13) para *R. oryzae*, e *R. microsporus*, respectivamente, contra tricaprilina, ocorrendo entre 12 h e 24 h.

Observou-se (Tabela 14) maior atividade dos extratos quando tricaprilina foi utilizada como substrato, o que pode ser devido à especificidade da enzima. Outro fator a considerar é a existência de diferentes isoformas da lipase no extrato, que podem apresentar diferentes especificidades com relação aos TAG's utilizados. Ressalta-se que Diyorov et al. (1994) relataram a presença de

três diferentes lipases extracelulares nos extratos de *R. microsporus*.

A atividade em trioleína, mesmo sendo menor do que a atividade observada em tricaprilina, tanto para *R. oryzae* quanto para *R. microsporus*, (em média $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$), mostra a presença de lipases verdadeiras no extrato bruto da cultura de ambos os fungos, uma vez que lipases verdadeiras, por definição, apresentam a capacidade de hidrolisar TAGs de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono) (BORNSCHEUER et al., 2002). Não foi observada atividade quando *pNPP* foi utilizado como substrato.

Os resultados de atividade para o mesmo gênero relatados na literatura podem ser bastante diferentes entre si, em parte devido às diferentes espécies, mas também devido às diferentes condições de cultura e metodologias utilizadas para determinação de atividade. Hiol et al. (2000), utilizaram o meio *corn steep liquor* para a produção de *R. oryzae*, por fermentação submersa. Após 4 dias de cultivo os autores observaram a atividade específica de 7 U.mg^{-1} e volumétrica de 120 U.mL^{-1} , contra trioleína. Rajendram e Thangavelu (2009) otimizaram as condições de cultivo para o micro-organismo *Rhizopus arrhizus* e observaram máxima atividade de $4,0 \text{ U.mL}^{-1}$, utilizando óleo de oliva como substrato.

Com o objetivo de verificar se o extrato lipolítico de *R. microsporus* e *R. oryzae* apresentavam atividade de síntese, os sobrenadantes dos cultivos foram centrifugados, liofilizados e a atividade de esterificação foi medida utilizando ácido oléico e etanol como substratos, em presença do cossolvente *n*-heptano. Entretanto, não foi verificada atividade de esterificação para nenhum dos extratos liofilizados. Isto pode ser devido à baixa estabilidade do extrato contendo a lipase livre em presença do substrato etanol, que pode

desnaturar a lipase por interação com a água necessária para manter a conformação tridimensional da enzima (YU et al., 2007; STRAATHOF e ADLERCREUTZ, 2000).

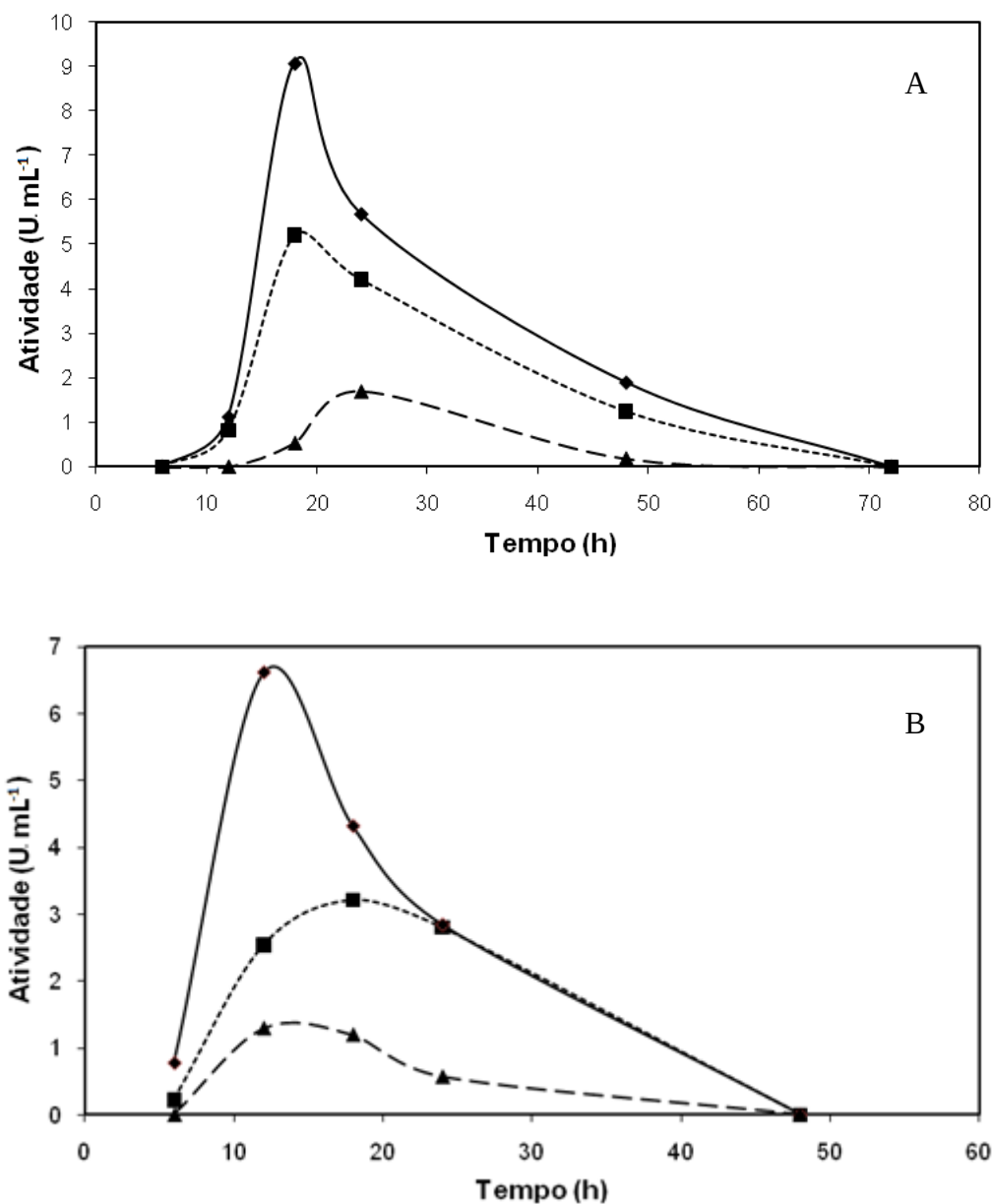


FIGURA 16 - PERFIL DE ATIVIDADE DE HIDRÓLISE COM OS SUBSTRATOS TRIBUTIRINA (♦), TRICAPRILINA (■) E TRIOLEÍNA (▲) UTILIZANDO *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 (A) E *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM (B) EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA.

Meio de cultura (m/v): glucose (0,1 %); MgSO₄·7H₂O (0,02 %); K₂HPO₄ (0,06 %); KH₂PO₄ (0,03 %); extrato de levedura (0,2 %) e 1 % de óleo de oliva. Condições do ensaio de atividade: temperatura 37°C (A) e 30°C (B), pH 7,0.

Em alguns casos, os álcoois de cadeia curta, como o metanol e o etanol, podem agir como inibidores da enzima, diminuindo sua atividade. A inibição é competitiva, pois ocorre a ligação de moléculas do solvente ao sítio ativo da enzima (AL-ZUHAIR et al., 2006; YADAV e DEVI, 2004).

TABELA 14 - ATIVIDADES ESPECÍFICAS DO EXTRATO BRUTO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 e *Rhizopus microsporus* CPQBA 312-07 DRM.

Triacilglicerol	<i>Rhizopus oryzae</i> (U.mg⁻¹)	<i>Rhizopus microsporus</i> (U.mg⁻¹)
Tributirina	16,8	10,4
Tricaprilina	29,3	21,4
Trioleína	5,4	4,2

Condições do ensaio de atividade: temperatura 37°C e pH 7,0.

Estes resultados levaram à busca de condições ideais de cultivo das cepas de *Rhizopus* e produção da lipase por fermentação no estado sólido. Christen et al. (1995), para fungos termotolerantes, mostraram que a fermentação em estado sólido (FES) fornece uma maior produção de lipases em comparação à FS. A atividade de hidrólise por eles obtida foi de 14 U.mL⁻¹ para FS e 95 U.gSS⁻¹, para FES. Segundo Diaz et al. (2006), esta vantagem pode ser atribuída ao aumento das taxas de crescimento de biomassa nesse meio e à atividade de proteases que ocorre tanto em FES quanto em FS mas é mais pronunciada em FS. Outro fator importante é a baixa disponibilidade de água na FES, que é mais adequada para o crescimento de fungos filamentosos do que para outros micro-organismos, pois a forma de crescimento e a fisiologia dos fungos favorecem a sua adaptação no ambiente com baixo teor de água (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2002).

5.1.2 Produção e caracterização do sólido fermentado por *Rhizopus microsporus*

Em ensaios prévios, observou-se que a atividade do sólido fermentado, utilizado diretamente no meio reacional, tanto de hidrólise quanto de síntese, era 60 % maior do que a do extrato bruto produzido a partir do sólido. Tendo em vista os melhores resultados obtidos com o sólido fermentado, para a continuidade do trabalho optou-se por utilizar a estratégia de adição direta do sólido fermentado no meio reacional para dosagens das atividades de hidrólise, de esterificação e para utilização nos processos de síntese (interesterificação e transesterificação ácida). Esta estratégia tem como principais vantagens a redução dos custos do processo biocatalisado pela exclusão de etapas desnecessárias como recuperação, extração e imobilização da enzima (SALUM et al., 2010; FERNANDES et al., 2007).

5.1.2.1 Perfil de atividades

A otimização da produção do sólido fermentado com atividade lipolítica para *R. microsporus* já havia sido previamente estudada por Alberton et al. (2010) e Zago (2010). Por isso, neste trabalho o sólido fermentado foi produzido de acordo com as condições pré-determinadas por Alberton et al. (2010) e caracterizado (Tabela 15). Observou-se atividade de hidrólise de 160 e 50 U.gSS⁻¹ contra tricaprilina e trioleína, respectivamente e atividade de esterificação de 7 U.gSS⁻¹, com uma percentagem de conversão em éster de

80 % após 1,5 h de reação. Este valor de conversão foi semelhante ao relatado por Zago (2010), que obteve 70 % em 1,5 h de reação.

TABELA 15 - CARACTERIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO PRODUZIDO POR *Rhizopus microsporus*.

Substratos	Atividade (U.gSS ⁻¹)
Ácido oléico e etanol (esterificação)	7 (±2)
Trioleína (hidrólise)	50 (±2)
Tricaprilina (hidrólise)	160 (±5)

Sólido fermentado produzido nas seguintes condições: bagaço de cana e semente de girassol na proporção de 1:3, 79 % de umidade, 37°C, tempo de cultivo de 18 h. Condições do ensaio de atividade: temperatura 37°C e pH 7,0.

5.1.2.2 Estabilidade ao armazenamento

Depois de liofilizado, o sólido fermentado produzido por *R. microsporus* foi armazenado à temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração, a 4°C. A atividade residual do sólido foi determinada durante 90 dias (Figura 17). Quando armazenado à temperatura de 4°C, o sólido fermentado praticamente manteve sua atividade de hidrólise ao longo do tempo, pois a diminuição da atividade não foi inferior a 5 %. Por outro lado, quando armazenado à temperatura ambiente, após 30 dias de armazenamento a atividade caiu 30 %. Estes resultados estão de acordo com os de Zago (2010), que relatou uma perda de atividade de apenas 15 % após 12 meses de armazenamento a 4°C. Portanto, o sólido fermentado foi armazenado a 4°C para utilização nos experimentos posteriores.

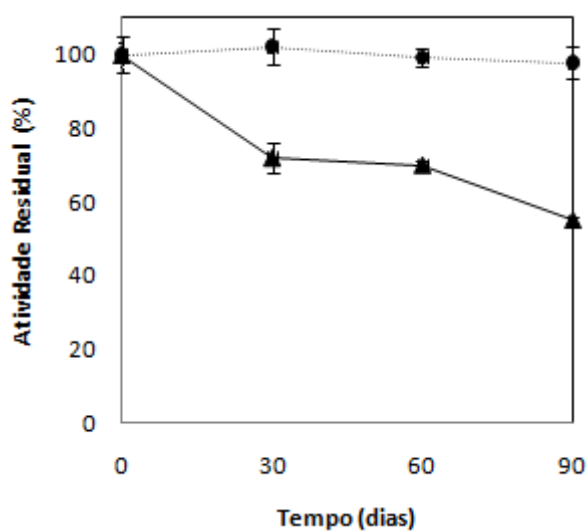


FIGURA 17 - ESTABILIDADE DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*, QUANDO ARMAZENADO À TEMPERATURA DE 4°C (●) E À TEMPERATURA AMBIENTE (▲).

5.1.3 Otimização do cultivo de *Rhizopus oryzae* em fermentação no estado sólido

5.1.3.1 Ensaios prévios

Nos ensaios prévios à otimização por delineamento fatorial foram utilizadas as condições de cultivo estabelecidas anteriormente para *R. microsporus*. Para tanto, foram realizados cultivos utilizando bagaço de cana e farelo de girassol na proporção de 1:3 e umidade inicial de 85 %, com incubação a 35 °C durante 72 h. A Figura 18 mostra as atividades de hidrólise contra trioleína e tricaprilina e as atividades de esterificação utilizando ácido oléico e etanol como substratos e *n*-heptano como cossolvente.

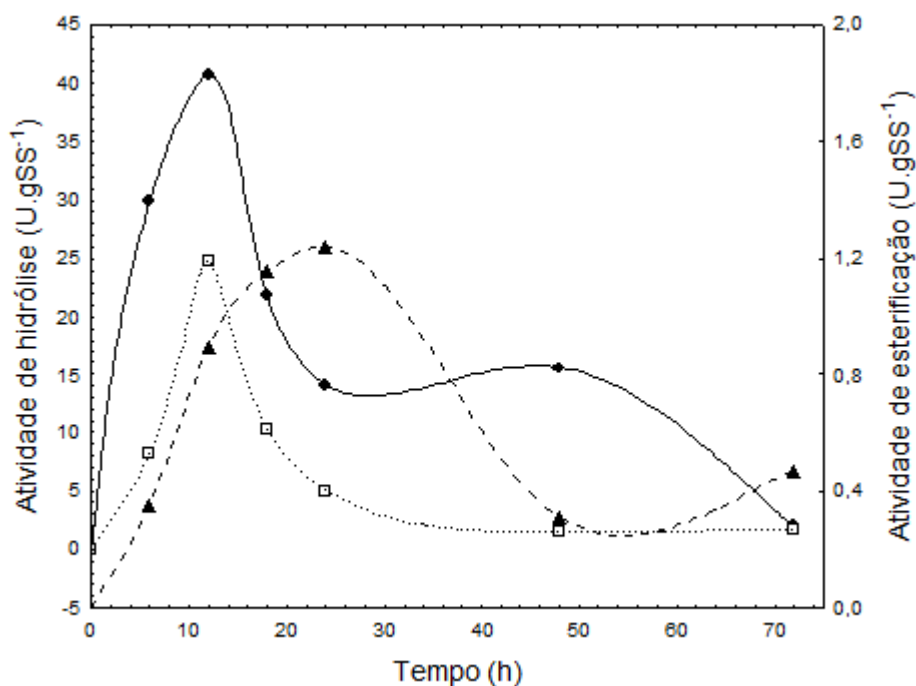


FIGURA 18 - PERFIL DE ATIVIDADES DE HIDRÓLISE E DE ESTERIFICAÇÃO DURANTE O CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO.

Condições do cultivo: umidade inicial de 85 %, proporção de bagaço de cana: sementes de girassol de 1:3, 35 °C. As atividades de hidrólise foram determinadas em pH Stat, utilizando tricaprilina (●) e trioleína (□). A atividade de esterificação (▲) foi determinada com ácido oléico e etanol e o cossolvente n-heptano, a 37 °C.

Observa-se na Figura 18 que a atividade de hidrólise aumentou até 12 h, atingindo 40 U.gSS⁻¹ para a hidrólise de tricaprilina e 24 U.gSS⁻¹ para a hidrólise de trioleína. Após o pico máximo de produção da lipase, houve uma redução brusca da atividade hidrolítica do sólido fermentado após 12 h, com uma queda de 65 % da atividade contra tricaprilina e de 80 % contra trioleína, o que pode ser atribuído à produção de proteases no meio. A atividade de esterificação foi maior após 24 h de fermentação, atingindo 1,2 U.gSS⁻¹. Este resultado sugere que diferentes lipases possam estar atuando nas reações de hidrólise e de síntese, como descrito por Diyorov et al. (1994), que relataram a presença de diferentes isoformas para as lipases de *R. microsporus*, tendo

evidenciado que a lipase intracelular, ligada à membrana, era a responsável pela atividade de esterificação.

Para confirmar a presença de proteases no sólido fermentado que pudessem degradar as lipases responsáveis pela atividade hidrolítica e, portanto, explicar a diminuição brusca da atividade (Figura 18), foi determinada a atividade proteolítica no extrato aquoso dos sólidos fermentados dos diferentes tempos de fermentação, de acordo com o método de Leighton et al., (1973), usando azocaseína como substrato (Figura 19).

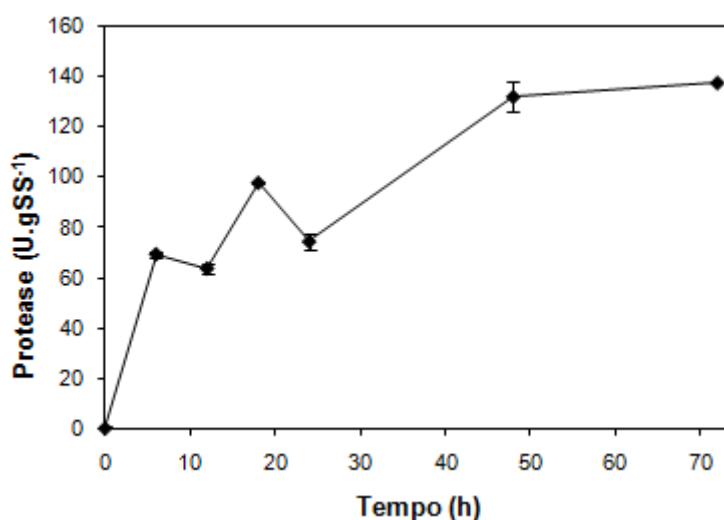


FIGURA 19. PERFIL DE ATIVIDADE DE PROTEASE DURANTE O CULTIVO DE *Rhizopus oryzae* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO. Condições do cultivo: umidade inicial de 85 %, proporção de bagaço de cana: sementes de girassol de 1:3, 35 °C. A atividade de protease foi determinada utilizando o extrato enzimático e azocaseína como substrato, a 37°C.

Na Figura 19 observou-se um aumento da atividade proteolítica durante a fermentação, com atividade de aproximadamente 60 U.gSS⁻¹ em 12 h de cultivo, o que indica que realmente pode ter ocorrido clivagem ou inativação da lipase extracelular pela ação de proteases.

A partir destes experimentos prévios foi determinado o tempo de 24 h de cultivo para ser utilizado nos experimentos do delineamento experimental, caracterizado como sendo o que apresentou maior atividade de esterificação,

uma vez que o principal objetivo do trabalho foi a utilização do sólido fermentado em reações de síntese (transesterificação ácida e interesterificação).

5.1.3.2. Otimização das condições de produção de lipases por *Rhizopus oryzae*

As variáveis independentes do planejamento experimental e seus níveis estão descritas na Tabela 16. O cultivo de *R. oryzae* foi otimizado utilizando um sistema 2^3 completo, contendo seis pontos axiais e quatro repetições do ponto central, totalizando 18 ensaios. As variáveis independentes estudadas foram a temperatura, de 20 °C a 50 °C, o teor de umidade inicial do substrato (55 % a 85 %) e a relação de massa dos substratos sólidos (bagaço de cana:semente de girassol, 1:9 a 9:1). Na Tabela 16 estão descritos os resultados experimentais das atividades de hidrólise em trioleína e tricaprilina, da atividade de esterificação e da porcentagem de conversão em éster. Analisando os resultados verifica-se que os valores experimentais foram semelhantes aos esperados, na maioria dos casos. Nesta tabela observa-se ainda que não houve aumento da atividade de hidrólise ou conversão em éster quando foi utilizada a temperatura de cultivo de 50°C (experimento 10).

I - Atividade de hidrólise, esterificação e conversão em éster

De acordo com a Tabela 16, os melhores resultados para as atividades de hidrólise foram obtidos utilizando temperatura de 26°C, umidade de 60 % e 26 % de bagaço de cana (razão 1:3 – bagaço de cana:farelo de semente de girassol). Para a atividade de esterificação e conversão em éster os melhores resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições reacionais, exceto para a umidade, que neste caso foi de 73 %.

TABELA 16 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS (Continua).

Cultivo	T (°C), X ₁	W (%), X ₂	CB (%), X ₃	Atividade esterificação		Conversão em éster		Hidrólise tricaprilina		Hidrólise trioleína	
				(U.gSS ⁻¹)		(%)*		(U.gSS ⁻¹)		(U.gSS ⁻¹)	
				Observado	Esperado	Observado	Esperado	Observado	Esperado	Observado	Esperado
				(Y ₁)	(Y)	(Y ₂)	(Y)	(Y ₃)	(Y)	(Y ₄)	(Y)
1	-1 (26)	-1 (61)	-1 (26)	5,8	5,8	90,1	89,7	234,7	202,3	109,6	95,9
2	+1 (44)	-1 (61)	-1 (26)	0	0,6	0	1,1	12,8	7,8	1,6	1,4
3	-1 (26)	+1 (73)	-1 (26)	6,1	5,2	95,5	87,0	156,1	142,6	96,4	85,0
4	+1 (44)	+1 (73)	-1 (26)	0	0	15,3	13,4	0	0	2,3	0
5	-1 (26)	-1 (61)	+1 (50)	3,3	3,1	45,2	47,0	72,9	63,8	28,2	22,4
6	+1 (44)	-1 (61)	+1 (50)	0	0,6	0	8,4	0,8	0	1,0	3,3
7	-1 (26)	+1 (73)	+1 (50)	3,7	2,8	35,8	34,2	50,6	38,6	24,8	16,0
8	+1 (44)	+1 (73)	+1 (50)	0,6	0,3	10,6	10,6	1,0	16,5	0,8	5,4
9	-1,68 (20)	0 (70)	0 (74)	4,9	5,8	85,2	89,1	142,5	174,1	64,1	83,3
10	+1,68 (50)	0 (70)	0 (74)	0	0	0	0	0	0	1,5	0
11	0 (35)	-1,68 (55)	0 (74)	3,9	3,1	55,3	48,4	29,2	50,6	13,2	19,2

* Conversão em éster (%) em 90 min de reação

T – Temperatura (°C); W – Umidade (%); CB – Concentração de bagaço de cana (%)

TABELA 16 - OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS (Conclusão).

Cultivo	T (°C), X ₁	W (%), X ₂	CB (%), X ₃	Atividade esterificação (U.gSS ⁻¹)		Conversão em éster (%)*		Hidrólise tricaprilina (U.gSS ⁻¹)		Hidrólise trioleína (U.gSS ⁻¹)	
				Observado (Y ₁)	Esperado (Y)	Observado (Y ₂)	Esperado (Y)	Observado (Y ₃)	Esperado (Y)	Observado (Y ₄)	Esperado (Y)
12	0 (35)	+1,68 (90)	0 (74)	1,2	2,3	42,2	47,9	14,1	16,5	5,0	11,8
13	0 (35)	0 (70)	-1,68 (10)	3,0	3,0	40,7	45,3	85,0	111,7	53,0	65,7
14	0 (35)	0 (70)	+1,68 (90)	0,8	1,1	13,0	7,1	18,6	15,6	9,1	9,3
15	0 (35)	0 (70)	0 (74)	4,6	4,7	80,1	77,5	92,9	98,8	64,8	65,3
16	0 (35)	0 (70)	0 (74)	4,7	4,7	75,9	77,5	111,7	98,8	67,6	65,3
17	0 (35)	0 (70)	0 (74)	4,7	4,7	75,4	77,5	97,6	98,8	64,6	65,3
18	0 (35)	0 (70)	0 (74)	4,8	4,7	80,6	77,5	97,6	98,8	66,3	65,3

* Conversão em éster (%) em 90 min de reação

T – Temperatura (°C); W – Umidade (%); CB – Concentração de bagaço de cana (%)

A análise de variância dos resultados (ANOVA) indicou que os modelos polinomiais de segunda ordem (Eq. 1 a 4) são estatisticamente significativos e adequados para representar a relação entre as respostas e as variáveis. Os valores determinados para os coeficientes (R^2) foram 0,93 para atividade de esterificação, 0,98 para conversão em éster e 0,95 para as atividades de hidrólise de tricaprilina e trioleína, indicando que entre 93 % e 98 % das variações podem ser atribuídas às variáveis independentes e apenas 2 % a 5 % não podem ser explicadas pelos modelos. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa para nenhum dos modelos propostos.

As equações foram representadas utilizando-se todos os termos do modelo (coeficientes significativos ou não) para evitar a possibilidade de erros na elaboração do modelo e evitar reduções no coeficiente de correlação R^2 . A seguir estão apresentadas as equações obtidas para conversão em éster, hidrólise de trioleína e tricaprilina.

$$Y_1 = 4,68 - 1,94X_1 - 0,24X_2 - 0,58X_3 - 0,73X_1^2 - 0,70X_2^2 - 0,93X_3^2 - 0,01X_1X_2 + 0,69X_1X_3 + 0,09X_2X_3 \quad (1)$$

$$Y_2 = 77,5 - 28,05X_1 - 0,13X_2 - 11,38X_3 - 12,51X_1^2 - 10,38X_2^2 - 18,18X_3^2 + 3,75X_1X_2 + 12,5X_1X_3 - 2,5X_2X_3 \quad (2)$$

$$Y_3 = 98,9 - 54,1X_1 - 10,2X_2 - 28,6X_3 - 5,6X_1^2 - 23,1X_2^2 - 12,5X_3^2 + 11,1X_1X_2 + 32X_1X_3 + 86X_2X_3 \quad (3)$$

$$Y_4 = 65,32 - 26,27X_1 - 2,21X_2 - 16,77X_3 - 9,25X_1^2 - 17,63X_2^2 - 9,85X_3^2 + 2,14X_1X_2 + 18,85X_1X_3 - 1,11X_2X_3 \quad (4)$$

As variáveis dependentes são representadas por Y_1 (atividade de esterificação), Y_2 (conversão em éster), Y_3 (hidrólise de tricaprilina) e Y_4 (hidrólise de trioleína). As variáveis independentes são representadas por X_1 , X_2 e X_3 , X_1 é o valor codificado da temperatura, X_2 , é o valor codificado para a

umidade, e X_3 é o valor codificado para a concentração de bagaço de cana presente no meio utilizado para a fermentação.

Para a conversão em éster, a análise de variância (Tabela 17) mostrou que os termos linear e quadrático foram significativos, mas apenas a interação entre temperatura e razão do substrato foi significativa ($p < 0,05$). Comparando-se os resultados obtidos pela conversão em éster e atividade de esterificação, foram observadas algumas diferenças quanto aos valores significativos. Enquanto para a conversão em éster apenas as interações entre temperatura e umidade (X_1X_2) e umidade e proporção de substratos (X_2X_3) não foram significativas, quando a atividade de esterificação foi utilizada como variável resposta, os fatores umidade (X_2) e a interação entre temperatura e proporção de substratos (X_1X_3) também não foram significativos ($p > 0,05$). Estas diferenças podem ser explicadas pela dificuldade de quantificação dos resultados nos tempos iniciais de reação, o que pode ter ocasionado erros no cálculo da atividade de esterificação, já que esta é calculada pela velocidade inicial da reação catalisada. Devido a isto, os resultados, em termos da significância das variáveis e seus efeitos, foram interpretados principalmente em termos de conversão em éster.

Para a atividade de hidrólise de tricaprilina, os termos quadráticos da temperatura e da proporção de substrato (bagaço de cana:semente de girassol) foram significativos ($p = 0,04$ e $0,03$, respectivamente), assim como o termo linear do substrato ($p = 0,0004$). Quanto às interações, somente a interação entre temperatura e proporção de substratos utilizados (concentração de bagaço de cana) e entre umidade e substratos foram significativas, com $p = 0,03$ e $0,005$, respectivamente. Para trioleína, todas as variáveis foram

significativas, com exceção do termo linear da umidade ($p = 0,51$) e as interações entre a temperatura e a umidade e substrato ($p = 0,62$) e umidade e proporção de substratos ($p = 0,79$).

TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 16).

	Hidrólise de trioleína		Hidrólise de tricaprilina		Conversão em éster	
Fator	coeficiente	p	coeficiente	p	coeficiente	p
Média	65,32	0,000004	107,93	0,0000002	77,50	0,000000
(X_1) Temperatura (L)	-26,27	0,000037	-2,34	0,531296	-28,05	0,000000
(X_2) Umidade (L)	-2,20	0,511207	0,18	0,959202	-0,13	0,000156
(X_3) Substratos	-16,77	0,000804	-20,64	0,000428	-11,38	0,000227
(B:G)(L)						
(X_1^2) Temperatura (Q)	-9,25	0,024395	-8,67	0,048605	-12,51	0,000156
(X_2^2) Umidade (Q)	-17,63	0,000750	0,21	0,954619	-10,38	0,000544
(X_3^2) Substrato	-9,84	0,000042	-12,03	0,030421	-18,18	0,000011
(B:G)(Q)						
(X_1X_2)	2,133	0,624897	-4,10	0,407103	3,75	0,149400
(X_1X_3)	18,85	0,002021	-12,30	0,034401	12,50	0,000714
(X_2X_3)	1,10	0,798324	17,37	0,005975	-2,50	0,318698

A análise dos efeitos das variáveis (Figura 20), baseando-se no valor de $p < 0,05$, mostrou que os termos lineares mais importantes foram a temperatura e a razão de substratos (concentração de bagaço de cana), indicando que, com o aumento da temperatura e da concentração de bagaço de cana no meio de fermentação, ocorre uma redução nas atividades de hidrólise e na conversão em éster. Isto pode ser explicado pela dependência do crescimento do micro-organismo e da atividade das enzimas em relação à temperatura utilizada na

fermentação e pela necessidade de uma fonte de lipídios que atuem como indutores para a síntese de lipases.

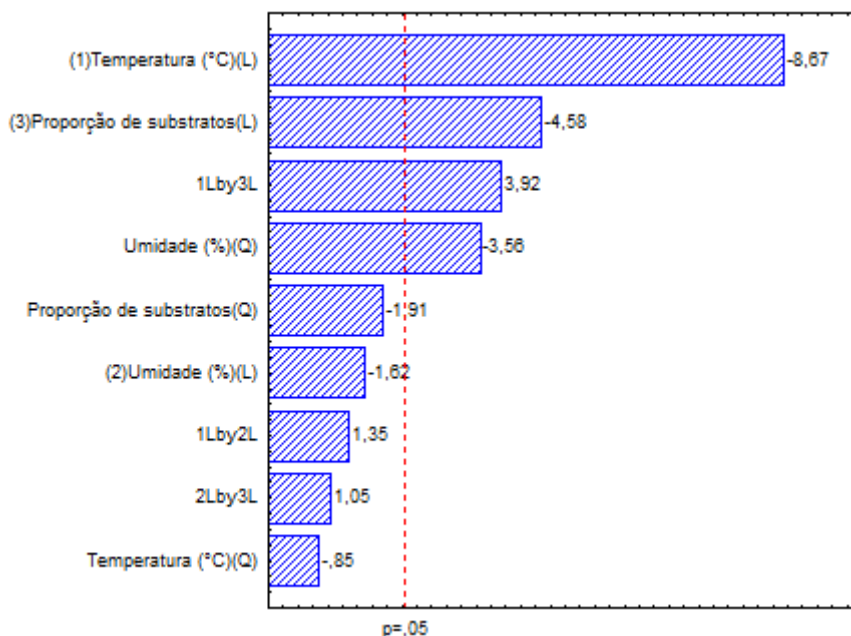


FIGURA 20 - EFEITOS DAS VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Rhizopus oryzae* EM FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, TENDO COMO VARIÁVEL RESPOSTA A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA.

Os modelos propostos para a atividade de hidrólise utilizando tricaprilina e trioleína como substrato e conversão em éster (%) foram significativos, com valores de F maior do que os tabelados (14,61; 17,39 e 49,75 respectivamente) (Tabelas 18 e 19). Para a atividade de hidrólise de tricaprilina e atividade de esterificação, o valor de F foi três vezes maior do que o valor tabelado. Para atividade de hidrólise de trioleína, quatro vezes maior e para a conversão em éster, o valor de F foi quatorze vezes maior do que o valor tabelado, indicando que o modelo foi significativo ao nível de 95 % de confiança.

TABELA 18 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS DADOS OBSERVADOS PARA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA E TRIOLEÍNA.

	Atividade de hidrólise - Trioleína			Atividade de hidrólise - Tricaprilina		
	Regressão	Resíduos	Total	Regressão	Resíduos	Total
Soma dos quadrados	22036,51	1127,38	23163,89	69859,85	4248,01	74107,86
Graus de liberdade	9	8	17	9	8	17
Média	2448,50	140,92		7762,20	531,00	
F _{calc}	17,39			14,61		
p-valor	<0,000026			<0,000026		

F 9;8;0,05 = 3,39; R² 0,95

TABELA 19 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA OBSERVADA PARA CONVERSÃO EM ÉSTER (%)

Fonte de variância	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F _{calc}	p-valor
Regressão	19798,28	9	2199,80	49,75	<0,000005
Resíduos	353,81	8	44,22		
Total	20152,09	17			

F 9;8;0,05 = 3,39; R² 0,98

A partir desses dados, foi possível construir uma superfície de resposta para cada modelo. Na Figura 21 (A, B) observa-se a superfície de resposta para a atividade de hidrólise de trioleína e tricaprilina, respectivamente. O perfil da superfície de resposta é semelhante para ambos os substratos. Não foi observado um ponto de máximo dentro da região experimental, mas é possível estipular uma condição de produção do sólido fermentado onde pode ser obtida a maior atividade de hidrólise contra ambos os substratos (aproximadamente 380 U.gSS⁻¹ para tricaprilina e 150 U.gSS⁻¹ para trioleína). Para tanto, é necessária a utilização da menor concentração de bagaço de cana (10 %), umidade de 70 % e temperatura de cultivo de 26°C para ambos os substratos.

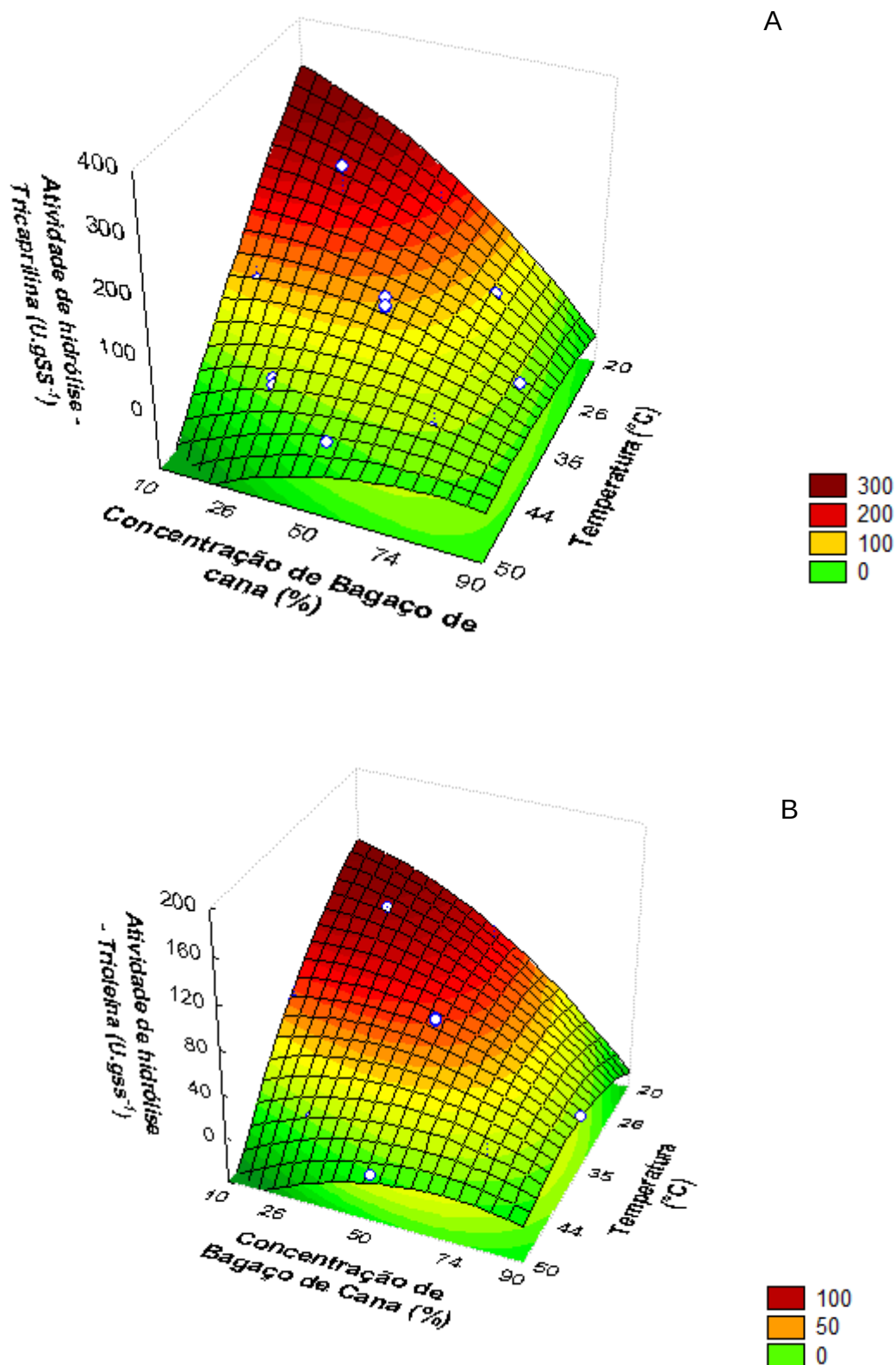


FIGURA 21 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DE TRICAPRILINA (A) E TRIOLEÍNA (B) CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*.

A variável umidade (%) foi mantida constante em 70 %.

Ao contrário das superfícies de resposta obtidas anteriormente, o perfil da superfície de resposta para a conversão em éster (Figura 22) apresenta a região considerada ótima, com o ponto máximo em seu centro. Foi possível definir as melhores condições para atingir-se o máximo de conversão em éster, (em torno de 100%) como sendo entre 26°C e 30°C, umidade de 70 % e proporção de substratos de 1:3 em massa (bagaço de cana: farelo de semente de girassol).

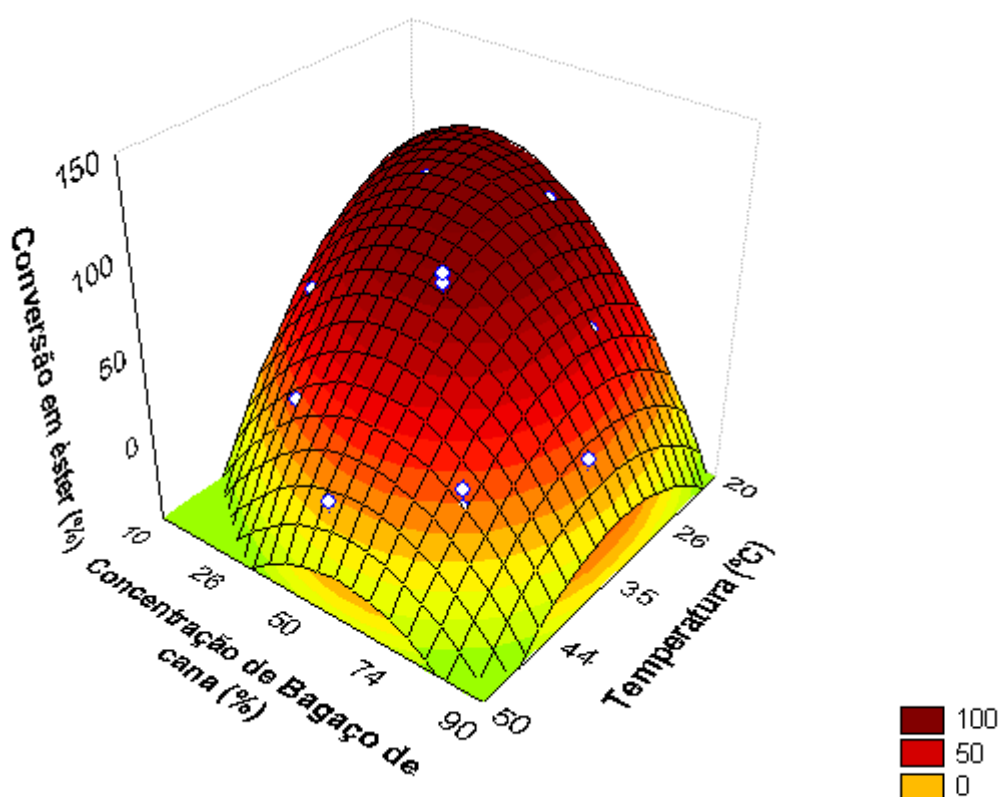


FIGURA 22 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA CONVERSÃO EM ÉSTER (B) CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*. A variável umidade (%) foi mantida constante em 70 %.

Os resultados mostraram que, para as reações de esterificação em presença de cossolvente, houve conversão de 100% após 90 min, utilizando-se uma razão molar de 1:6 (ácido: álcool). Estes resultados são promissores, pois os relatados para sistemas similares são, em geral, menores. Salum et al. (2008) observaram conversão em éster de 100 % após 3 h de reação,

utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 imobilizada em Accurel, usando uma razão molar 1:3 (ácido: álcool). Pires Cabral et al. (2010) observaram uma conversão de 80 % em 36 h, utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poliuretano utilizando uma proporção molar de 1:1.

Comparando-se as melhores condições de produção para as atividades de hidrólise e para a conversão em éster, observa-se que estas são similares, com exceção às razões dos substratos bagaço de cana e semente de girassol, que, para a variável atividade de hidrólise foi menor, ou seja, a produção de atividade hidrolítica deverá ser mais alta quando a fonte mais rica em lipídeos e proteínas (Tabela 10, em Materiais e Métodos), o farelo de semente de girassol, está presente em maior quantidade (90 % + 10 % de bagaço de cana). Por outro lado, para a variável conversão em éster, os resultados mostraram que os melhores resultados poderão ser obtidos quando a razão é de 1:3 (75 % de semente de girassol + 25 % de bagaço de cana). Estes resultados podem indicar que as lipases responsáveis pela atividade de hidrólise, que seriam extracelulares, seriam mais expressas quanto maior for a disponibilidade do óleo presente no substrato de fermentação.

A diferença apresentada entre os perfis de atividade de hidrólise (Figura 21) e conversão em éster (Figura 22) observados nas superfícies de resposta e as diferenças no tempo de produção do pico máximo das atividades de hidrólise e esterificação dos ensaios prévios (Figura 18) sugerem a presença de mais de uma lipase no sólido fermentado. Este fenômeno já foi descrito anteriormente para cepas do gênero *Rhizopus* sp. Sun et al. (2009) observaram um comportamento cinético semelhante para a hidrólise de óleo de oliva e para a síntese de caprilato de etila utilizando o micélio de *R. chinensis*.

Para definir a localização da enzima que estava ativa nas reações de síntese, eles extraíram lipases intracelulares e ligadas à membrana celular. Constataram que 93 % da atividade de síntese total estava ligada à membrana celular. Num outro trabalho (Hama et al., 2007), células de *R. oryzae* produziram uma lipase (ROL34) com uma massa molecular de 34 kDa, ligada à parede celular e outra (ROL31) com 31 kDa, ligada à membrana celular. Os autores sugerem que ROL31 origina-se da clivagem do resíduo N-terminal da ROL34. Também observaram que a atividade de síntese intracelular está relacionada com a quantidade de lipase ligada à membrana, sugerindo que ROL31, localizada na membrana, tem um papel fundamental na atividade de metanólise celular de *R. oryzae*. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a atividade de síntese pode estar relacionada à lipases distintas. Estes são resultados inéditos e que precisam ser confirmados em experimentos futuros, fazendo-se a extração e a caracterização das lipases responsáveis pelas diferentes atividades no sólido fermentado.

II - Atividade de Proteases

Outra variável resposta avaliada no delineamento fatorial foi a atividade proteolítica, considerando que esta é importante para a estabilidade da atividade de lipases do sólido fermentado, devendo ser responsável pela queda de atividade observada na Figura 18 após o pico máximo de produção de lipases. Assim, sendo, a utilidade do modelo matemático seria de encontrar condições de cultivo onde a produção de lipases fosse máxima e a de proteases, mínima.

TABELA 20- OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Rhizopus oryzae* ATCC 34612 POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS PARA ATIVIDADE DE PROTEASE (U.gSS⁻¹).

Temperatura (°C) (X ₁)	Umidade (%) (X ₂)	Concentração de bagaço de cana (%) (X ₃)	Atividade de protease (U.gSS ⁻¹) observada	Atividade de protease (U.gSS ⁻¹) esperada
-1 (26)	-1 (61)	-1 (26)	118,7	111,2
1 (44)	-1 (61)	-1 (26)	127,8	139,3
-1 (26)	1 (73)	-1 (26)	87,1	85,0
1 (44)	1 (73)	-1 (26)	106,9	96,7
-1 (26)	-1 (61)	1 (50)	54,7	59,7
1 (44)	-1 (61)	1 (50)	41,7	38,6
-1 (26)	1 (73)	1 (50)	119,7	103,1
1 (44)	1 (73)	1 (50)	63,2	65,6
-1,68 (20)	0 (70)	0 (74)	77,3	87,3
1,68 (50)	0 (70)	0 (74)	82,4	79,5
0 (35)	-1,68 (55)	0 (74)	114,3	108,2
0 (35)	1,68 (90)	0 (74)	95,6	108,8
0 (35)	0 (70)	-1,68 (10)	106,2	108,6
0 (35)	0 (70)	1,68 (90)	34,5	39,2
0 (35)	0 (70)	0 (74)	108,9	107,9
0 (35)	0 (70)	0 (74)	109,3	107,9
0 (35)	0 (70)	0 (74)	22,2	107,9
0 (35)	0 (70)	0 (74)	92,6	107,9

Na Tabela 20 são mostrados os resultados obtidos e os esperados para atividade de protease, que foi determinada no extrato aquoso bruto do sólido fermentado utilizando azocaseína como substrato. Foi realizada análise de variância (ANOVA) e os coeficientes foram determinados (Tabela 21). O coeficiente de correlação foi de 0,89, e a regressão total foi significativa ao nível de 0,01% ($p = 0,000$). A falta de ajuste do modelo foi não significativa, o que mostra que o modelo é adequado à previsão de resultados. O único termo linear significativo foi a razão entre os substratos ($p = 0,0081$), mostrando que um aumento da concentração de bagaço de cana leva a uma diminuição da atividade de proteases, uma vez que o outro substrato, farelo de semente de girassol, é rico em proteínas (18 %) e induz a produção de proteases no meio.

Consequentemente, os termos de interação da variável linear significativa com a temperatura e a umidade também se mostraram significativos ao nível de 5 % ($p = 0,05$ e $0,02$, respectivamente). A partir da análise de variância (ANOVA) foram obtidos os coeficientes que permitiram a construção da equação modelo (Eq. 5):

$$Y_5 = 107,93 - 2,34X_1 - 0,19X_2 - 20,64X_3 - 8,67X_1^2 + 0,22X_2^2 - 12,04X_3^2 - 4,10X_1X_2 + 12,30X_1X_3 - 0,0134X_2X_3 \quad (5)$$

Como o modelo proposto para a atividade de protease foi significativo, com o valor de F maior do que o tabelado (Tabela 21) foi possível construir uma superfície de resposta, que indica uma menor produção de proteases com o aumento da concentração de bagaço de cana e redução da concentração de semente de girassol (Figura 23).

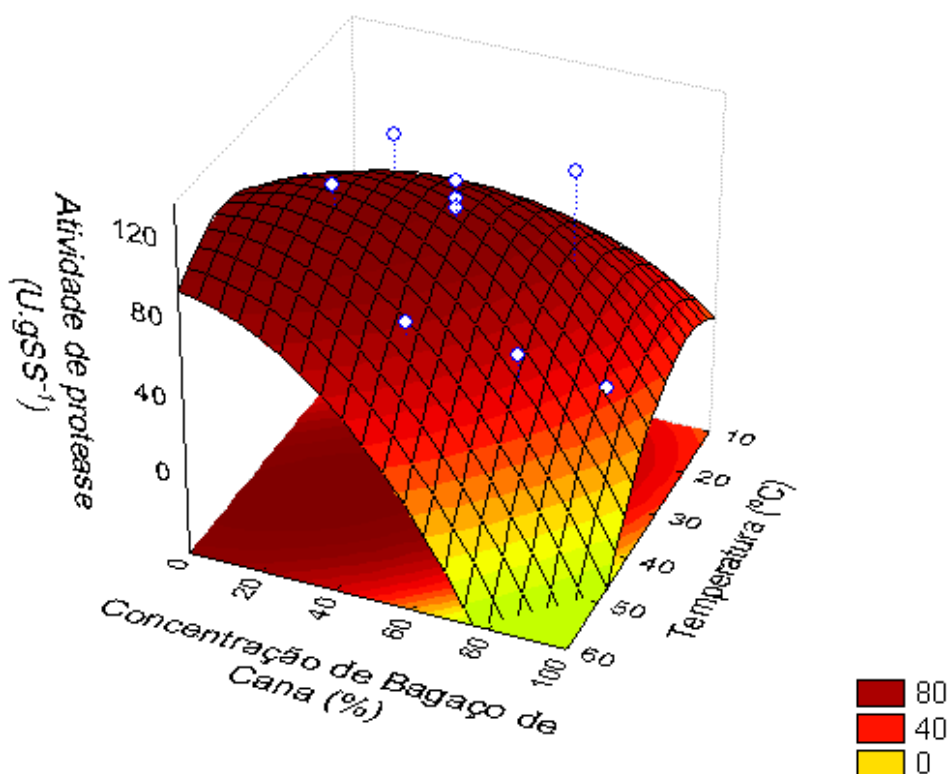


FIGURA 23 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA ATIVIDADE DE PROTEASE CATALISADA POR SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*. A variável umidade (%) foi mantida constante em 70 %.

TABELA 21 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ PARA ATIVIDADE DE PROTEASE (U.gSS⁻¹) (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 19).

Fonte	Coeficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	107,93	12174,20	9	12174,20	7,69	0,00**
T	-2,34	75,20	1	75,20	0,51	0,52
U	0,19	0,49	1	0,49	0,01	0,95
PS	-20,64	5813,94	1	5813,94	39,54	0,01**
T ²	-8,67	948,90	1	948,90	6,45	0,08
U ²	0,22	0,61	1	0,61	0,01	0,95
PS ²	-12,04	1828,22	1	1828,22	12,43	0,03*
T×U	-4,10	134,48	1	134,48	0,91	0,40
T×PS	-12,30	1210,32	1	1210,32	8,23	0,05
U×PS	-0,01	2415,12	1	2415,12	16,43	0,02*
Resíduos		1405,35	8			
Falta de ajuste		964,30	5	192,86	1,31	0,43
Erro puro		441,05	3	147,02		
Total		13579,55	17			

R² = 0,89; F_{5;8;0,05} = 3,23; *Significante ao nível de 5 %. ** Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura; U: Umidade; PS: Proporção de substratos.

Assim, para minimizar a produção de proteases no sólido fermentado é necessária uma concentração de bagaço de cana no meio entre 80 a 100 % e uma temperatura de 60°C. Infelizmente, nessas condições a produção de lipases também é afetada, o que pode ser verificado tanto para a atividade de hidrólise (Figura 21) como para a conversão em éster (Figura 22), onde se observa que as melhores condições são obtidas quando se utiliza entre 10 a 25 % de bagaço de cana. Portanto, para manter o nível de proteases produzidas no mínimo, é recomendável não utilizar altas concentrações de farelo de semente de girassol.

A produção de proteases durante os cultivos em fermentação no estado sólido tem sido freqüentemente relatada. Segundo Chutmanop et al. (2008), a produção de proteases tende a ser maior na fermentação em estado sólido do que na fermentação submersa. Raulf et al. (2010) avaliando a produção de proteases pelo fungo *R. oligosporus*, utilizando farelo de girassol como substrato, observaram uma produção máxima em 12 h de fermentação, com atividade de 1500 U.gSS⁻¹, utilizando tricaprilina como substrato, a 30°C. Mateos Diaz et al. (2006) estudaram a produção de lipase pelo fungo termotolerante *R. homothallicus* por FES, utilizando como substrato o bagaço de cana em um meio de sais com óleo de oliva, também observaram uma redução de atividade após 24 h de fermentação, que os autores atribuíram à ação de proteases no meio.

Como o principal objetivo do trabalho era utilizar o sólido fermentado em reações de síntese, a condição de fermentação utilizada para dar continuidade aos experimentos foi 70 % de umidade, razão de substratos de 1:3 (bagaço de

cana: semente de girassol) e temperatura de fermentação de 30°C, condição esta que favorece a produção da atividade de esterificação.

5.1.4 Validação dos resultados de otimização da produção de lipases por *Rhizopus oryzae* por fermentação no estado sólido

Ao final do estudo de otimização da produção de lipases por *R. oryzae* em FES, foi realizado um ensaio de validação dos resultados utilizando as condições de cultivo consideradas ideais para a atividade de esterificação, citadas acima. Os experimentos foram realizados em duplicata e as reações de esterificação foram acompanhadas por 72 h.

Os resultados iniciais, antes da otimização (Figura 18), foram obtidos nas condições de umidade inicial de 85 %, proporção de bagaço de cana: farelo de sementes de girassol de 1:3, 35 °C, e o modelo matemático mostrou que, utilizando as condições otimizadas, com umidade e temperatura menor do que as utilizadas inicialmente, poderia haver um aumento significativo das atividades de esterificação do sólido fermentado, o que pode ser observado na Figura 24.

Portanto, os resultados de validação do modelo matemático foram confirmados e mostraram a validade da otimização do meio de cultivo para *R. oryzae*, pois foi possível aumentar em aproximadamente 10 vezes a atividade de esterificação inicial, mostrada na Figura 18 (12 U.gSS^{-1} e $1,2 \text{ U.gSS}^{-1}$), com uma percentagem de conversão em éster de aproximadamente 98 % utilizando o sólido fermentado com 24 h de cultivo (Figura 24).

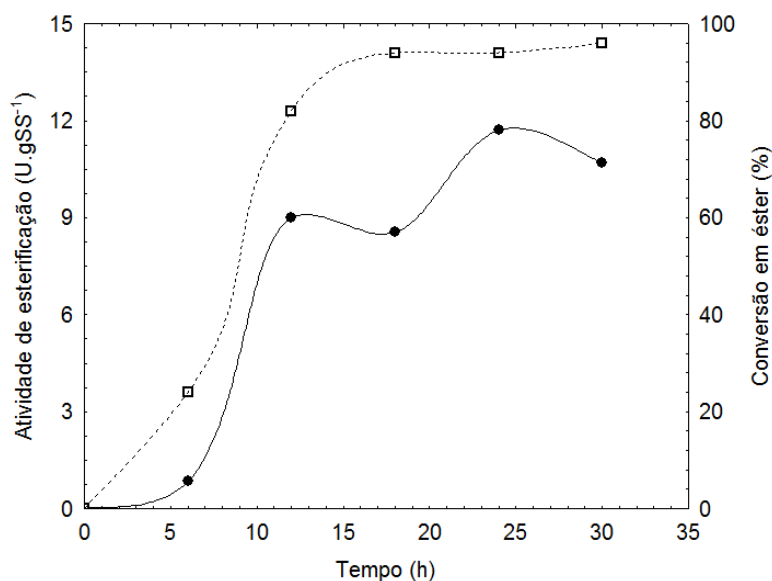


FIGURA 24 - CINÉTICA DA ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO (●) E CONVERSÃO EM ÉSTER (□), UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae* EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO.

Condições: umidade inicial de 70 %, proporção de bagaço de cana: farelo de semente de girassol de 1:3, 30 °C.

Além das atividades de esterificação e percentagens de conversão em éster, foram quantificadas as atividades de hidrólise de trioleína e tricaprilina do sólido fermentado, cujas condições de produção, mesmo não sendo as ideais para a produção de atividade hidrolítica sugeridas pelo planejamento experimental, apresentaram aumento de aproximadamente duas vezes o valor da atividade de hidrólise inicial, quando tricaprilina (78 U.gSS⁻¹) foi utilizada como substrato. Nessas condições o modelo matemático tinha previsto uma atividade máxima de hidrólise de tricaprilina de 100 U.gSS⁻¹ e de hidrólise de trioleína, de 50 U.gSS⁻¹.

Ainda conforme previsão do modelo, a atividade proteolítica mostrou-se elevada, chegando a 104 U.gSS⁻¹, após 24 h de fermentação, semelhante à atividade prevista pelo modelo (110 U.gSS⁻¹) (Figura 25).

Nesta parte do trabalho, foi possível otimizar as condições utilizadas para a produção de lipases por *R. oryzae*, em fermentação no estado sólido,

tendo como variáveis independentes a atividade de hidrólise (de trioleína e tricaprilina) e conversão em éster. As condições otimizadas, selecionadas para dar continuidade ao trabalho foram: 70 % umidade inicial, proporção de bagaço de cana: semente de girassol 1:3 e temperatura de 30 °C, consideradas as melhores para conversão em éster.

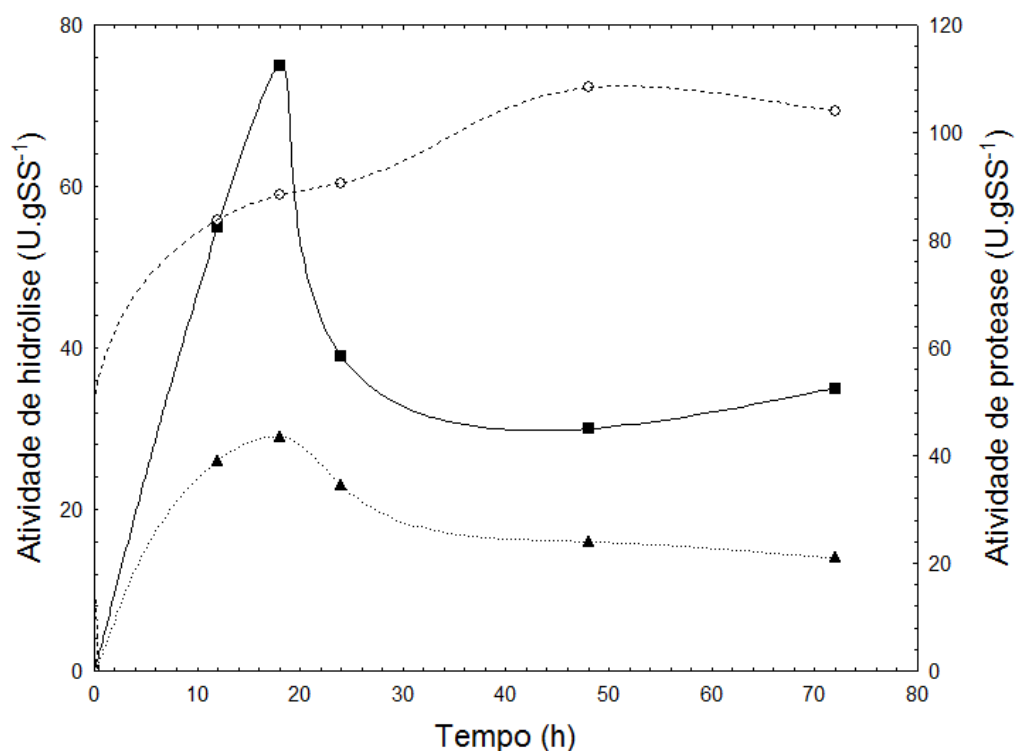


FIGURA 25 - CINÉTICA DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE UTILIZANDO TRICAPRILINA (■) E TRIOLEÍNA (▲) COMO SUBSTRATOS E ATIVIDADE DE PROTEASE (○), UTILIZANDO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae* EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO.

Condições: umidade inicial de 70 %, proporção de bagaço de cana: farelo de sementes de girassol de 1:3, 30 °C.

5.2 ESTUDOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR INTERESTERIFICAÇÃO

Nesta parte do trabalho, foram utilizados os sólidos fermentados por *R. microsporus* e de *R. oryzae* para catalisar reações de interesterificação em ambiente livre de solventes orgânicos (Figura 26). Estes sólidos foram produzidos e secos por liofilização e apresentavam uma atividade de hidrólise de trioleína de 39 e 40 U.gSS⁻¹, respectivamente.

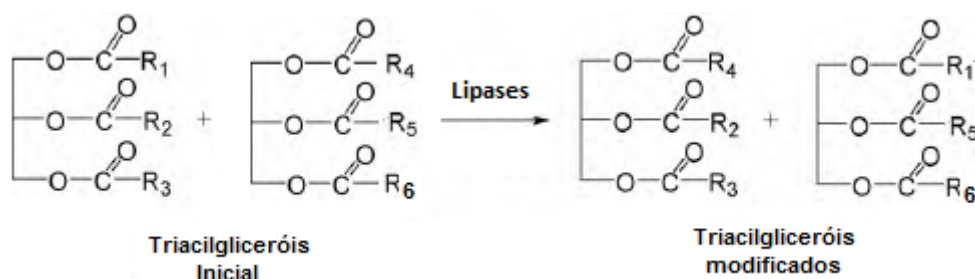


FIGURA 26 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO

O objetivo destas reações foi inserir ácidos graxos ômega-3 em compostos utilizados como base para a síntese de margarinas (estearina de palma e óleo de palmiste). Para seguir a reação de interesterificação foi utilizada a mesma metodologia aplicada nas indústrias de margarinas, onde o processo de interesterificação dos óleos e gorduras é quantificado indiretamente, por ressonância magnética nuclear (RMN). A partir destes dados é calculado o conteúdo de gordura sólida (SFC) presente no produto final, à temperatura de 35°C. Além disso, utilizando também a metodologia aplicada na indústria, foram dosados os teores de ácidos graxos livres e os produtos de oxidação, como descrito mais adiante neste trabalho.

O conteúdo de gordura sólida (SFC) é uma importante característica de uma margarina ou gordura interesterificada, sendo determinado em função da temperatura. O SFC em temperaturas mais altas (35°C) determina a sensação na boca após o consumo. No caso de margarinas de mesa, os valores SFC a 35°C devem ser tão baixos quanto possível, a fim de garantir uma textura adequada na boca e evitar uma textura mais grosseira e pouco homogênea. Uma das substâncias, utilizadas industrialmente, responsável pelo elevado teor de sólidos na amostra é a estearina de palma (OSÓRIO et al., 2008).

Os substratos utilizados nas reações de interesterificação foram escolhidos com baseados no que já vem sendo utilizado na indústria e no trabalho de Osório et al. (2008), onde foi utilizado um meio de reação constituído por PS (estearina de palma), PK (óleo de palmiste) e EPAX 4510TG (concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA - 45 % de EPA e 10 % de DHA).

5.2.1 Ensaios prévios

Os experimentos iniciais foram realizados a 65 °C, usando 55 % de PS, 15 % de EPAX 4510TG e 30 % de PK, catalisados pelo sólido fermentado por *R. oryzae* (SFRO) ou sólido fermentado por *R. microsporus* (SFRM) a fim de estabelecer o melhor tempo de reação.

5.2.1.1 Conteúdo de gordura sólida e teor ácidos graxos livres

Inicialmente foram quantificadas as alterações na porcentagem de SFC_{35°C} durante 30 h de reação. Na Figura 27, observa-se que tanto SFRO

quanto SFRM catalisaram a reação de interesterificação, reduzindo os valores de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de 15 % para um valor final entre 8 e 9 % após 24 h de reação.

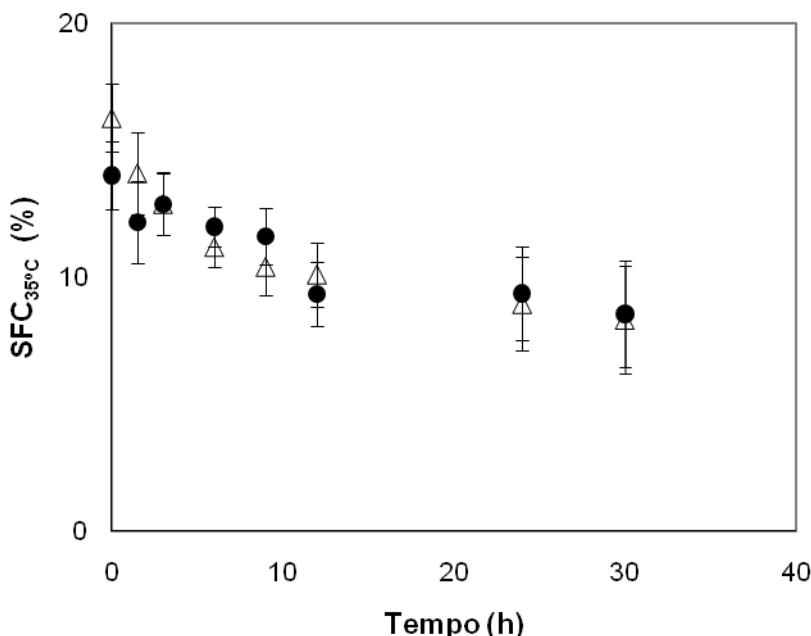


FIGURA 27 - CINÉTICA DE INTERESTERIFICAÇÃO CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS PRODUZIDOS POR (●) *Rhizopus microsporus* (SFRM) E (Δ) *Rhizopus oryzae* (SFRO).

Condições: Estearina de palma (55 %), EPAX 4510TG (15 %) e óleo de palmiste (30 %), a 65°C, com 0,3 g de sólido fermentado (39 U.gSS⁻¹ para SFRM e 40 U.gSS⁻¹ para SFRO, utilizando trioleína como substrato).

Durante o processo de interesterificação, a presença de ácidos graxos livres ou glicerídeos parciais, como subprodutos da reação de hidrólise, pode levar a uma diminuição do ponto de fusão da gordura interesterificada, resultando em alterações indesejáveis nos produtos, podendo ocasionar a formação de sabores estranhos e indesejáveis (ranço) por oxidação dos ácidos graxos livres (NASCIMENTO et al., 2004).

Em processos industriais de modificação de gorduras, prevê-se uma etapa após a interesterificação, que é chamada desodorização, para remoção dos ácidos graxos livres formados durante a reação, que também podem

conferir sabores indesejáveis à gordura. Assim, o teor de ácidos graxos livres formados durante o processo de interesterificação é um parâmetro importante, sendo determinado por titulação. Neste trabalho, para ambos os sólidos fermentados utilizados, o conteúdo de ácidos graxos livres aumentou rapidamente nas primeiras 12 h, atingindo 9 % para SFRM e 7 % para SFRO após 24 h de reação (Figura 28).

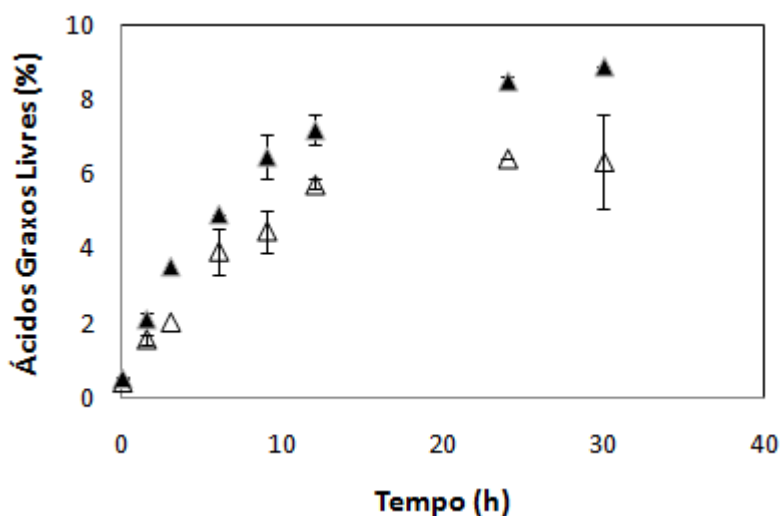


FIGURA 28 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DURANTE A REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS, CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS POR (▲) *Rhizopus microsporus* E (Δ) *Rhizopus oryzae*.

Condições: Estearina de palma (55 %), EPAX 4510TG (15 %) e óleo de palmiste (30 %), 65°C, 0,3 g de sólido fermentado (39 U.gSS⁻¹ para SFRM e 40 U.gSS⁻¹ para SFRO, utilizando trioleína como substrato).

Assim como observado por Osório et al. (2001; 2005 e 2009), o nível de ácidos graxos livres presente nos produtos reacionais foram elevados. Especificamente, no experimento onde foi observado o menor SFC_{35°C}, (2,9%), também foi observado um nível de ácidos graxos livres de 7,4 %. Na verdade, um aumento nos níveis de FFA durante lipase catalisada interesterificação de misturas binárias ou ternárias de gordura em solvente livre de água é um

fenômeno geral (ZAINAL e YUSOFF, 1999; OSÓRIO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2004; SILVA et al., 2009).

O controle da atividade de água do meio reacional pode ajudar para reduzir os níveis de ácido livres (OSÓRIO et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2004). Além disso, quando as reações de interesterificação são mantidas em reatores contínuos os níveis de ácidos graxos livres tendem a diminuir para cerca de 1 % (OSÓRIO et al., 2005). Mesmo que não seja possível reduzir os níveis de ácidos livres de forma significativa, eles podem ser removidos no processo de desodorização que é normalmente utilizado no final do processo de interesterificação química ou enzimática (HOLM e COWAN, 2008). Neste processo, os ácidos gordos livres (e outros voláteis) são removidos usando vapor sobreaquecido a 200-270°C sob baixa pressão (CMOLÍK e POKORNY, 2000).

5.2.1.2 Efeito da atividade de água (a_w)

O parâmetro a_w é a medida da água disponível em um sistema. Por meio dele é possível determinar a hidratação do sistema e, deste modo, determinar se a água necessária para manter a conformação da enzima está presente (ZAKS e KLIBANOV, 1985). Entretanto, um valor elevado de a_w pode promover a hidrólise dos triacilgliceróis, prejudicando os rendimentos da reação de interesterificação. Segundo Soumanou et al. (1997) e Torres et al. (2003), o mecanismo de interesterificação enzimática envolve a hidrólise dos grupos éster nos triacilgliceróis, seguindo-se a re-esterificação; assim, a otimização da reação de interesterificação depende do balanço entre a esterificação e a

hidrólise, e se houver água em excesso no meio reacional, poderá haver um deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da hidrólise.

Como foi verificada uma diferença na produção de ácidos graxos livres durante a reação de interesterificação (Figura 28), tornou-se necessário verificar se a água presente no sólido fermentado, expressa pela atividade termodinâmica da água (a_w), poderia estar influenciando a produção de ácidos graxos livres, visto que as reações foram realizadas em ambiente livre de água. Para tanto, foram realizados experimentos de interesterificação utilizando os sólidos para comparar os rendimentos obtidos com os valores de a_w originais (0,5 para SFRO e de 0,7 SFRM) com os valores invertidos de a_w , que foram obtidos incubando-se previamente os sólidos fermentados em soluções saturadas de NaBr (a_w - 0,5) (SFRM) e NaCl (a_w - 0,7) (SFRO), em ambiente hermeticamente fechado (Figura 29).

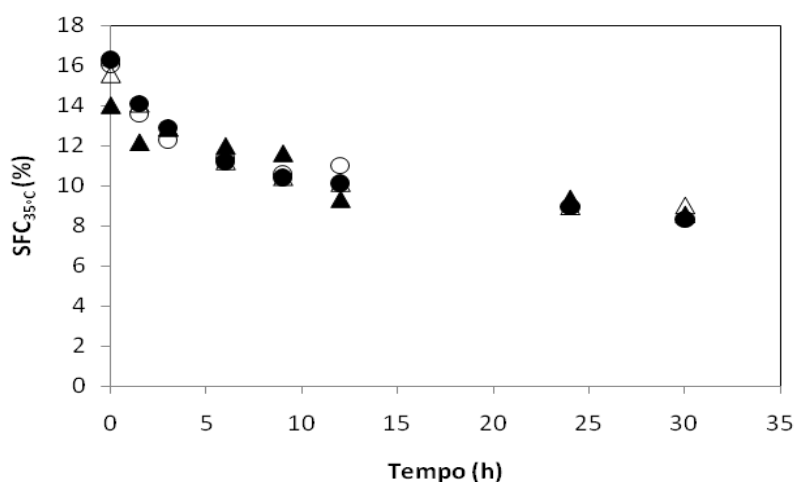


FIGURA 29 - CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA (SFC_{35°C}) APRESENTADO DURANTE A CINÉTICA DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR *Rhizopus oryzae* E *Rhizopus microsporus* NAS MESMAS CONDIÇÕES REACIONAIS, MAS EQUILIBRADOS EM DIFERENTES VALORES DE a_w . $\blacktriangle$ *Rhizopus microsporus* (a_w 0,5); $\bullet$ *Rhizopus microsporus* (a_w 0,7); $\triangle$ *Rhizopus oryzae* (a_w 0,5); $\circ$ *Rhizopus oryzae* (a_w 0,7).

Analisando a Figura 29, verifica-se que não houve diferenças no conteúdo de gordura sólida ($SFC_{35^{\circ}C}$) durante a cinética reacional, utilizando SFRO e SFRM, incubados em a_w 0,5 e 0,7, respectivamente, mostrando que os diferentes a_w não têm efeito na reação de interesterificação.

5.2.1.3 Produtos de oxidação

Antes de serem consumidos, margarinas, óleos e gorduras estão sujeitos a degradações resultantes da oxidação térmica, que resultam em cheiros e sabores pouco agradáveis. Os principais produtos de oxidação gerados pela oxidação térmica são: hidroperóxidos conjugados (produtos iniciais de oxidação), aldeídos e cetonas (produtos finais de oxidação) que podem ser quantificados por absorção em espectrofotômetro UV-Vis, a 232 nm e a 270 nm, respectivamente. Verificou-se um aumento relativamente pequeno ($0,2 \pm 0,1$) durante o curso da reação para todos os tratamentos (Figura 30), indicando que sua produção não ocorreu durante o curso da reação.

Osório et al. (2001) relacionaram o aumento dos produtos de oxidação gerados durante a reação entre PS, PK e EPAX 2050TG, catalisada por lipases comerciais, com o aumento das concentrações de EPAX adicionadas ao meio reacional e redução da concentração de PS. O tempo de reação e a temperatura utilizada também foram relacionados por esses autores como importantes para a produção de hidroperóxidos (232 nm) e produtos finais de oxidação (270 nm). Nos estágio finais de oxidação, a velocidade de degradação dos produtos de oxidação gerados pode ser maior do que a sua velocidade de formação (Sonntag, 1999).

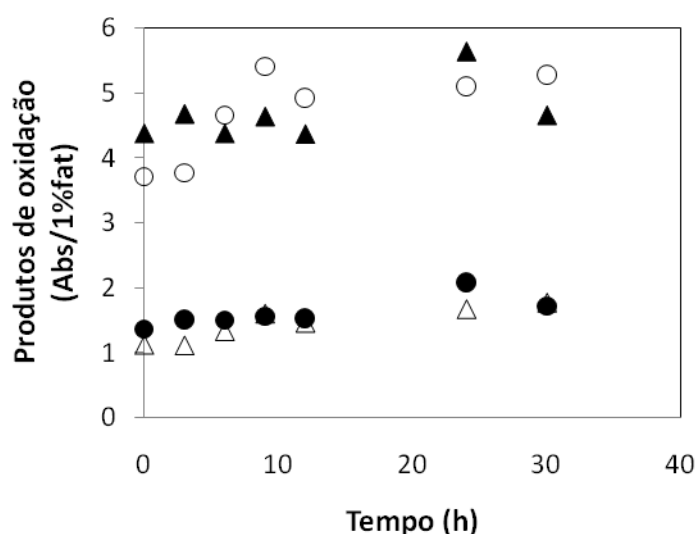


FIGURA 30 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO QUANTIFICADOS DURANTE A REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR *Rhizopus oryzae* E *Rhizopus microsporus* NAS MESMAS CONDIÇÕES REACIONAIS.

Leituras a 232 nm (produtos iniciais de oxidação - ●, △) e a 270 nm (produtos finais de oxidação - ▲, ○) de 1 % (m/v) de gordura em *iso*-octano. Reações catalisadas pelos sólidos fermentados por (●,▲) *R. oryzae* e (○,△) *R. microsporus*. Condições reacionais: Estearina de palma (55 %), EPAX 4510TG (15 %) e óleo de palmiste (30 %), 65°C, 0.3 g de sólido fermentado (39 U.gSS⁻¹ para SFRM e 40 U.gSS⁻¹ para SFRO, utilizando trioleína como substrato).

5.2.2 Efeito da temperatura e da massa do biocatalisador

Para determinar as temperaturas e massas de sólido fermentado que seriam utilizadas no delineamento estatístico, foram realizados experimentos prévios de interesterificação, nas mesmas condições dos experimentos citados acima, utilizando temperaturas de 55 °C, 60 °C e 65 °C e variando a massa de sólido fermentado usada na reação entre 0,1 g e 0,3 g (Figura 31). O tempo de reação foi fixado em 30 h.

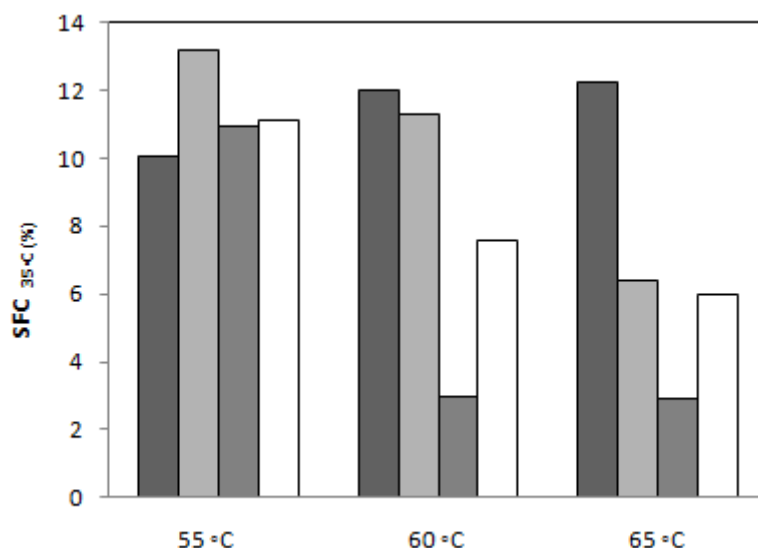


FIGURA 31 – EFEITO DA TEMPERATURA E DA MASSA DE SÓLIDO FERMENTADO NO TEOR DE GORDURA SÓLIDA ($SFC_{35^{\circ}C}$) DA MISTURA REACIONAL. (■) *Rhizopus oryzae* 0,1 g; (▒) *Rhizopus microsporus* 0,1 g; (░) *Rhizopus oryzae* 0,3 g; (□) *Rhizopus microsporus* 0,3 g.

As reações realizadas utilizando 0,3 g de sólido fermentado nas temperaturas mais elevadas apresentaram menor conteúdo de gordura sólida final (Figura 30). Temperaturas mais altas, acima dos pontos de fusão das misturas de gorduras (geralmente 55°C para o óleo de palmiste e 70°C para a estearina de palma), facilitam a interação da enzima com os substratos, desde que esta seja estável nestas temperaturas. Segundo Holm e Cowan (2008), para lipases comerciais como as preparações imobilizadas de *Thermomyces lanuginosa*, de *Rhizomucor miehei* (respectivamente “Lipozyme TL IM” e “Lipozyme IM”), e da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, a temperatura ótima para as reações de interesterificação está em torno de 60°C a 70°C.

A partir destes resultados, foi definida a utilização de 0,3 g de sólido fermentado, correspondentes a 39 U.gSS⁻¹ (SFRM) e 40 U.gSS⁻¹ (SFRO), temperaturas entre 56°C e 75°C para o planejamento experimental.

5.2.3 Otimização do processo de interesterificação por delineamento fatorial

5.2.3.1 Sólido fermentado por *Rhizopus oryzae*

Os experimentos de interesterificação foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo 2³, onde foram estudados os efeitos das variáveis temperatura e concentração dos substratos na reação de interesterificação. As condições de reação, a composição de cada meio de reação, os valores de SFC_{35°C} antes e após a interesterificação, e os valores de ácidos graxos livres (AGL) são apresentados na Tabela 22. Para todos os ensaios foram realizados controles, sem a utilização do sólido fermentado no meio reacional.

Após 24 h de reação, verificou-se uma redução de até 81 % no conteúdo de gordura sólida presente na amostra. O SFC_{35°C} final chegou a 2,2 % quando a reação foi mantida a 65°C, utilizando 38 % de PS e 15 % de EPAX 4510TG.

Os efeitos lineares e quadráticos de cada variável (temperatura e formulação de mistura de gordura) e suas interações foram calculados em relação ao SFC_{35°C} final (%) e em relação à percentagem de redução de SFC_{35°C} (Tabelas 23 e 24). Este último parâmetro foi calculado devido às diferenças encontradas nos valores de SFC_{35°C} iniciais das misturas reacionais.

TABELA 22 - OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae* POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.

Exp	T (° C)	PS (%)	EPAX (%)	SFC _{35 ° C} (%)		Observado SFC _{35 ° C} (% Red)	Esperado SFC _{35 ° C} (% Red) (Ŷ)	AGL (%)
				Inicial	Final			
1	60 (-1)	45 (-1)	10 (-1)	16,8	6,0	64,2	67	7,1
2	60 (-1)	45 (-1)	20 (1)	17,7	5,8	66,8	68	7,1
3	60 (-1)	65 (1)	10 (-1)	29,6	17,7	40,2	37	5,6
4	60 (-1)	65 (1)	20 (1)	30,4	16,8	44,6	44	6,2
5	70 (1)	45 (-1)	10 (-1)	13,4	6,0	55,2	58	5,9
6	70 (1)	45 (-1)	20 (1)	14,1	7,6	45,8	51	4,3
7	70 (1)	65 (1)	10 (-1)	25,0	16,0	35,6	36	6,4
8	70 (1)	65 (1)	20 (1)	27,4	17,4	36,3	36	6,8
9	56 (-1,68)	55 (0)	15 (0)	18,9	9,5	49,7	50	6,3
10	73 (1,68)	55 (0)	15 (0)	18,5	11,1	39,5	35	5,9
11	65 (0)	38 (-1,68)	15 (0)	12,3	2,2	81,3	74	7,4
12	65 (0)	71 (1,68)	15 (0)	24,9	16,6	33,3	36	5,5
13	65 (0)	55 (0)	06 (-1,68)	19,0	8,9	52,6	51	6,6
14	65 (0)	55 (0)	23 (1,68)	24,6	11,3	54,1	51	6,3
15	65 (0)	55 (0)	15 (0)	23,0	12,1	47,2	49	4,9
16	65 (0)	55 (0)	15 (0)	18,4	8,6	53,1	49	6,2
17	65 (0)	55 (0)	15 (0)	22,3	11,5	47,9	49	5,9

SFC_{35°C}: conteúdo de gordura sólida, medido a 35°C por ressonância magnética nuclear; PS: estearina de palma; T: temperatura; AGL: ácidos graxos livres; EPAX 4510TG: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA). Tempo de reação: 24 h.

A Tabela 23 mostra a análise de variância dos efeitos lineares, quadráticos e de interação utilizando o parâmetro $SFC_{35^{\circ}C}$ (% Red) como variável resposta e SFRO como catalisador. Somente os termos lineares para temperatura e concentração de estearina de palma (PS) foram significativos ($p = 0,036780$, $p = 0,00570$, respectivamente). O valor de R^2 para a regressão foi de 0,93, indicando que 93 % da variação na resposta podem ser atribuídos às variáveis independentes e apenas 7 % não podem ser explicados pelo modelo. O modelo proposto para as reações de interesterificação foi significativo, com um valor de F (11,15) superior ao tabulado (3,29). Além disso, a falta de ajuste da regressão não foi significativa ao nível de 5 % ($p = 0,29$), o que indica que a equação pode ser usada para prever o efeito de qualquer combinação das variáveis estudadas.

A análise estatística dos dados para o mesmo experimento acima, mas considerando-se agora o teor $SFC_{35^{\circ}C}$ final pode ser observada na Tabela 24. Somente o termo linear PS foi significativo, apresentando um R^2 de 0,94, para o modelo que foi significativo ($p = 0,0001$), com um valor de F (12,12) superior ao tabulado (3,29). Assim como a análise anterior, a falta de ajuste da regressão foi não significativa ao nível de 5 % ($p = 0,29$), o que indica que a equação pode ser usada para prever o efeito de qualquer combinação das variáveis estudadas.

TABELA 23 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*: PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 22).

Fonte	Coefficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	-72,85	2260,42	9	2260,42	11,15	0,00001**
T	10,61	264,72	1	264,72	11,50	0,036780*
PS	-6,63	1791,40	1	1791,40	173,90	0,00570**
EPAX	2,68	0,033	1	0,033	0,0032	0,95983
T ²	-0,09	66,93	1	66,93	6,49	0,12556
PS ²	0,02	47,27	1	47,27	4,59	0,16544
EPAX ²	0,02	4,86	1	4,86	0,47	0,56304
T×PS	0,04	36,76	1	36,76	3,57	0,19945
T×EPAX	-0,07	30,77	1	30,77	2,98	0,22606
PS×EPAX	0,03	17,67	1	17,67	1,71	0,32050
Resíduos		161,09	7	23,01		
Falta de ajuste		140,49	5	28,09	2,72	0,28973
Erro puro		20,60	2	10,30		
Total		2471,26	16			

$R^2 = 0,93$; $F_{5,7,0,05} = 3,29$; *Significância ao nível de 5 %. ** Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura;
PS: Estearina de palma; EPAX: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA).

TABELA 24 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*: CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 22).

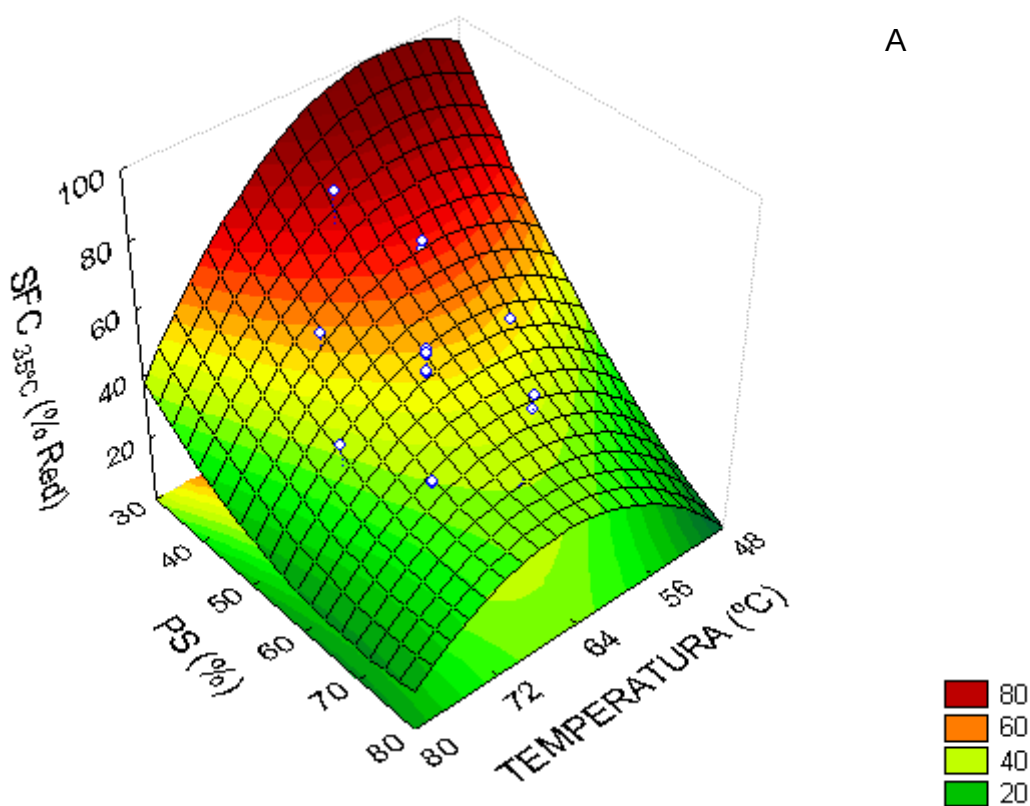
Fonte	Coefficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	69,69	338,24	9	338,24	12,12	0,0001**
T	-2,57	0,92	1	0,92	0,25	0,666
PS	0,74	325,77	1	325,77	88,62	0,011*
EPAX	-1,63	2,57	1	2,57	0,70	0,490
T²	0,02	3,05	1	3,05	0,83	0,458
PS²	0,002	0,50	1	0,50	0,13	0,746
EPAX²	0,01	2,31	1	2,31	0,62	0,510
T×PS	-0,006	0,95	1	0,95	0,26	0,660
T×EPAX	0,02	2,03	1	2,03	0,55	0,534
PS×EPAX	-0,002	0,11	1	0,11	0,03	0,876
Resíduos		21,70	7	4,50		
Falta de ajuste		14,35	5	2,87	0,78	0,644
Erro puro		7,35	2	3,67		
Total		358,24	16			

$R^2 = 0,94$; $F_{5;7;0,05} = 3,29$; *Significante ao nível de 5 %. ** Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura;

PS: Estearina de palma; EPAX: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA).

A Figura 32 mostra as superfícies de resposta construídas a partir do modelo matemático gerado com a concentração de EPAX 4510TG fixada em 15 %. Quando a variável resposta utilizada foi $SFC_{35^{\circ}C}$ (% Red), a maior percentagem de redução, 81 %, foi obtida com um teor de PS de 38 % e uma temperatura de $65^{\circ}C$ (Figura 32 A). A Figura 32 B mostra a superfície de resposta para $SFC_{35^{\circ}C}$ final, onde se observa que o menor valor do $SFC_{35^{\circ}C}$ pode ser obtido com as menores concentrações de PS.

Ao comparar-se as Figuras 32 A e B, percebe-se que a redução no $SFC_{35^{\circ}C}$ chegou a 81,3 % (Figura 32 A) com um SFC final de 2,3 % (Figura 32 B), valor comparável aos dados da literatura (ZAINAL e YUSOFF, 1999; MINGA e GHAZALI, 1999; OSÓRIO et al., 2001; HOUMOLLER et al., 2007; SILVA et al., 2009; PAULA et al., 2010; LI et al., 2010).



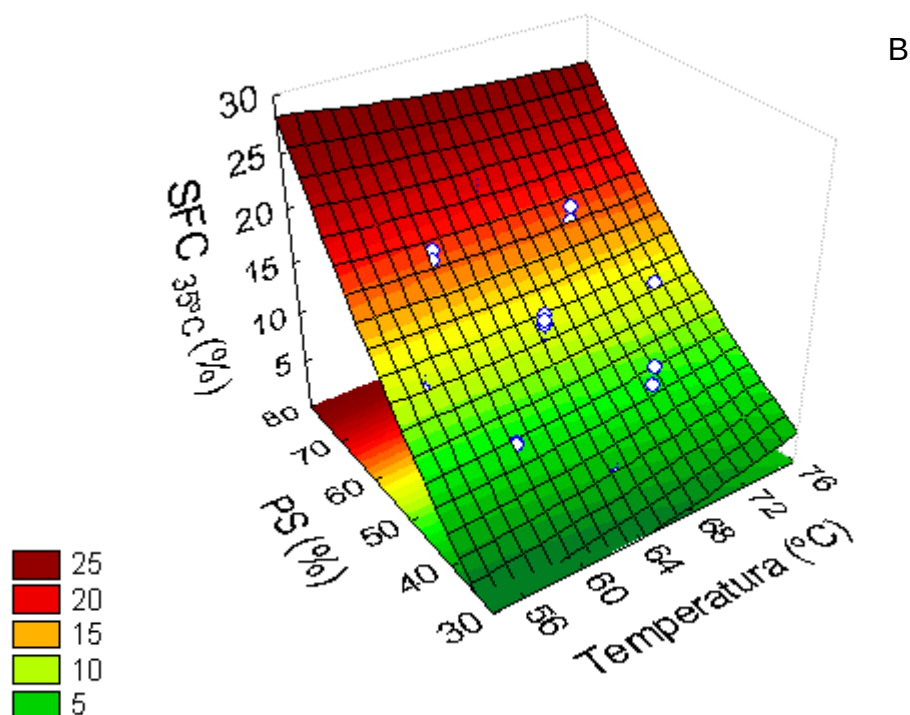


FIGURA 32 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (A) E CONTEÚDO FINAL DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (B) E OBTIDOS PARA A GORDURA INTERESTERIFICADA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*. A CONCENTRAÇÃO DE EPAX FOI FIXADO EM 15 %.

A partir da determinação dos coeficientes, foram propostas as equações para as reações utilizando SFRO como catalisador [$SFC_{35^{\circ}C}$ final (eq. 6) e $SFC_{35^{\circ}C}$ (% Red) (eq. 7)]:

$$Y_6 = -72,85 + 10,61X_1 - 6,63X_2 + 2,68X_3 - 0,09X_1^2 + 0,02X_2^2 + 0,02X_3^2 + 0,04X_1X_2 - 0,07X_1X_3 + 0,03X_2X_3 \quad (6)$$

$$Y_7 = 69,69 - 2,57X_1 + 0,74X_2 - 1,63X_3 + 0,02X_1^2 + 0,002X_2^2 + 0,01X_3^2 - 0,006X_1X_2 + 0,02X_1X_3 - 0,002X_2X_3 \quad (7)$$

Foi realizada a quantificação do conteúdo de ácidos graxos livres presente nas reações que compõem o planejamento fatorial, catalisada pelo SFRO. Nenhuma das variáveis apresentou efeito significativo sobre o conteúdo de ácidos graxos livres presente nas misturas após 24 h de reação. No início

da reação, as misturas de gordura apresentaram baixa acidez (de 0,28 a 0,55 %), enquanto a acidez final variou 4,3-7,4 % (Tabela 25). Apesar deste nível de acidez ser considerado elevado, os ácidos graxos livres, gerados durante a reação, podem ser removidos utilizando o processo de desodorização.

TABELA 25 - ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (%) PRESENTE NAS REAÇÕES DO PLANEJAMENTO FATORIAL, CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*.

Experimento	<i>R. oryzae</i> AGL (%)
1	7,02
2	7,03
3	5,61
4	6,19
5	5,92
6	4,26
7	6,39
8	6,80
9	6,26
10	5,98
11	7,39
12	5,53
13	6,65
14	6,27
15	4,88
16	6,22
17	5,93

Foram quantificados os produtos de oxidação dos pontos centrais e extremos propostos pelo planejamento fatorial. Nenhum dos experimentos mostrou diferenças significativas entre os teores iniciais e finais dos produtos de oxidação (Tabela 26).

TABELA 26 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO PRIMÁRIOS (232 nm) E SECUNDÁRIOS (270 nm) QUANTIFICADOS PARA AS REAÇÕES CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*.

Temperatura (° C)	PS (%)	EPAX (%)	Produtos de oxidação primários (A ₂₃₂)		Produtos de oxidação secundários (A ₂₇₀)	
			Inicial	Final	Inicial	Final
56,59	55	15	4,20	4,36	1,53	1,74
73,40	55	15	4,14	4,58	1,81	1,81
65	38,18	15	0,50	0,48	0,22	0,14
65	71,82	15	3,99	4,44	2,02	2,01
65	55	6,6	3,89	4,28	2,50	2,41
65	55	23,4	5,13	5,29	3,96	4,69
65	55	15	4,72	4,74	1,62	1,84

5.2.3.2 Sólido fermentado por *Rhizopus microsporus*

Quando o SFRM foi utilizado como catalisador, a reação que apresentou maior SFC_{35°C} (% RED) em relação ao inicial (3,9 %, redução de 62 %), foi a 60°C, utilizando 45 % de PS e 10 % de EPAX 4510TG. As condições de reação, a composição de cada meio de reação, os valores de SFC a 35°C antes e após a interesterificação, e os valores de ácidos graxos livres (AGL) são apresentados na Tabela 27.

A Tabela 28 mostra a análise de variância dos efeitos lineares, quadráticos e de interação no SFC_{35°C} (% Red) quando o SFRM foi utilizado como catalisador. Somente a média foi significativa. O valor de R² para a regressão foi de 0,55, indicando que apenas 55 % da variação na resposta pode ser atribuída às variáveis independentes. O modelo não foi significativo com um valor de F (0,89) menor do que o tabulado (3,29). Além disso, a falta do ajuste da regressão foi significativa ao nível de 5 % (p = 0,01), o que indica que a equação não pode ser usada para prever o efeito de qualquer combinação das variáveis estudadas.

Também utilizando o SFRM como catalisador, os efeitos lineares e quadráticos de cada variável (temperatura e formulação de mistura de gordura) e suas interações foram calculados em relação ao SFC_{35°C} final (%) e em relação à percentagem de redução de SFC_{35°C} (Tabela 29).

Os resultados apresentados na Tabela 29 mostram a análise de variância dos efeitos lineares, quadráticos e de interação utilizando o SFC_{35°C} final como resposta. Somente o termo linear PS foi significativo. O valor de R^2 para a regressão foi de 0,82, indicando que 82 % da variação na resposta podem ser atribuídos às variáveis independentes e 18 % não podem ser explicados pelo modelo. O modelo proposto para as reações de interesterificação foi significativo, com um valor de F (6,07) superior ao tabulado (3,29). Além disso, a falta do ajuste da regressão não foi significativa ao nível de 5 % ($p = 0,169$), o que indica que a equação pode ser usada para prever o efeito de qualquer combinação das variáveis estudadas. A Figura 33 mostra a superfície de resposta para os valores finais de SFC_{35°C}, plotada com todos os termos da equação, utilizando os valores de temperatura e concentração de PS nos eixos “x” e “y”, com a concentração de EPAX 4510TG fixada em 15 %. Na figura, o menor valor de SFC_{35°C} (% Red), foi obtido utilizando a temperatura reacional de 76°C e 30 % de PS.

TABELA 27 - OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus* POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.

Exp	T (° C)	PS (%)	EPAX (%)	SFC _{35°C} (%)		Observado SFC _{35°C} (% Red)	Esperado SFC _{35°C} (% Red) (Ŷ)	AGL (%)
				Inicial	Final			
1	60 (-1)	45 (-1)	10 (-1)	10,4	3,9	62,2	56,4	10,8
2	60 (-1)	45 (-1)	20 (1)	13,9	4,6	66,9	54,7	10,9
3	60 (-1)	65 (1)	10 (-1)	19,8	10,7	45,9	51,3	9,9
4	60 (-1)	65 (1)	20 (1)	17,7	9,7	45,3	41,7	8,9
5	70 (1)	45 (-1)	10 (-1)	11,4	5,3	53,1	48,6	9,3
6	70 (1)	45 (-1)	20 (1)	10,8	4,4	58,9	45,4	10,1
7	70 (1)	65 (1)	10 (-1)	19,7	12,1	36,4	40,4	9,0
8	70 (1)	65 (1)	20 (1)	21,4	14,7	31,4	29,2	7,2
9	56 (-1,68)	55 (0)	15 (0)	16,3	6,3	60,9	66,5	9,5
10	73 (1,68)	55 (0)	15 (0)	16,1	9,0	43,8	49,5	20,5
11	65 (0)	38 (-1,68)	15 (0)	9,5	6,2	34,7	52,2	9,4
12	65 (0)	71 (1,68)	15 (0)	23,4	13,9	40,5	34,4	9,3
13	65 (0)	55 (0)	06 (-1,68)	13,1	7,1	45,6	42,2	9,5
14	65 (0)	55 (0)	23 (1,68)	17,9	14,9	16,6	31,4	2,4
15	65 (0)	55 (0)	15 (0)	13,8	7,2	47,7	47,1	10,5
16	65 (0)	55 (0)	15 (0)	18,3	9,3	49,3	47,1	9,1
17	65 (0)	55 (0)	15 (0)	16,7	9,0	46,0	47,1	7,2

SFC_{35°C}: conteúdo de gordura sólida medido a 35°C por ressonância magnética nuclear; PS: estearina de palma; T: temperatura; AGL: ácidos graxos livres; EPAX 4510TG: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA). Tempo de reação: 24 h.

TABELA 28 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*: PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DO CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 27).

Fonte	Coefficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	595,06	1338,09	9	1250,06	0,891	0,46656
T	-19,10	294,97	1	294,97	108,32	0,22145
PS	2,72	392,97	1	392,97	144,29	0,16528
EPAX	6,39	156,10	1	156,1	57,32	0,36141
T²	0,14	162,84	1	162,84	59,79	0,35188
PS²	-0,01	23,56	1	23,56	8,65	0,71568
EPAX²	-0,12	117,64	1	117,64	43,19	0,42470
T×PS	-0,01	4,96	1	4,96	1,82	0,86674
T×EPAX	-0,01	1,36	1	1,36	0,49	0,92990
PS×EPAX	-0,04	32,40	1	32,4	11,89	0,66988
Resíduos		1146,29	7	163,75		
Falta de ajuste		1140,84	5	228,17	83,78	0,01183*
Erro puro		5,447	2	2,72		
Total		2484,38	16			

R² = 0,55; F_{5,7,0,05} = 3,29; *Significante ao nível de 5 %. **Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura;

PS: Estearina de palma; EPAX: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω-3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA).

TABELA 29 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 PARA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*: CONTEÚDO FINAL DE GORDURA SÓLIDA A 35°C (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 27).

Fonte	Coefficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Mean	-54,24	169,27	9	169,27	6,07	0,0002**
T	2,48	9,18	1	9,18	1,78	0,223
PS	-0,87	129,30	1	129,30	25,12	0,001*
EPAX	-1,22	16,05	1	16,05	3,11	0,120
T ²	-0,02	4,44	1	4,44	0,86	0,383
PS ²	-0,002	0,67	1	0,67	0,13	0,727
EPAX ²	0,02	2,42	1	2,42	0,47	0,515
T×PS	-0,01	3,38	1	3,38	0,65	0,444
T×EPAX	0,01	0,50	1	0,50	0,09	0,764
PS×EPAX	0,004	0,40	1	0,40	0,07	0,787
Resíduos		36,02	7	5,14		
Falta de ajuste		33,44	5	6,69		0,169
Erro puro		2,58	2	1,29		
Total		205,29	16			

$R^2 = 0,82$; $F_{5;7;0,05} = 3,29$; *Significante ao nível de 5 %. **Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura;

PS: Estearina de palma; EPAX: concentrado de triacilgliceróis enriquecido com ω -3 PUFA (45 % de EPA e 10 % de DHA).

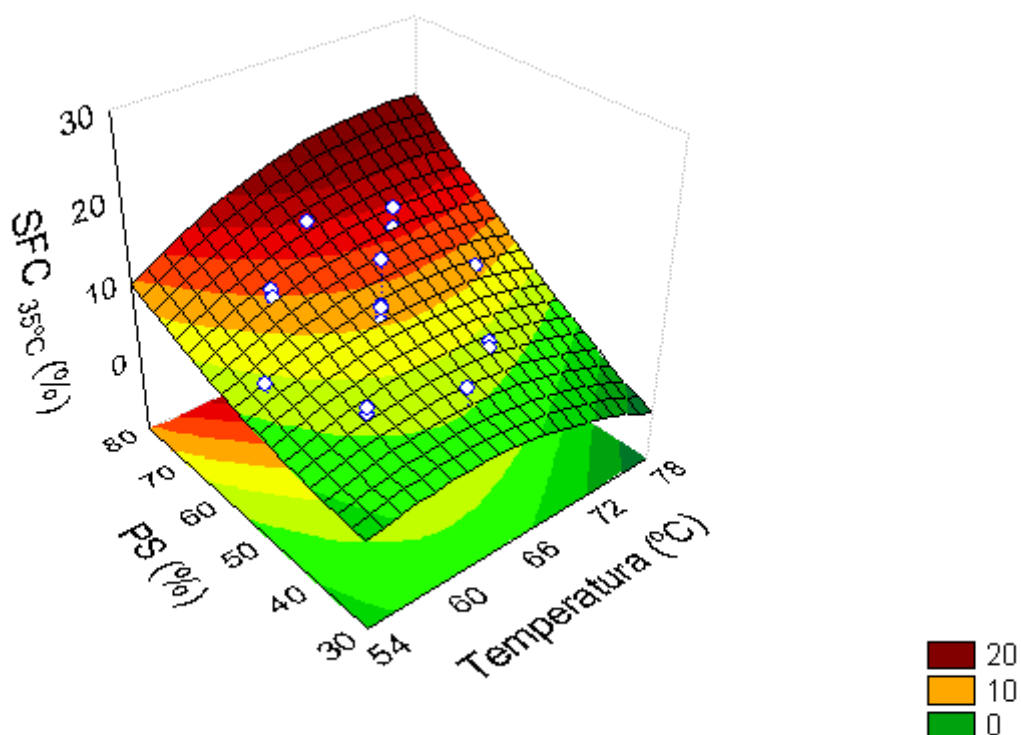


FIGURA 33 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE CONTEÚDO DE GORDURA SÓLIDA A 35°C, OBTIDOS PARA A GORDURA INTERESTERIFICADA, CATALISADA PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PS E TEMPERATURA. O VALOR EPAX FOI FIXADO EM 15 %.

Quando SFRM foi utilizado como catalisador, R^2 para $SFC_{35^\circ C}$ (% Red) (Tabela 28) foi de 0,55, muito baixo para representar os valores experimentais, enquanto que para $SFC_{35^\circ C}$ final (Tabela 29) o R^2 foi de 0,82, mostrando uma concordância melhor com o modelo.

A partir da determinação dos coeficientes, foi proposta a equação para as reações utilizando o SFRM como catalisador ($SFC_{35^\circ C}$ final) (eq. 8) como catalisador:

$$Y_8 = -54,24 + 2,48X_1 - 0,87X_2 - 1,22X_3 - 0,02X_1^2 - 0,002X_2^2 + 0,02X_3^2 - 0,01X_1X_2 + 0,01X_1X_3 + 0,004X_2X_3 \quad (8)$$

Foi realizada a quantificação do conteúdo de ácidos graxos livres nos planejamentos fatoriais catalisados pelo SFRM. Nenhuma das variáveis apresentou efeito significativo sobre o conteúdo de ácidos graxos livres, presente nas misturas após 24 h de reação. A acidez final variou de 2,4-20,5, quando catalisado pelo SFRM (Tabela 30).

TABELA 30 - ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (%) PRESENTES NAS REAÇÕES DO PLANEJAMENTO FATORIAL CATALISADAS PELO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*.

Experimento	<i>R. microsporus</i> AGL (%)
1	10,84
2	10,96
3	9,92
4	8,94
5	9,37
6	10,15
7	9,05
8	7,26
9	9,55
10	20,55
11	9,43
12	9,35
13	9,56
14	2,45
15	10,51
16	9,19
17	7,24

AGL: Ácidos graxos livres

Analisando-se os resultados obtidos, concluiu-se que foi possível utilizar SFRM e SFRO para catalisar reações de interesterificação entre estearina de palma, óleo de palmiste e um concentrado de triacilgliceróis, enriquecidos com ômega-3 (EPAX 4510TG).

Apesar dos sólidos fermentados contendo atividade lipolítica terem sido anteriormente utilizados para catalisar a resolução de racematos (NAGY et al., 2006), reações de esterificação e transesterificação para produzir ésteres de

biodiesel (FERNANDES et al., 2007; SALUM et al., 2010) esta é a primeira vez que um sólido fermentado foi usado para catalisar uma reação de interesterificação, abrindo a possibilidade de redução de custos para a produção de margarinas e gorduras ricas em ômega-3, obtidas por interesterificação enzimática.

A partir dos resultados dos planejamentos fatoriais, verificou-se que SFRO foi mais eficiente do que SFRM em catalisar as reações de interesterificação, nas condições testadas. Foi possível identificar as condições em que um produto com um baixo valor de $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ pode ser obtido: com uma temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, um teor de estearina de palma de 38 % e um teor EPAX de 15 %. Nestas condições, o produto final teve um $SFC_{35^{\circ}\text{C}}$ de apenas 2,3 %, utilizando SFRO como catalisador. Como neste caso o valor de $SFC_{35^{\circ}\text{C}}$ inicial foi de 12,3 %, a porcentagem de redução do $SFC_{35\text{ }^{\circ}\text{C}}$ corresponde a 81,3 %, comparável aos dados da literatura (ZAINAL e YUSOFF, 1999; MINGA e GHAZALI, 1999; OSÓRIO et al., 2001; HOUMOLLER et al., 2007; SILVA et al., 2009; PAULA et al., 2010; LI et al., 2010). Zainal & Yusoff (1999) utilizaram estearina de palma e óleo de palmiste em reação catalisada pela Lipozyme IM60 e observaram um conteúdo de gordura sólida final de 0 a 4 % após 24 h de reação. Silva et al. (2009) utilizaram banha de porco com óleo de soja e a lipase Lipozyme TL IM e, após 6 h de reação verificaram que não havia gordura sólida no meio.

Por outro lado, o produto de interesterificação apresentado neste trabalho leva em torno de 24 h para atingir valores de $SFC_{35^{\circ}\text{C}}$ de 2 a 4 %, comparáveis com valores atingidos em 30 min de reação quando a enzima Lipozyme TL IM é utilizada como catalisador (HOUMOLLER et al., 2007).

Osório et al., (2001) obtiveram um $SFC_{35^{\circ}C}$ final de 3 % em 120 min usando a lipase Novozym 435B e utilizando uma mistura de óleos semelhante a utilizada no presente trabalho.

No entanto, como não foi possível otimizar as condições operacionais das reações descritas neste trabalho, ainda pode-se obter melhorias significativas na velocidade de reação. Por exemplo, seria possível aumentar a concentração de catalisador no meio reacional, adicionando-se mais sólido fermentado. Também pode ser possível utilizar uma coluna de leito fixo como reator. Processo semelhante foi desenvolvido por Salum et al. (2010) para síntese de ésteres de biodiesel em um sistema de cossolventes. Melhorias no processo de fermentação, com aumento da atividade enzimática, também são possíveis, reduzindo assim, o tempo necessário para atingir-se um produto com baixo $SFC_{35^{\circ}C}$.

Em conformidade com o trabalho de Osório et al. (2001), que estudaram a interesterificação utilizando estearina de palma e óleo de palmiste como substratos, os níveis finais de ácidos graxos livres foram elevados (4 %). Os aumentos nos níveis de ácidos graxos livres durante a interesterificação catalisada por lipase de misturas binárias ou ternárias de gordura em meio livre de solvente é um problema geral (ZAINAL e YUSOFF, 1999; NASCIMENTO et al., 2004; SILVA et al., 2009; MINGA e GHAZALI, 1999; ZHANG et al., 2001), que tem sido minimizado pelo controle do a_w do meio reacional (OSÓRIO et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2004) ou por de processos posteriores que auxiliem na retirada do excesso de ácidos graxos livres, como a desodorização (HOLM e COWAN, 2008).

5.2.3.3 Ensaio de reutilização do sólido fermentado

Foram realizados ensaios de reutilização dos sólidos fermentados SFRO (Figura 34) e SFRM (Figura 35), utilizando as condições reacionais referentes ao ponto central do planejamento experimental (PS 55 %, EPAX 15 % e temperatura de 65°C). Para SFRO, após a primeira utilização do sólido fermentado, foi observada uma redução no $SFC_{35^{\circ}C}$ Red (%) de 59 %. Após a sexta reutilização, foi observada apenas 2 % do valor inicial de $SFC_{35^{\circ}C}$ Red (%).

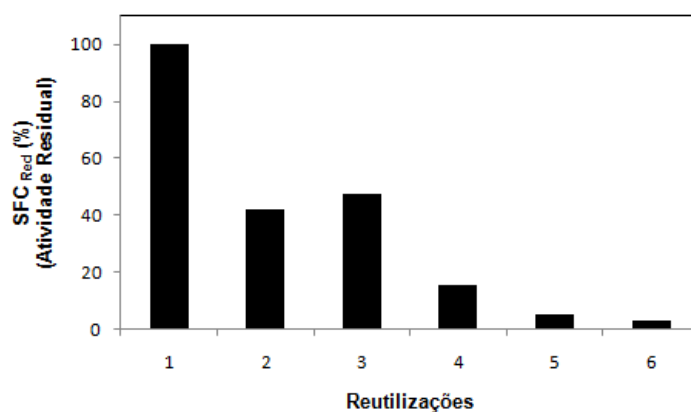


FIGURA 34 - ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae*. Condições utilizadas: PS 55 %, EPAX 15 % e temperatura de 65°C.

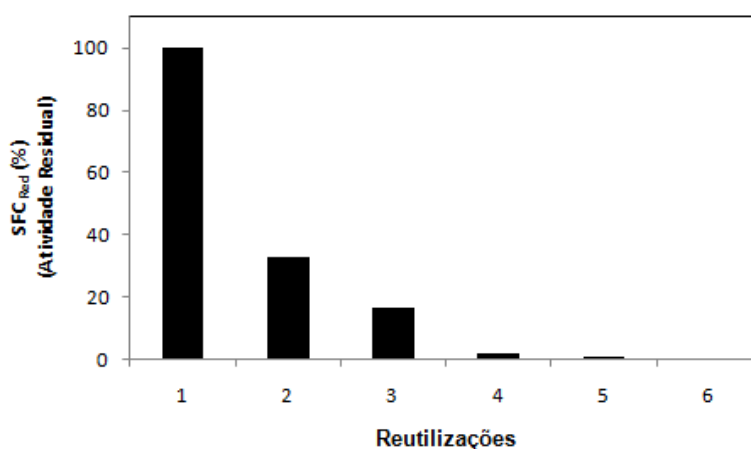


FIGURA 35 - ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*. Condições utilizadas: PS 55 %, EPAX 15 % e temperatura de 65°C.

Quando SFRM foi utilizado para as reações de interesterificação, ocorreu uma redução de mais de 60 % da $SFC_{35^{\circ}C}$ Red (%) observada inicialmente, em sua segunda utilização. Após a quinta reutilização não foram verificadas alterações no $SFC_{35^{\circ}C}$. Este resultado pode ter ocorrido devido à aderência da gordura ao sólido fermentado, utilizado como catalisador, já que não foram utilizados métodos de lavagem para retirada da gordura.

5.2.4 Validação da otimização das reações de interesterificação

Para avaliar a aplicabilidade do modelo descrito pelo delineamento experimental, foi realizada uma reação em duplicata, utilizando o SFRO como catalisador, utilizando as condições determinadas pelo planejamento experimental (temperatura de 65 °C, 38 % de estearina de palma e 15 % de EPAX). O produto final apresentou um conteúdo de gordura sólida de apenas 2,0 % ($\pm$ 0,5 %), confirmando os resultados observados no planejamento experimental.

5.3 ESTUDOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS POR TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA

A metodologia utilizada nas reações de transesterificação ácida baseou-se no trabalho de Tecelão et al. (2010), que realizaram reações de transesterificação entre a tripalmitina e os ácidos oléico e ômega-3 (Figura 36). O principal objetivo desta fase do trabalho foi a redução do valor calórico do óleo de oliva pelo inserção de ácidos graxos de cadeia média em um triacilglicerol contendo ácidos graxos de cadeia longa.

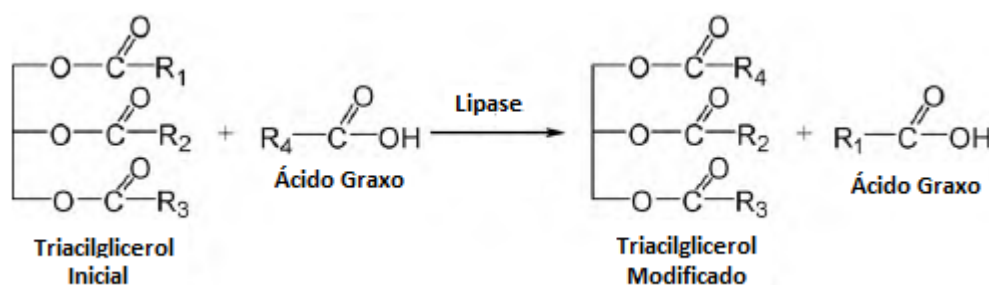


FIGURA 36 – ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ÁCIDA CATALISADA POR LIPASES

Inicialmente, foi verificada a tipo-seletividade (atividade frente a diferentes comprimentos de cadeias carbônicas do ácido graxo) das lipases contidas nos sólidos fermentados (SFRM e SFRO) em meio livre de solvente. Para tanto, o meio reacional foi composto por trioléína e ácidos graxos de cadeia curta e média (< C12:0).

O óleo de oliva é um substrato que apresenta em sua composição apenas ácidos graxos de cadeia longa (> C12:0), podendo apresentar até 83 % de ácido oléico (C18:1) (REDA e CARNEIRO, 2007). Os ácidos graxos utilizados nas reações foram: ácido butírico (C4:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0) e como controle, um ácido graxo de cadeia longa, o ácido

palmítico (C16:0). Essas reações de transesterificação ácida foram mantidas durante 24 h em reatores de 20 mL, a 45°C. A percentagem de inserção dos ácidos graxos na cadeia do triacilglicerol foi determinada por análise em cromatógrafo a gás, segundo metodologia descrita no item 4.5.2.4 b. Os resultados estão apresentados na Figura 37.

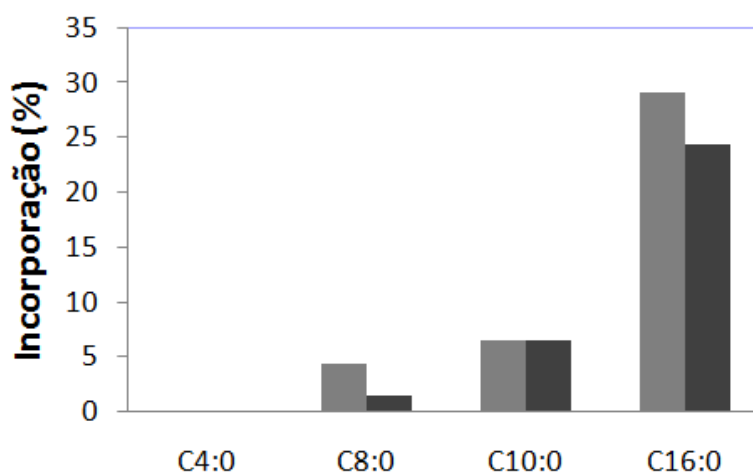


FIGURA 37 - INCORPORAÇÃO (%) DOS ÁCIDOS BUTÍRICO (C4:0), CAPRÍLICO (C8:0), CÁPRICO (C10:0) E PALMÍTICO (C16:0) EM ÓLEO DE OLIVA, UTILIZANDO COMO CATALISADORES OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR *Rhizopus oryzae* (■) E *Rhizopus microsporus* (■).

Tempo de reação: 24 h, temperatura: 45°C, meio livre de solvente.

Nesse experimento inicial, observou-se uma maior incorporação de ácido palmítico (C16:0), para ambos os sólidos fermentados (30 % para SFRO e 25 % para SFRM). Quando se utilizou o ácido cáprico (C10:0), a incorporação foi de 7 % para ambos os sólidos fermentados. De uma maneira geral, para ambos os sólidos, o teor de incorporação do ácido graxo foi proporcional ao comprimento da cadeia carbônica, não tendo sido observada incorporação no óleo de oliva quando o ácido butírico (C4:0) foi utilizado. Este

comportamento já tinha sido verificado por outros autores para lipases de *R. oryzae* (NUNES et al., 2011; GUILLÉN et al., 2011).

Entre os ácidos graxos utilizados, o que apresentou maior incorporação (aproximadamente 7%) em óleo de oliva e o menor comprimento de cadeia, nas condições testadas foi o ácido cáprico (C10:0). Assim, esse ácido foi escolhido para dar continuidade aos experimentos de transesterificação, uma vez que, por apresentar uma cadeia carbônica menor do que as cadeias já presentes no óleo de oliva, sua incorporação possibilita a redução do valor calórico do produto final.

5.3.1 Otimização das reações de transesterificação ácida por planejamento fatorial

Com o objetivo de determinar quais as melhores condições para a incorporação do ácido cáprico em óleo de oliva, a serem determinadas por otimização do processo por delineamento fatorial, foi realizado um experimento para determinar os pontos máximo e mínimo da região experimental em relação à temperatura (40 °C e 60 °C). As reações foram mantidas durante 24 h, utilizando 67 % (v/v) de ácido cáprico e 33 % (v/v) de óleo de oliva.

Na Figura 38 observa-se a incorporação de ácido cáprico em óleo de oliva em torno de 4,4 % ($\pm 0,2$) para ambas as temperaturas. Quando se utilizou SFRM, a incorporação foi de 4,4 % ($\pm 0,1$) a 40°C e 4,2 % ($\pm 0,2$) a 60°C. Desta forma, este experimento mostrou que ocorreu reação nas temperaturas de 40°C e 60°C. Com base nestes resultados, foi definida a faixa de temperatura a ser utilizada no delineamento fatorial.

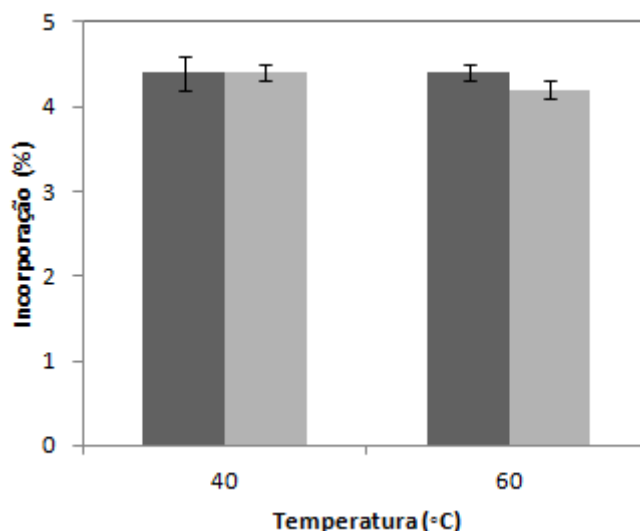


FIGURA 38 – EFEITO DA TEMPERATURA NA INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA, UTILIZANDO OS SÓLIDOS FERMENTADOS POR (■) *Rhizopus oryzae* E (■) *Rhizopus microsporus*.

Condições reacionais: 24 h, 67 % de ácido cáprico e 33 % de óleo de oliva.

As condições utilizadas no planejamento fatorial, a composição de cada meio de reação e os valores observados e esperados, correspondentes à incorporação (%) são apresentados na Tabela 31, para ambos os sólidos fermentados (SFRO e SFRM).

Em uma análise geral, observa-se na Tabela 31 que SFRO é muito mais ativo na reação de transesterificação do que SFRM, produzindo 14,2 % de incorporação (experimento 1), (30 °C, com 67 % de ácido cáprico), em comparação a um máximo de apenas 6,5 % de incorporação (experimento 2) para SFRM, (60 °C, 67 % de ácido cáprico). As diferentes temperaturas encontradas para os dois fungos (30°C e 60°C) para obtenção dos valores máximos de incorporação podem ser explicadas pelo fato de *R. microsporus* ser um fungo termotolerante (KITPREECHAVANICH et al., 2008), e assim, seria capaz de produzir lipases com maior atividade na temperatura de 60°C.

TABELA 31 - OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DE GORDURAS UTILIZANDO DE ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA COMO SUBSTRATOS E CATALISADA PELOS SÓLIDOS FERMENTADOS POR *Rhizopus microsporus* E *Rhizopus oryzae*: VARIÁVEIS, NÍVEIS E RESULTADOS.

Ensaio	Temperatura (° C), X_1	Ácido (%), X_2	Incorporação (%) <i>R. oryzae</i>		Incorporação (%) <i>R. microsporus</i>	
			Observados	Esperados	Observados	Esperados
1	30 (-1)	67 (-1)	14,2	13,9	5,1	4,9
2	60 (1)	67 (-1)	6,0	6,2	6,5	6,4
3	30 (-1)	85 (1)	11,9	11,9	1,4	1,5
4	60 (1)	85 (1)	11,5	11,7	0,7	0,8
5	45 (0)	55 (-1,68)	13,0	13,0	5,3	5,4
6	45 (0)	87 (1,68)	11,9	12,3	1,5	1,1
7	24 (-1,68)	80 (0)	10,2	11,0	2,4	2,4
8	68 (1,68)	80 (0)	9,3	8,8	2,2	2,2
9	45 (0)	80 (0)	10,7	10,9	4,1	4,1
10	45 (0)	80 (0)	12,4	10,9	3,8	4,1
11	45 (0)	80 (0)	9,7	10,9	3,9	4,1
12	45 (0)	80 (0)	10,7	10,9	4,4	4,1

Em seguida, foram feitas as análises de variância dos resultados mostrados na Tabela 32 para cada sólido fermentado separadamente, o que será descrito a seguir.

5.3.2 Análise Estatística para reações de transesterificação catalisadas pelo sólido fermentado por *Rhizopus oryzae*

A análise de variância e os efeitos lineares e quadráticos de cada variável e suas interações estão mostrados na Tabela 32.

A partir dos coeficientes calculados (Tabela 32) foi estabelecida a equação modelo:

$$Y_9 = 113,82 - 1,14X_1 - 2,05X_2 - 0,002X_1^2 + 0,009X_2^2 + 0,01X_1X_2 \quad (9)$$

Sendo: Y_9 a variável resposta percentagem de incorporação de ácido cáprico, X_1 e X_2 , as variáveis independentes temperatura (°C) e concentração de ácido cáprico no meio reacional (%), respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 32) indicou que o modelo polinomial de segunda ordem (Eq. 9), apresentou um coeficiente de determinação apenas satisfatório ($R^2 = 0,87$), além de ter apresentado um valor de F calculado (8,67) menor do que o F tabelado (9,01). Dessa maneira, a equação não pode ser considerada satisfatória para a predição de dados experimentais. Entretanto, algumas conclusões podem ser retiradas da análise dos dados experimentais: as variáveis que influenciaram significativamente a resposta foram a temperatura (linear) e a concentração de ácido cáprico (quadrático), e o seu termo de interação ($p = 0,003$, 0,048 e 0,003 respectivamente).

TABELA 32 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2^3 PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae* (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 31).

Fonte	Coefficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	113,82	42,80	5	42,80	8,65	0,0005**
T	-1,14	21,69	1	21,69	21,79	0,003**
Ácido	-2,05	2,31	1	2,31	2,32	0,177
T²	-0,002	1,27	1	1,27	1,27	0,301
Ácido²	0,009	6,07	1	6,07	6,09	0,048*
T×Ácido	0,01	20,42	1	20,42	20,51	0,003**
Resíduos		5,97	6	0,99		
Falta de ajuste		2,20	3	0,73	0,58	0,664
Erro puro		3,76	3	1,25		
Total		48,77	11			

$R^2 = 0,87$; $F_{5,3, 0,05} = 9,01$; *Significante ao nível de 5 %. **Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura; Ácido: Ácido cáprico.

As melhores condições para se obter o máximo de incorporação (26 %) seriam obtidas quando 55 % de ácido cáprico fosse utilizado no meio reacional, a 30°C. Mas, devido a não confiabilidade do modelo, estes dados precisam ser utilizados com cautela.

5.3.3 Análise Estatística para reações de transesterificação catalisadas pelo sólido fermentado por *Rhizopus microsporus*

A análise de variância e os efeitos lineares e quadráticos de cada variável e suas interações estão mostrados na Tabela 33.

A equação modelo que descreve a reação entre ácido cáprico e óleo de oliva, utilizando SFRM foi determinada a partir dos coeficientes calculados:

$$Y_{10} = -65,44 + 0,67X_1 + 1,70X_2 - 0,004X_1^2 - 0,01X_2^2 - 0,004X_1X_2 \quad (10)$$

Sendo: Y_9 e Y_{10} as variáveis resposta percentagem de incorporação de ácido cáprico para *R. oryzae* e *R. microsporus*, respectivamente, X_1 e X_2 , as variáveis independentes temperatura (°C) e concentração de ácido cáprico no meio reacional (%), respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) (Tabela 33) indicou que o modelo polinomial de segunda ordem (Eq. 10) é estatisticamente significativo e adequado para representar a relação entre a resposta [Incorporação (%)] e as variáveis independentes, pois o valor de F (99,71) foi aproximadamente dez vezes superior ao tabulado (9,01) e o coeficiente de determinação é satisfatório ($R^2 = 0,98$).

TABELA 33 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2³ PARA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO, UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus* (DADOS APRESENTADOS NA TABELA 31).

Fonte	Coeficientes	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média	F calculado	p
Média	-65,44	34,90	5	34,90	99,71	0,00005**
T	0,67	0,21	1	0,21	2,09	0,139
Ácido	1,70	29,37	1	29,37	409,68	0,00001**
T²	-0,004	5,06	1	5,06	70,63	0,0001**
Ácido²	-0,01	9,80	1	9,80	136,75	0,00002**
T×Ácido	-0,004	1,22	1	1,22	17,04	0,006**
Resíduos		0,43	6	0,07		
Falta de ajuste		0,22	3	0,07	1,04	0,484
Erro puro		0,21	3	0,07		
Total		35,33	11			

$R^2 = 0,98$; $F_{5,3,0,05} = 9,01$; *Significante ao nível de 5 %. **Significante ao nível de 1 %. T: Temperatura; Ácido: Ácido cáprico.

Esse valor indica que 98 % da variação pode ser atribuída às variáveis independentes e somente 2 % da variação total não pode ser explicada pelo modelo, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Além disso, a falta de ajuste para o modelo não foi significativa ($p = 0,484$), indicando que a equação prevista pode ser utilizada para prever a resposta de qualquer combinação das variáveis.

A Figura 39 mostra a superfície de resposta para a incorporação (%) de ácido cáprico em óleo de oliva em função da temperatura e da concentração de ácido cáprico. Analisando a superfície de resposta, a maior incorporação (%) prevista pelo modelo é de 6,8 %, quando 64 % de ácido cáprico fossem utilizados, a 52°C.

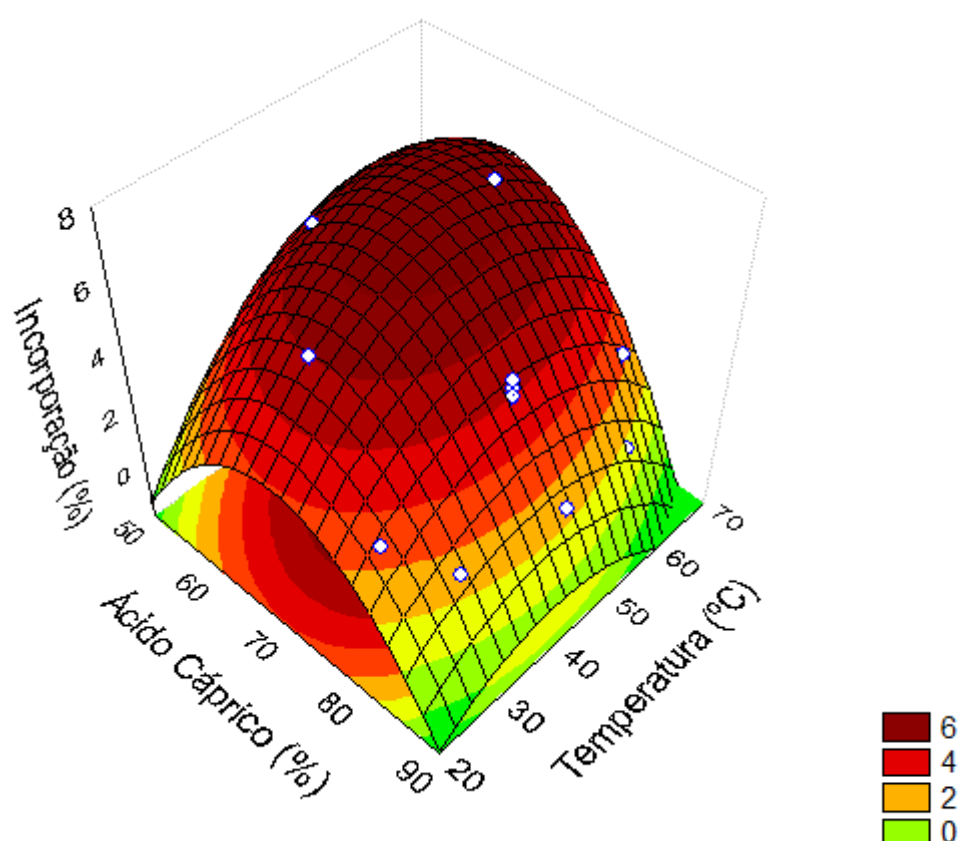


FIGURA 39 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DOS VALORES DE INCORPORAÇÃO (%) DO ÁCIDO CÁPRICO EM ÓLEO DE OLIVA OBTIDOS UTILIZANDO O SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus microsporus*. TEMPO DE REAÇÃO: 24 h.

Alguns autores já estudaram a incorporação de ácido cáprico em diversos óleos, utilizando lipases comerciais. Jennings & Akoh (2001) incorporaram ácido cáprico em óleo de peixe, utilizando a lipase IM60, de *Rhizomucor miehei*, em sistema utilizando *n*-hexano como cossolvente e em sistema livre de solvente. Os autores observaram que, após 24 h de reação em *n*-hexano, a incorporação foi de aproximadamente 31%, enquanto, em sistema livre de solventes, esta foi de 28 %. Zhao et al. (2007) estudaram a incorporação de ácido cáprico em banha de porco. Foram utilizadas cinco lipases comerciais, sendo que Lipozyme TL IM apresentou a melhor incorporação (37 %) após 24 h de reação, utilizando a razão molar de 1:2 (banha: ácido cáprico). Nunes et al. (2011) estudaram a incorporação de ácido graxos de cadeia média em óleo de oliva, utilizando enzimas comerciais (Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435) e observaram a incorporação de mais de 20 % dos ácidos graxos após 24 h de reação. Kim et al. (2001) catalisaram a reação entre tricaprilina e ácido linoléico utilizando três enzimas comerciais. Dentre elas, a reação catalisada pela lipase Novozym 435 apresentou incorporação de mais de 54 % de ácido linoléico no triacilglicerol de interesse.

5.3.4 Experimentos de reutilização dos sólidos fermentados

Como a maior incorporação (%) de ácido cáprico em óleo de oliva foi verificada quando o sólido fermentado por *R. oryzae* foi utilizado, foram realizadas análises de reutilização do sólido fermentado, utilizando o mesmo sistema reacional (Figura 40). Para tanto, o sólido fermentado foi filtrado e seco antes de ser reutilizado. Cada reação foi mantida a 45°C durante 24 h,

utilizando 80 % de ácido cáprico no meio reacional e 20 % de óleo de oliva (1:4 – óleo de oliva:ácido cáprico).

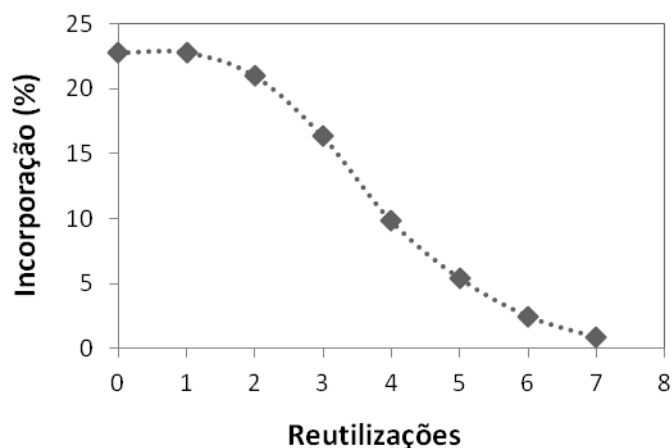


FIGURA 40 - REUTILIZAÇÃO DO SÓLIDO FERMENTADO POR *Rhizopus oryzae* COMO CATALISADOR DE REAÇÕES ENTRE ÁCIDO CÁPRICO E ÓLEO DE OLIVA.

Condições: Temperatura: 45°C; ácido cáprico: 80 %; óleo de oliva: 20 %.

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 40. Foi possível reutilizar quatro vezes o sólido fermentado, com perda de 50 % da incorporação. Após sete reutilizações, não foi observada mais incorporação de ácido cáprico em óleo de oliva, nas condições utilizadas.

Um sistema semelhante foi utilizado por Nunes et al., (2011) para incorporação de ácido cáprico em óleo de oliva, utilizando uma lipase recombinante de *R. oryzae*, imobilizada em Eupergit C. Os autores observaram que a enzima manteve a atividade em aproximadamente 100 % durante quatro reutilizações. Após a quarta reutilização houve queda da incorporação chegando a 40 % durante a sétima reutilização. Utilizando a lipase comercial Lipozyme TL IM, os mesmos autores observaram a manutenção da atividade de incorporação do ácido cáprico durante 10 reutilizações (NUNES et al., 2011).

Industrialmente, os substratos utilizados nos processos de produção apresentam características físicas diferentes, que inviabilizam a sua utilização a partir de uma simples mistura. Por isso, a incorporação química ou enzimática de ácidos graxos torna-se a única alternativa para a indústria.

A transesterificação e a interesterificação química são processos simples e baratos, mas que apresentam como inconveniente a necessidade de uma etapa final de purificação, onde o catalisador químico é removido para obtenção do produto de interesse. Já os processos enzimáticos, que utilizam lipases são mais desejáveis em relação aos químicos por se tratarem de processos altamente específicos quanto à incorporação de ácidos graxos nas posições desejadas e não requererem condições reacionais agressivas envolvendo altas temperaturas. Entretanto, a utilização de processos enzimáticos, em escala industrial, para a obtenção de lipídios estruturados tem sido pouco adotada devido ao alto custo do biocatalisador (WILLIS e MARANGONI, 1999). As aplicações atuais são reservadas a produtos de alto valor agregado. Neste trabalho, foi utilizado um biocatalisador de baixo custo, visando o desenvolvimento de processos mais econômicos, que permitam a sua aplicação industrial, tornando possível o emprego do processo enzimático em produtos de maior consumo.

Os biocatalisadores testados apresentaram atividade de transesterificação ácida e interesterificação, em meio livre de solvente, sendo verificada uma preferência por ácidos graxos de cadeia média (ácidos cáprico e caprílico) ou longa (ácido palmítico), em relação ao ácido butírico, que apresenta cadeia curta.

A baixa estabilidade operacional, observada pela redução da atividade após as reutilizações, pode ter acontecido devido à aderência dos substratos ao sólido fermentado ou liberação parcial da enzima presente no sólido fermentado. Processos alternativos de lavagem do sólido fermentado e filtração do produto final podem ser empregados visando melhorar o rendimento do processo e reduzir o seu custo, tornando possível a utilização do sistema enzimático para obtenção de lipídios estruturados.

6 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados neste trabalho, pode-se concluir que:

1. Foi possível produzir a lipase de *R. microsporus* e *R. oryzae* por FES utilizando como substratos o bagaço de cana-de-açúcar (resíduo agroindustrial) e a semente de girassol.
2. A lipase de *R. microsporus* apresentou uma atividade de hidrólise de 160 U.gSS⁻¹ quando tricaprilina foi utilizada como substrato e 50 U.gSS⁻¹ quando trioleína foi utilizada. A atividade de esterificação foi de 7 U.gSS⁻¹.
3. A partir do delineamento fatorial 2³ foi possível otimizar a produção de lipases pelo fungo *R. oryzae*. A melhor atividade de hidrólise de trioleína, estipulada pelo delineamento, foi de 150 U.gSS⁻¹, e 380 U.gSS⁻¹ para tricaprilina utilizando as seguintes condições: a menor concentração de

bagaço de cana (10 %), umidade de 70 % e temperatura de cultivo de 26°C.

4. A partir do delineamento fatorial 2^3 também foi possível otimizar a produção de lipases pelo fungo *R. oryzae* tendo a síntese de oleato de etila como variável dependente. A melhor atividade de esterificação foi de 11 U.gSS⁻¹, com 100 % de conversão em 1,5 h, utilizando as seguintes condições de cultivo: 70 % de umidade, razão de substratos de 1:3 (bagaço de cana: semente de girassol) e temperatura de fermentação de 30°C. O melhor tempo de fermentação foi estipulado como sendo de 24 h.
5. A partir do delineamento fatorial 2^3 otimizou-se a reação de interesterificação de gorduras, utilizando o sólido fermentado por *R. oryzae* como catalisador. As melhores condições estabelecidas foram de 65 °C, 38 % de estearina de palma e 15 % de EPAX. O produto final apresentou um conteúdo de gordura sólida de apenas 2,0 % ($\pm 0,5$ %).
6. A reação de interesterificação de gorduras, utilizando o sólido fermentado por *R. microsporus* como catalisador também foi otimizada. As melhores condições estabelecidas foram de 60 °C, 45 % de estearina de palma e 10 % de EPAX. O produto final apresentou um conteúdo de gordura sólida 3,9 %.
7. As reações de transesterificação ácida, utilizando os sólidos fermentados por *R. microsporus* e *R. oryzae* foram otimizadas através de um delineamento 2^2 utilizando ácido cáprico e óleo de oliva como

substratos. As melhores condições estabelecidas foram de 30 °C e 55 % de ácido cáprico. A melhor incorporação de ácido cáprico foi de 26 %.

7 TRABALHOS FUTUROS

Este estudo da utilização de sólidos fermentados para a síntese de gorduras modificadas permitiu identificar pontos a serem explorados, como:

- Estudos de estabilidade, variando-se o método de lavagem do sólido fermentado;
- Purificação e estudo das características bioquímicas das lipases contidas no sólido fermentado;
- Estudos de imobilização das enzimas purificadas em suportes conhecidos, para aplicação em reações de interesterificação e transesterificação.
- Estudos de imobilização das enzimas no sólido fermentado visando melhora na estabilidade reacional;
- Estudos de aumento de escala dos processos de interesterificação e transesterificação ácida de gorduras.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, D. produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Paraná, 173p., 2009.

ALBERTON, D.; MITCHELL, A. M.; CÓRDOVA, J.; ZAMORA, P. P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 28-35, 2010.

ALONSO, F. O. M. “Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*”. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 139p., 2001.

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

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 18 ed. Gaithersburg. AOAC International, 2005.

BEER, H. D.; MCCARTHY, J. E. G.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, R. D. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1399, p. 173-180, 1998.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Regioselectivity of lipases in organic solvents. **Biotechnology Letters**, v.13, p. 333-338, 1991.

BIONDO, P.D.; BRINDLEY, D.N.; SAWYER, M.B.; FIELD, C.J. The potential for treatment with dietary long-chain polyunsaturated n-3 fatty acids during chemotherapy **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p.787-96, 2008.

BORNSCHEUER, U. W. Alteration of lipase properties by protein engineering methods. **Oléagineux, Corps Gras, Lipides**, v.15, p.184-189, 2008.

BORNSCHEUER, U.; PLEISS, J.; HENKE, E. Understanding Activity of Hydrolases Towards Tertiary Alcohols. **Chemie Ingenieur Technik**, v. 74, p. 683–684, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro 2003. **Diário Oficial da República Federativa de Brasil**, Brasília, 26 de dez. 2003.

CAMACHO, F.; ROBLES, A.; CAMACHO, B.; GONZÁLEZ, P.A.; ESTEBAN, L.; MOLINA, E. Modeling of the kinetic for the acidolysis of different triacylglycerols and caprylic acid catalyzed by Lipozyme IM immobilized in packed bed reactor **Chemical Engineering Science**, v.62, p. 3127 – 3141, 2007.

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

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA, J.R.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

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

CARRIN, M. E.; CRAPISTE, G. H. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture. **Journal of Food Engineering**, v.84, p.243-249, 2008.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ªed. Artmed Editora. 534p., 2006

CHIU, M. C.; GIOIELLI, L. A.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média II- pontos de amolecimento e fusão **Química Nova**, v.31, p. 232-237, 2008.

CHRISTIE, W. W. **Advanced dairy chemistry-2: Lipids**, P. F. Fox (Ed.), London: Chapman & Hall, 1995.

CHRISTEN P., ANGELES N., CORZO G., FARRES A., REVAH S. Microbial lipase production on a polymeric Resin. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 8, p. 597-600,1995.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p.1012–1018, 2008.

CONNOR, W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal for Clinical Nutrition**. v. 71, p. 171S-175S, 2000.

COVAS, M-I. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v.55, p.175–186, 2007.

DABBOU, S.; RJIBA, I.; ECHBILI, A.; GAZZAH, N.; MECHRI B.; MOHAMED H. Effect of controlled crossing on the triglyceride and fatty acid composition of

virgin olive oils. **Chem Biodivers**, v.7, p.1801-1813, 2010.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados a partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p. 345-354, 2002.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; GREEN, L.; WEI, Y.; YAMAGUCHI, S.; JOERGER, R.; HAAS, M.J.; DEREWENDA, Z. S. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. **Protein Engineering**, v. 7, p.551-557, 1994.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 6ªed. Editora Blucher, 1216p., 2007.

DIAZ, J.C.M.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; F. CARRIERE, J. BARATTI, Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p.1042–1050, 2006.

DIYOROV, J.K.; LUSTA K.A., TSIOMENKO A.B. E KULAEV I.S. Molecular forms of lipases and their localization in the fungus *Rhizopus microsporus* by immuno-electron microscopy. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.10, p. 367-373, 1994.

ERICKSON, M. D. Interesterification in: Erickson, D. R. (Ed.) **Practical handbook of soybean processing and utilization**. AOCS Press and United Soybean Board, Champaign (USA), p. 277-296, 1995.

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

FAUR, L. in: **Oils and fats Manual**. A. KARLESKIND, J.P. WOLFF (Eds.), Association Française pour l'Étude des Corps Gras, London, Paris & New York, p. 923-995, 1996.

FELTES, M.M.C. Estudo da Síntese Química e enzimática de triacilglicerídeos estruturados a partir do óleo de peixe. **Dissertação de mestrado**, 2006, 121 p.

FENNEMA, O.R., **Química de los alimentos**. 2º Ed., Acibria, Zaragoza, Espanha. 1095 p. 1993.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A. KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.44, p. 8-13, 2007.

FERREIRA-DIAS, S., DA FONSECA, M. M. R. Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: Effect of the water activity, **Bioprocess Eng.**, v.12, p. 327–337, 1995.

FIEBIG, H.J.; LÜTTKE, J. Solid fat content in fats and oils – determination by pulsed nuclear magnetic resonance spectroscopy [C-IV 3g (2003)], **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p. 377–380, 2003.

GACULA, M; SINGH, J. **Statist methods in food and consumer research**. Califórnia, USA, Elsevier, 110p, 1984.

GANDHI, N.N.; MUKHERJEE, K.D. Reactivity of Medium-Chain Substrates in the Interesterification of Tripalmitin Catalyzed by Papaya Lipase, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 965-968, 2001.

GARÓFOLO, A. & PETRILLI, A.A. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Rev. Nutr. Campinas**, v.19, n. 5, p.611-621, 2006.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 34–41, 2007.

GIOIELLI, L. A.; CHIU, M. C.; GRIMALDI, R. Structured lipids from chicken fat, its stearin, and medium chain triacylglycerol blends: II- softening and melting points. **Química Nova**, v.31, p. 238-243, 2008.

GÓMEZ-RICO, A.; SALVADOR, D.; FREGAPANE G. Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ET_c in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). **Food Research International**, v. 42, p. 1067–1076, 2009.

GORJÃO, R.; AZEVEDO-MARTINS, A. K.; RODRIGUES, H. G.; ABDULKADER, F.; ARCISIO-MIRANDA, M.; PROCOPIO, J.; CURI, R. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, p. 56–64, 2009.

GRAILLE, J. Providing biocatalysts through customizing lipases by different processes. **Oléagineux Corps Gräs Lipides**, v.6, p.365-72, 1999.

GUILLÉN, M.; BENAIGES, M. D.; VALERO F. Comparison of the biochemical properties of a recombinant lipase extract from *Rhizopus oryzae* expressed in *Pichia pastoris* with a native extract. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 117–123, 2011.

HAMA, S.; YAMAJI, H.; FUKUMIZU, T.; NUMATA, T.; TAMALAMPUDI, S.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within

biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 273-278, 2007.

HAMAM, F.; SHAHIDI, F. Incorporation of selected long-chain fatty acids into trilinolein and trilinolenin, **Food Chemistry**, v.106, p. 33-39, 2008.

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

HIOL, A.; JONZO, M. D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAUA, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421–430, 2000.

HÖLKER, U; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

HOLM, H. C.; COWAN, D. The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.679-691, 2008.

HOUMOLLER, L. P.; KRISTENSEN, D.; ROSAGER, H. Determination of SFC, FFA, and equivalent reaction time for enzymatically interestified oils using NIRS, **Talanta**, v.71, p.868–873, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz, 2005.

JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am J Clin Nutr**, v.71, p. 343-348, 2000.

JANG,H. & YANG, S. Polyunsaturated fatty acids production with a solid-state column reactor. **Bioresource Technology** , v.99 p.6181-6189, 2008.

JENNESSEN, J.; SCHNURER, J; OLSSON, J.; SAMSON, R. A.; DIJKSTERHUIS, J. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the R. microsporus group. **Mycological Research**, v.112, p.547–563, 2008.

JENNINGS, B.H.; AKOH, C.C. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v.72, p.273-278, 2001.

KAMAL-ELDIN, A.; YANISHLIEVA, N. V. (2002). *N*-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.825–836, 2002.

KARBOUNE, S., ST-LOUIS, R. KERMASHA, S. Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 52-3, p. 96-105, 2008.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y-T.; KARRA-CHÂABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v.46, p.1083–1089, 2011.

KELLY, G.S. Conjugated Linoleic Acid: A Review. **Altern Med Rev**. v.6 n.4 p.367-382, 2001.

KIM, I.H.; YOON, C.S.; CHO, S.H.; LEE, K.W.; CHUNG, S.H.; TAE, B.S. Lipase-Catalyzed Incorporation of Conjugated Linoleic Acid into Tricaprylin **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 78, p. 547-551, 2001.

KITPREECHAVANICH, V.; MANEEBOON, T.; KAYANO, Y.; SAKAI, K. Comparative characterization of L-lactic acid-producing thermotolerant *Rhizopus* fungi. **J Biosci Bioeng**., v.106, p.541-546, 2008.

KOVAC, A.; SCHEIB, H.; PLEISS, J.; SCHMID, R. D.; PALTAUF, F. Molecular basis of lipase stereoselectivity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p. 61-77, 2000.

KRIEGER, N.; BHATNÁGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M. G.; MITCHELL, D. A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v.42, p. 279-286, 2004.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. **Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p. 20-30, 2003.

KUBOW, S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structured-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 530-541, 1996.

LAIA, O. M.; GHAZALIA, H. M.; CHO, F.; CHONG C. L. Physical and textural properties of an experimental table margarine prepared from lipase-catalysed transesterified palm stearin: palm kernel olein mixture during storage, **Food Chemistry**, v.71, p.173-179, 2000.

LEE, J.H.; JONES, K.C.; FOGLIA, T.A.; LEE, C.R.; AKOH, C.C.; LEE, K. T., High performance liquid chromatographic separation of interesterified palm oil with tributyrin, **LWT**, v.41, p.1446–1451, 2008.

LEE, K.T., AKOH, C.C. Structured lipids: synthesis and applications, **Food Rev Int.**, v.14, p.17-34, 1998.

LEE, S.; KIM, J.; WON, K.; CHOI, G. J.; LIM, H. K.; CHO, K. Y. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil Microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.65, p.720–726, 2004.

LEIGHTON, T. J.; DOR, R.H.; WARREN, R.A.; KELLN, R.A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J Mol Biol.** v. 76, p.103–122, 1973.

LI, D.; ADHIKARI, P.; SHIN, J. A.; LEE, J.H.; KIM, Y.J.; ZHU, X.M.; HU, J.N.; JIN, J.; AKOH, C.C.; LEE, K.T. Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats, **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.458–464, 2010.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochem. Eng. J.**, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.

LOPES-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v.61, p.200–207, 2010.

LORENZO, M.; HIDALGO, A.; HAAS, M.; BORNSCHEUER, U. T. Heterologous Production of Functional Forms of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Escherichia coli* **Applied and Environmental Microbiology**. p. 8974–8977, 2005.

LOWRY, R. R.; TINSLEY, I. J. Rapid colorimetric determination of free fatty-acids **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 53, n. 7, p. 470-472, 1976.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v.9, p. 1729–1735, 2008.

MATEOS DIAZ, J. C.; RODRIGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM D, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p. 1042–1050, 2006.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCÍA, S. H.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid-state fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**. v.151, p.393–401, 2008.

MINGA, L.O.; GHAZALI, H.M.; LET, C.C. Use of enzymatic transesterified palm stearin-sunflower oil blends in the preparation of table margarine formulation, **Food Chemistry**, v.64, p. 83-88, 1999.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of Solid State Bioprocessing. **Biotechnology Annual Review**, v. 8, p. 183-225, 2002.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. Ed. Springer, p.13-32, 2006.

MITCHELL, P. L.; McLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. **Biochem. Cell Biol.**, v. 86, p. 293–301, 2008.

MONTGOMERY, R.; SPECTOR, A. A.; CONWAY, T. W. **Bioquímica: uma abordagem dirigida por casos**. 5ªed. Artes Médicas, 477p., 1994.

MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. **Progress in Lipid Research** v. 44, p. 430-448, 2005.

MUKHERJEE, K.D. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. **Progress in Lipid Research**, v.33, p.165-174, 1994.

NAGY, V.; TOKE, E. R.; KEONG L. C.; SZATZKER G.; IBRAHIM D.; OMAR I. C.; SZAKACS, G.; POPPE L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 39, p. 141-148, 2006.

NANJI, A. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. **Alcohol** , v. 34 ,p. 21 – 25 (2004).

NAPIER, J.A. The production of *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, p. 965–972, 2006.

NASCIMENTO, A. C.; TECELAO, C. S. R.; GUSMAO, J. H.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Modelling lipase-catalysed transesterification of fats containing *n*-3 fatty acids monitored by their solid fat content. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.106, p.599–612, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 3ªed. Editora Sorvier, 975p., 2002.

NUNES, P.A., PIRES-CABRAL, P., FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. **Food Chemistry**, v. 127, p.993–998, 2011.

OSÓRIO, N. M.; FERREIRA-DIAS, S.; GUSMAO, J. H.; DA FONSECA, M. M. R. Response surface modelling of the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. **J Mol Cat B Enzym.**, v.11, p.677–686, 2001.

OSÓRIO, M. N.; RIBEIRO, M. H.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Interesterification of fat blends rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids catalysed by immobilized *Thermomyces lanuginose* lipase under high pressure. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.52–53, p.58–66, 2008.

PABAI, E.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.11, p.669-677, 2005.

PADOVAN, R. M. I.; AMAYA-FARFÁN, J.; COLUGNATI, F. A. B.; DOMENE, S. M. A. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.19, p.741-760, 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PAULA, A.V., NUNES, G.F.M., FREITAS, L., DE CASTRO, H.F., SANTOS, J.C. Interesterification of milkfat and soybean oil blends catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.65 p.117–121, 2010.

PERRIN, J. L. in: KARLESKIND, A.; WOLFF, J. P. Eds., **Oils and Fats Manual**, vol. 2, Lavoisier Publishing, Paris, 1996, Chap. 14, p. 1205.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246–252, 2010.

POUZET, A. Presentation of some results of the Concerted Action on the management of oilseed crops in the European Union. **Oleagineux Corps Gras Lipides**, v.6, n.1, p.6-21, 1996.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 985-992, 2009.

RAMÍREZ FAJARDO, A.; AKOH, C.C.; LAI, O.M. Lipase-Catalyzed Incorporation of n-3 PUFA into Palm Oil, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p.1197-1200, 2003.

RAUF, A.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; AHMED, I.; IQBAL, H.M.N. Optimization of Growth Conditions for Acidic Protease Production from *Rhizopus oligosporus* through Solid State Fermentation of Sunflower Meal, **International Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.1, p. 40-43, 2010.

REDA, S.Y.; CARNEIRO, P.B. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. **Revista Analytica**. v. 27, p. 60-67, 2007.

RIBEIRO, A.B.A.; MOURA, J.M.L.N.; GRIMALDI R.; GONÇALVES, L.A.G.; Interesterificação química: alternativa para obtenção de gorduras zero *trans* **Química Nova**, v.30, p. 1295-1300, 2007

ROGALSKA, E.; CUDREY, C.; FERRATO, F.; VERGER, R. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. **Chirality**, v.5, p.24–30, 1993.

RODRIGUES, R.C.; LAFUENTE, R. F. Lipases from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalist in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.64, 2010.

SAHIN M, SAGDIC G, ELMAS O, AKPINAR D, DERIN N, ASLAN M, AGAR A, ALICIGUZEL Y, YARGICOGLU P. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs. **Pharmacology Research**. v. 54, p. 247-252, 2006.

SANTOS, E. G., Estudo da Adsorção de Contaminantes Orgânicos Provenientes da Água de Extração do Petróleo, em Coluna de Leito Fixo, utilizando Biomassas como Adsorventes. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Campina Grande, UFCG, Campina Grande, Paraíba, 229p. 2005.

SALAH, R.B.; MOSBAH, M.; FENDRI, A.; GARGOURI, A.; GARGOURI, Y.; MEJDOUB, H. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 260, n. 2, p. 241–248, 2006.

SALUM, T. F. C., BARON, A. M., ZAGO, E., TURRA, V., BARATTI, J., MITCHELL, D. A. and KRIEGER, N. An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.26, p. 197-203, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE P.; BAREA B.; YAMAMOTO C. I.; CÔCCO L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v.45, p.1348–1354, 2010.

SALUM, T. Produção e imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* LTEB11 para a síntese de ésteres etílicos. **Tese do doutorado**, 2010, p.131.

SCHIPPER, M. A. A. A revision of the genus *Rhizopus* II: the *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. **Stud. Mycol.**, 1984.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O.S.M. Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 26, p.571-576, 2006.

SILVA, R.C.; COTTING, L. N.; POLTRONIERI, T.P.; BALCÃO, V.M.; DE ALMEIDA, D.B.; GONCALVES, L.A.G.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. The

effects of enzymatic interesterification on the physical-chemical properties of blends of lard and soybean oil, **LWT - Food Science and Technology**, v.42 p.1275–1282, 2009.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

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

SONNTAG, N. O. V. in: SWERN, D. Ed. Bailey's. **Industrial Oil and Fat Products**, vol. 2, Wiley, New York, 1982, 493.

SOUMANOU, M.M., BORNSCHEUER, U.T., MENGE, U., SCHMID, R.D. Synthesis of structured triglycerides from peanut oil with immobilized lipase, **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.74, p.427-433, 1997.

SPECTOR, A. A. Fatty Acid Ethyl Esters: Insight or Intoxication? **Gastroenterology**, v.108, p. 605-607, 1995.

SPOLAORE, P. JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. ; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, p. 87-96, 2006.

SRIVASTAVA, A.; AKOH, C. C.; CHANG, S. W.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.54, p. 5175-81, 2006.

STRAATHOF, A. J. J.; ADLERCREUTZ, P. **Applied biocatalysis**. 2^a ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 295-316, 2000.

STUER, W.; JAEGER, K.E.; WINKLER, U.K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aureginosa*. **The Journal of Bacteriology**, v.168, p.1070-1074, 1986.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its 164 esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2607–2612, 2009.

SWENSON, L., R. GREEN, R. D. JOERGER, M. J. HAAS, K. SCOTT, Y. WEI, U. DEREWENDA, D. M. LAWSON, AND Z. S. DEREWENDA. 1994. Crystallization and preliminary crystallographic studies of the precursor and mature forms of a neutral lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. **Proteins**, v.18, p.301–306, 1994.

TECELÃO, C.; SILVA, J.; DUBREUCQ, E.; RIBEIRO, M. H.; FERREIRA-DIAS, F. Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.65, p. 122–127, 2010.

TORRES, C.F., LIN, B., MOELJADI, M., HILL JR., C.G., (2003), Lipase-catalyzed synthesis of designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic, conjugated linoleic, and/or stearic acids, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p. 614-623, 2003.

TRIVEDI, R.; SINGH R.P. Modifications of oils and fats to produce structured lipids. **Journal of Oleo Science**. v. 54, p. 423-430, 2005.

TURAN, S., I. KARABULUT, H. VURAL. Effects of Reaction Parameters on the Incorporation of Caprylic Acid Into Soybean Oil for Production of Structured Lipids, **Journal of Food Lipids**, v.13, p.306-316, 2006.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32 – 38, 1997.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373-383, 2004.

YASUDA, M.; OGINO, H.; KIGUCHI, T.; KOTANI, T.; TAKAKURA, S.; ISHIBASHI, T.; NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; ISHIKAWA, H. Purification and Characterization of Lipase from *Rhizopus chinensis* Cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, p.571-573. 1999.

YANG, T., XU, X., HE, C., LI, L., Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, **Food Chem.**, v.80, p.473-481, 2003.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

YANG, S. S., YUAN, S.S. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid state fermentation of sweet potato residue. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 6, p. 236–244, 1990.

YANG, S. S., SWEI, W.J. Oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid-state fermentation of corn-cob. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 12, p. 43–46, 1996.

YU, D.; WANG, Z.; ZHAO, L.; CHENG, Y.; CAO, S. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas* sp. Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.48, p. 64–69, 2007.

YU, X-W; WANG, L-L.; XU, L. *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.57, p. 304–311, 2009.

WONGSAKUL, S.; KITTIKUN, A.H.; BORNSCHEUER, U.T. Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerides from 1,3-diacylglycerides. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.5, p.191-155, 2004.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, 2008.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. **Criticals Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, p.639-674, 1998.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Assessment of lipase and chemically catalyzed lipid modification strategies for the production of structured lipids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.76, p.443-450, 1999.

XU, X., Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.102, p.287–303, 2000.

XU, X., Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p.289-304, 2003.

ZAGO, E. Síntese de ésteres etílicos empregando lipases de *Rhizopus microsporus* produzidas por fermentação no estado sólido. **Dissertação de mestrado**, 2010, 127p.

ZAINAL, Z.; YUSOFF, M. S. A., Enzymatic interesterification of palm stearin and palm kernel olein, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, p.1003-1008, 1999.

ZAKS, A., KLIBANOV, A.M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p. 3192-3196, 1985.

ZHAO, H.; LU, L.; BIE, X.; LU, F.; LIU, Z. Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. **Journal of Food Engineering**, v.78, p. 41-46, 2007.