

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA SÍNTESE DE ÉSTERES DE CERA
UTILIZANDO LIPASES EM DIFERENTES SISTEMAS
DE REAÇÃO.**

DANIELLE BRANTA LOPES
Farmacêutica-Bioquímica

Prof. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO
Orientadora

Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos

CAMPINAS-SP
2009

DANIELLE BRANTA LOPES

**ESTUDO DA SÍNTESE DE ÉSTERES DE CERA
UTILIZANDO LIPASES EM DIFERENTES SISTEMAS
DE REAÇÃO.**

Prof. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Orientadora)

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

CAMPINAS-SP
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

L881e Danielle Branta Lopes
Estudo da síntese de ésteres de cera utilizando lípases em diferentes sistemas de reação / Danielle Branta Lopes . -- Campinas, SP: [124p.], 2009.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Lipase. 2. *Rhizopus* sp. 3. Ésteres de cera. 4.
Emulsificantes. 5. Catálise enzimática. I. Macedo, Gabriela Alves.
II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study on the synthesis of wax esters with lipases in different reaction systems
Palavras-chave em inglês (Keywords): Lipase, *Rhizopus* sp., Wax esters, Emulsifier, Enzymatic
catalysis

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo

Patrícia de Oliveira Carvalho

Saartje Hernalsteens

Data de defesa: 18/03/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação de mestrado aprovada e defendida em de de 2009, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/Unicamp
Orientadora

Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho
USF

Profa. Dra. Saartje Hernalsteens
FEQ/Unicamp

Prof. Dra. Eliana Setsuko Kamimura
FZEA/USP

Prof. Dra. Luciana Francisco Fleuri
Unimep

**“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine
sem aplausos.”**
(Charlie Chaplin)

**Aos meus pais e irmãos,
com todo o meu amor
e aos meus avós
Vergílio (*in memorian*) e Ruth,
Aníbal (*in memorian*) e Jesy
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Pedro e Telma, por sempre me apoiarem incondicionalmente e estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Bruno e Carina, e a toda minha família, pelo apoio, incentivo e carinho.

À minha grande amiga Ana Luiza, pela amizade, ajuda e força.

Ao Lauro, pelo amor, carinho, paciência e por fazer parte da minha vida.

Às minhas amigas: Camila, Fer, Gabi, Mari, Fran, Camis, Lena, Flavinha, Mel e Rachel pelo carinho e pela alegria que me transmitiram todo esse tempo.

À minha orientadora, Gabriela, que na orientação deste trabalho conseguiu colocar mais do que o seu saber, mas também o seu carinho. Minha sincera gratidão, respeito e carinho.

A todos os meus colegas dos laboratórios de Bioquímica, Análise de Alimentos e Bioaromas. Não quero citar nomes porque são muitos e temo esquecer alguém. Isso seria imperdoável, pois todos foram importantes. Que o companheirismo e o respeito mútuo que demonstraram nunca sejam esquecidos.

À prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, do CPQBA, juntamente com sua equipe, por toda atenção e auxílio nos testes microbiológicos.

À prof. Dra. Hélia Harumi Sato, pelos ensinamentos.

À prof. Dra. Luciana Francisco Fleuri pelo auxílio na fase final do trabalho.

À minha querida tia Adriana Lopes Schiozer e Adrian Martim Pohlitz pelo carinho e auxílio nas correções deste trabalho.

Às técnicas e demais funcionários do departamento de Ciência de Alimentos, ao Jonas e ao Cosme, pela eficiência, presteza e educação com que sempre tratam os alunos.

À banca examinadora pelos comentários, sugestões e correção da tese.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que acreditaram e confiaram na concretização do meu trabalho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	xx
Abstract	xxii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1. Lipases	5
3.2. Ésteres	10
3.2.1. Ésteres de Cera de Fontes Naturais	11
3.2.2. Ésteres de Cera de Fontes Sintéticas	19
Capítulo I – Seleção de Substratos e Lipases	25
1. Materiais e Métodos.....	25
1.1. Seleção de Substratos	25
1.2. Seleção de Lipases.....	26
1.2.1. Produção de Lipases Microbianas	27
1.2.1.1. Produção da Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	27
1.2.1.2. Produção da Lipase de <i>Geotrichum</i> sp.	27

1.2.1.3. Produção da Lipase de <i>Aspergillus</i> sp. n° 1068.	28
1.2.2. Concentração e Obtenção da Enzima Bruta	29
1.2.3. Determinação da Atividade Lipolítica	29
1.2.4. Determinação da Concentração de Proteínas	30
1.3. Síntese de Ésteres por Lipases.....	30
2. Resultados e Discussão	33
2.1. Seleção de Alcoóis, Ácidos e Lipases a Serem Empregados	33
Capítulo II – Estudo da Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase Obtida de <i>Rhizopus</i> sp. e Lipase Comercial Lipozyme TL IM®.....	42
1. Materiais e Métodos.....	42
1.1. Influência das Variáveis da Reação de Síntese do Éster	42
1.2. Otimização da Síntese de Oleato de Oleíla.....	45
1.3. Cinética de Reação	47
1.4. Efeito da Concentração de Água no Sistema de Síntese.....	48
1.5. Métodos Analíticos	50
1.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	50
1.5.2. Análise e Quantificação dos Ésteres por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa.....	51
2. Resultados e Discussão	52

2.1. Influência das Variáveis da Reação de Síntese do Éster	52
2.2. Otimização da Síntese de Oleato de Oleíla.....	70
2.3. Cinética de Reação	82
2.4. Efeito da Concentração de Água no Sistema de Síntese.....	83
2.5. Métodos Analíticos	86
2.5.1. Identificação dos Compostos Obtidos Utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	86
2.5.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa para a Identificação do Éster	88
Capítulo III – Determinação das Propriedades do Oleato de Oleíla	91
1. Materiais e Métodos.....	91
1.1. Atividade Emulsificante	91
1.2. Atividade Antimicrobiana	93
1.2.1. Método de Difusão em Ágar	94
1.2.2. Método do Cilindro-Placa.....	96
2. Resultados e Discussão	97
2.1. Atividade Emulsificante	97
5.2. Atividade Antimicrobiana	104
6. Conclusões Finais.....	107

7. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	109
8. Referências Bibliográficas	110
ANEXOS.....	123

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 - Semente de Jojoba.....	12
Figura 2 - Árvore de Jojoba.....	13
Figura 3 - Fruto da Árvore de Jojoba.....	14
Figura 4 - Síntese Enzimática do Oleato de Oleíla.....	31
Figura 5 - Superfície de Resposta do Efeito da Relação Molar e Concentração Enzimática na Porcentagem de Esterificação de Oleato de Oleíla Após 120 Minutos de Reação Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	75
Figura 6 - Superfície de Resposta do Efeito da Relação Molar e Concentração Enzimática na Porcentagem de Esterificação de Oleato de Oleíla Após 120 Minutos de Reação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	79
Figura 7 - Cinética Enzimática Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. e a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® para a Produção de Oleato de Oleíla a 40°C.....	82
Figura 8 - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Reação de Ácido Oléico com Álcool Oleílico em Meio Livre de Solvente	86
Figura 9 - Cromatograma do Éster Obtido Através da Esterificação Utilizando Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	89
Figura 10 - Cromatograma do Éster Obtido Através da Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®.....	89

Figura 11 - Placa de Petri com Cilindros Metálicos	97
Figura 12 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Gasolina como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleíla Produzido por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d)	101
Figura 13 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Hexano como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleíla Produzido por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d).	102
Figura 14 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Hexano como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleíla Produzido por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d)	103
Figura 15 - Estudo da Atividade Antimicrobiana com Êster Produzido pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM®, Utilizando Discos de Papel de Filtro e Cilindros de Metal	105
Figura 16 - Estudo da Atividade Antimicrobiana com Êster Produzido pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp., Utilizando Discos de Papel de Filtro e Cilindros de Metal.....	105

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1 - Composição de Ácidos e Álcoois do Óleo de Jojoba.	15
Tabela 2 - Variabilidade na Composição do Óleo de Jojoba.	16
Tabela 3 - Esterificação Utilizando Butanol (1:5, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm	34
Tabela 4 - Esterificação Utilizando Etanol (1:10, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm	35
Tabela 5 - Esterificação Utilizando Metanol (1:10, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm	35
Tabela 6 - Atividade Enzimática e Proteínas Totais das Enzimas Utilizadas no Experimento	37
Tabela 7 - Esterificação de Álcool Oleílico e Ácido Oléico por Lipases Obtidas de Microrganismos e Vegetais (Comerciais e Não-Comerciais) a 40°C e 130rpm	38
Tabela 8 - Esterificação de Álcool Oleílico e Ácido Butanóico por Lipases Obtidas de Microrganismos e Vegetais (Comerciais e Não-Comerciais) a 40°C e 130rpm	38
Tabela 9 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental dos Meios Reacionais	44
Tabela 10 - Delineamento Experimental (Meios Reacionais)	44
Tabela 11 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental para Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.....	45

Tabela 12 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental para Lipase Comercial Lipozyme TL IM®.....	46
Tabela 13 - Delineamento Experimental para Lipase Obtida de <i>Rhizopus</i> sp.	46
Tabela 14 - Delineamento Experimental para Lipase Comercial Lipozyme TL IM®.....	47
Tabela 15 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp., sem Adição de Solvente.....	53
Tabela 16 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, sem Adição de Solvente.....	53
Tabela 17 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, sem Adição de Solvente	54
Tabela 18 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, sem Adição de Solvente.....	55
Tabela 19 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, sem Adição de Solvente	55
Tabela 20 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, sem Adição de Solvente.....	56
Tabela 21 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, sem Adição de Solvente	56
Tabela 22 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp., em Meio Contendo Tolueno.....	57

Tabela 23 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de Tolueno.....	58
Tabela 24 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de Tolueno	59
Tabela 25 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de Tolueno.....	59
Tabela 26 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de Tolueno	59
Tabela 27 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de Tolueno.....	60
Tabela 28 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de Tolueno	60
Tabela 29 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp., em Meio Contendo Hexano	61
Tabela 30 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de Hexano	62
Tabela 31 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de Hexano	62
Tabela 32 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de Hexano	63
Tabela 33 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de Hexano	63

Tabela 34 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de Hexano	63
Tabela 35 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de Hexano	64
Tabela 36 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de <i>Rhizopus</i> sp., em Meio Contendo n-Heptano	64
Tabela 37 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de n-Heptano	65
Tabela 38 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 2 horas, com Adição de n-Heptano	66
Tabela 39 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de n-Heptano	66
Tabela 40 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 4 horas, com Adição de n-Heptano	66
Tabela 41 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de n-Heptano	67
Tabela 42 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 6 horas, com Adição de n-Heptano	67
Tabela 43 - Análise dos Valores dos Pontos Centrais para Esterificação com e sem Solventes Utilizando Testes de Tukey	68
Tabela 44 - Resultados do Planejamento Fatorial Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. a 40°C	72

Tabela 45 – Análise Estatística para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Obtida de <i>Rhizopus</i> sp. em 120 Minutos de Reação	73
Tabela 46 - ANOVA para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. em 120 Minutos de Reação	73
Tabela 47 - Resultado do Planejamento Experimental Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. e Comparando-se com o Resultado Obtido com a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®, nas mesmas condições de Reação	76
Tabela 48 – Análise Estatística para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® em 120 Minutos de Reação	77
Tabela 49 - ANOVA para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® em 120 Minutos de Reação.....	77
Tabela 50 - Rendimentos Teóricos da Produção de Oleato de Oleíla pela Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	80
Tabela 51 - Cinética Enzimática da Síntese de Oleato de Oleíla Utilizando a Lipase Obtida de <i>Rhizopus</i> sp. e a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C.....	82
Tabela 52 – Estudo da Influência da Quantidade de Água na Taxa de Conversão do Éster Utilizando a Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. após 120 minutos de reação	84

Tabela 53 – Estudo da Influência da Quantidade de Água na Taxa de Conversão do Éster Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® após 120 minutos de reação.....	84
Tabela 54 - Quantidade de Água nos Sistemas antes de ocorrer Esterificação.....	85
Tabela 55 - Valores para os Cálculos da Relação Centesimal entre a Altura da Emulsão e a Altura Total da Amostra.....	99
Tabela 56 - Resultados Obtidos de Atividade Emulsificante	100

Resumo

O aumento da demanda por ésteres obtidos naturalmente ou por processos biotecnológicos, para aplicações como aditivos em alimentos, cosméticos, indústrias farmacêuticas e de lubrificantes, faz necessário o desenvolvimento de catalisadores altamente específicos. Por esta razão, o uso de enzimas como catalisadores para a síntese de ésteres de alto valor agregado vêm sofrendo um rápido desenvolvimento, por proporcionar a possibilidade de obtenção de um produto através de um processo biológico.

Embora destinada pela natureza para realizar a hidrólise de lipídeos, lipases (E.C. 3.1.1.3) podem, sob condições apropriadas de reação, promover a formação de ésteres através de reações de ácidos e álcoois (esterificação). Comparadas com processos químicos já realizados em uma escala industrial, reações enzimáticas ocorrem sob condições brandas (e ecologicamente mais favoráveis) apesar de poderem ser mais lentas. A grande vantagem é a especificidade apresentada pelas enzimas, que permite a formação de derivados lipídicos, os quais não são facilmente preparados por processos laboratoriais convencionais.

Neste trabalho, foi avaliado o desempenho de lipases microbianas e vegetais, não-comerciais, e comparadas a uma lipase comercial, na síntese de ésteres com possíveis propriedades emulsificantes, bem como a influência das condições de reação (concentração de enzima, quantidade de água, relação molar dos substratos, tipos de meios reacionais, e cinética) no processo de esterificação.

A etapa seguinte do estudo foi constituída de um planejamento experimental fatorial completo com o propósito de otimizar a produção do éster oleato de oleíla, em meio livre de solvente orgânico, com a lipase de *Rhizopus* sp. selecionada por apresentar melhor desempenho catalítico. O mesmo estudo foi realizado também com a lipase comercial Lipozyme TL IM®, com finalidade comparativa. Os parâmetros reacionais estudados foram: razão molar entre os substratos (ácido:álcool) e concentração de enzima (% m/m em relação à massa de reagentes). Destes ensaios, verificou-se melhor habilidade catalítica da lipase de *Rhizopus* sp. utilizando maior proporção de álcool (2:1) e maior quantidade de enzima (9,8%). O mesmo foi observado com a enzima comercial Lipozyme TL IM®, a qual também apresentou maior produção de éster quando se fez uso de uma maior proporção de álcool (3:1) e maior quantidade de enzima (7,0%). A porcentagem de esterificação obtida pela lipase de *Rhizopus* sp. (93,1%) foi muito próxima à porcentagem obtida pela lipase comercial Lipozyme TL IM® (94,2%), evidenciando o grande potencial desta enzima não-comercial na síntese do oleato de oleíla.

Por fim, foi realizada a caracterização parcial do éster quanto às atividades emulsificante e antimicrobiana. Resultados indicaram que o éster produzido neste trabalho demonstrou atividade emulsificante, porém esta não foi tão alta quando comparada aos emulsificantes comerciais: Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Tween 80. Observou-se também que o oleato de oleíla não foi capaz de inibir o crescimento microbiano de *Bacillus subtilis*, sendo assim, até o presente momento, não foi detectada atividade antimicrobiana para este éster.

Abstract

The increasing demand for esters obtained either through natural or biotechnological processes for use as food additives, cosmetics, pharmaceuticals and lubricants requires the development of highly specific catalysts for ester production. For this reason, the use of enzymes as catalysts for the synthesis of esters with high added value is undergoing rapid development.

Although the main function of lipases in nature is to catalyze the hydrolysis of lipids, it can also be made to promote ester formation through the reaction of acids and alcohols (esterification) under specific reaction conditions. Although on an industrial scale enzymatic reactions may be longer when under milder and “greener” conditions compared to chemical processes. The great advantage of working with enzymes is their great specificity, which often allows for the preparation of lipid derivatives not easily obtained using conventional laboratory procedures.

This work first evaluated a few variables affecting the synthesis of esters and the esterification process, namely the influence of: the use of commercial and non-commercial lipases of vegetable and fungi origin, reaction conditions, enzyme concentration, amount of water, molar ratio of substrates, types of organic solvents and reaction kinetics.

In a second step, a complete factorial design was considered in order to optimize ester production in solvent-free systems using *Rhizopus* sp. lipase and Lipozyme TL IM® which were chosen because of their good performance. The reaction parameters chosen were molar ratio of substrates (acid:alcohol) and enzyme concentration.

Lipase from *Rhizopus* sp. displayed the best catalytic activity at a molar ratio of 1:2 (acid:alcohol) and an enzyme concentration of 9.8%, whereas Lipozyme TL IM[®] had the best catalytic activity at a molar ratio of 1:3 and enzyme concentration of 7.0%. The rate of the esterification reaction yielded 93.1% using lipase from *Rhizopus* sp., very close to what it is obtained using commercial Lipozyme TL IM[®] that is 94.2%. This result shows a high potential for this non-commercial enzyme to be used as a catalyst for the oleyl oleate synthesis.

The characterization of the ester included evaluation of emulsifier and antimicrobial activities. Oleyl oleate synthesized in this study proved to have lower emulsifier activity compared to commercial emulsifiers like sodium dodecyl sulfate (SDS) and Tween 80. Also, oleyl oleate did not inhibit the growth of *Bacillus subtilis*, thus no antimicrobial activity was observed for this substance.

1. Introdução

Cem milhões de toneladas de óleos comerciais e gorduras são produzidos por ano e empregados principalmente na indústria de alimentos (80%), ração animal (6%), e designio oleoquímico (14%), no qual a grande maioria (90%) é destinada à produção de sabões e outros materiais tensoativos. Outro conducente vem da crescente demanda por alimentos “naturais” e do interesse ambiental em reduzir a necessidade de energia e minimizar o desperdício, bem como pressões econômicas para fabricar bons produtos a preços satisfatórios (Gunstone, 1999).

Na última década, o interesse sobre o impacto latente dos processos industriais tem conduzido ao desenvolvimento de novas alternativas favoráveis ao ambiente. A questão da sustentabilidade está enfocada em três principais desafios: *green engineering*, redução do desperdício e processos mais seguros (Mulholland et al., 2000). O conceito de *green engineering* é dirigido a processos químicos que minimizem o consumo de energia, utilizando matérias-primas renováveis e empregando catalisadores mais específicos que permitam simplificar os processos e aumentar a produtividade. A redução do desperdício inclui a diminuição da quantidade de materiais necessários para o processo de produção e da geração de produtos não degradáveis, tóxicos e biocumulativos. E, finalizando, um processo de fabricação químico é inerentemente mais seguro se forem reduzidos ou eliminados os riscos associados aos materiais e funcionamento utilizados no processo (Stuart et al., 2002).

A biotecnologia é uma rota poderosa para melhorar a sustentabilidade da produção, desde que isto possa fornecer importante aumento na fabricação dos produtos, associado a esses três pontos principais citados acima. Características atrativas de sistemas biológicos incluem versatilidade, seletividade ao substrato, catálise à temperatura ambiente e pressões brandas. Aspectos biocatalíticos demonstram um amplo potencial do uso de processos biotecnológicos para a produção de *commodity* e produtos químicos de alto valor agregado. Entretanto, os principais desafios dos bioprocessos são custo e competitividade quando comparados aos processos químicos, necessitando ainda de muitas melhorias para aplicações bem-sucedidas na indústria química (Aracil et al., 2006).

Há uma notável diferença entre a síntese enzimática e a tradicional síntese química. Recursos renováveis geralmente atraem interesses crescentes como “nova” fonte de matéria-prima que pode ser utilizada pela indústria química (Narodoslawsky, 2003).

Ésteres de alto peso molecular apresentam uma crescente demanda devido às suas aplicações como lubrificantes, uso farmacêutico, produção de plásticos e aditivos, na indústria de cosméticos e alimentos. Tradicionalmente, esses ésteres têm sido obtidos de suas fontes naturais. Entretanto, a quantidade limitada de óleo fornecida por essas fontes, bem como o custo e o baixo rendimento dos processos de produção correspondentes, tendem a manter um custo elevado, restringindo seu uso. Com a finalidade de superar esses problemas, novos processos de síntese para obtenção de análogos em grande quantidade e baixo custo, têm sido desenvolvidos (Aracil et al., 2006). Por essa razão, a aplicação de enzimas como catalisadores para a síntese de ésteres de alto valor agregado vem sofrendo um rápido desenvolvimento (Garcia et al., 1996).

A produção biotecnológica de ésteres empregando lipases como biocatalisadores tem mostrado ser bastante interessante, e reações catalisadas por elas têm recebido grande atenção. O uso de lipases para catalisar reações em meios contendo solvente orgânico ou em meios não aquosos é bastante documentado (Akoh et al., 1992; Hari Krishna et al., 2000).

Há muitos artigos publicados sobre o desempenho catalítico de lipases na síntese de ésteres de cera. No entanto, não há trabalhos publicados com alta produtividade (produto/tempo) na síntese destes ésteres (Radzi et al., 2005^a). Isto ocorre pois existem muitas rotas sintéticas para a produção destes ésteres, porém a maioria delas ainda não está devidamente adequada às especificações de pureza exigidas (Hari Krishna et al., 2000). A especificidade da lipase para formar uma ligação éster permite o controle de reações específicas e também o aumento do rendimento da produção (Radzi et al., 2006). A otimização dos parâmetros de reação são muito importantes na síntese enzimática, porém, muitas pesquisas foram realizadas baseadas em métodos convencionais, nos quais somente um parâmetro é variado em relação ao tempo, resultando em apenas uma condição ótima, aparentemente (Soo et al., 2004). Reconhecendo que tanto o modelo convencional quanto a interação dos efeitos de parâmetros significativos são importantes para a obtenção de rendimentos elevados, a metodologia de superfície de resposta, baseada em modelos estatísticos, é utilizada com frequência para este propósito, onde os parâmetros reacionais são variados simultaneamente para gerar dados para o desenvolvimento de modelos empíricos (Hamsaveni et al., 2001).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de lipases microbianas e vegetais, comerciais e não-comerciais (produzidas e caracterizadas pelo Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA – UNICAMP, ou pelo Departamento de Bioquímica do IQ – UFRJ), na síntese de ésteres de cera com possíveis propriedades emulsificantes, e a influência das condições de reação (concentração de enzima, quantidade de água, relação molar dos substratos, tipos de meios reacionais, e cinética) no processo de esterificação, bem como analisar algumas propriedades do éster obtido, como atividades emulsificante e antimicrobiana.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Lipases

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3) (triacilglicerol lipase), também denominadas de triacilglicerol acilhidrolases (Paques e Macedo, 2006) e não exigem co-fator (Kapucu et al., 2003).

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes, entre elas animal, vegetal e microbiana. As mais utilizadas são as lipases provenientes de microrganismos, pois podem ser produzidas maciçamente por leveduras, fungos e bactérias. As lipases microbianas são mais estáveis, apresentando grande diversidade nas suas propriedades enzimáticas e especificidade com substratos, podendo ser aplicadas para várias finalidades industriais (Hasan, 2006). Além disso, os fungos são particularmente valiosos entre os microrganismos, pois as enzimas produzidas pela maioria deles são extracelulares, uma forma facilmente separável do micélio por filtração ou centrifugação do meio de cultura ou do extrato aquoso de uma cultura semi-sólida. De fato, vários fungos são conhecidos por serem eficientes produtores de lipases, e a constituição e otimização das condições de cultivo destes, tais como composição do meio de cultura, tempo de cultivo e temperatura, melhoram sua produtividade enzimática. Várias espécies de *Rhizopus* são vistas como boas produtoras de diversas lipases (Iwai & Tsujisaka, 1984).

As espécies de microrganismos mais utilizadas em processos de biotransformação pertencem ao subgrupo dos fungos, isto é, as leveduras e os bolores. Estes são fungos superiores, com uma estrutura vegetativa chamada de micélio, sistema de tubos altamente ramificado. Os longos e finos filamentos de células nos micélios são chamados de hifas. Estas crescem entrelaçando-se para formar micelas. Os bolores são organismos sem motilidade e não contêm clorofila. A reprodução, que pode ser sexuada ou assexuada, é realizada por meio de esporos. Os gêneros mais importantes de bolores utilizados industrialmente são *Aspergillus* e *Penicillium* e os principais produtos destes organismos são antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas (Lee, 1996).

Büchner, em 1897, foi quem primeiro extraiu enzimas ativas a partir de células vivas, demonstrando que estes catalisadores atuantes em organismos vivos também podem agir em sistemas *in vitro*, completamente independentes de qualquer processo de vida.

Enzimas são proteínas ou polipeptídeos muito grandes, com peso molecular variando de 10.000 até 500.000, e muitas delas exigem cofatores não protéicos ou grupos prostéticos. Devido ao seu tamanho, as enzimas formam estruturas tridimensionais bem definidas e estabilizadas por interações entre os aminoácidos que as constituem. Estas conformações são decisivas para uma das mais importantes características das enzimas: a habilidade de reconhecer e agir especificamente sobre um ou poucos substratos, mesmo em uma mistura complexa de compostos diferentes (Lee, 1996).

Em 1964, o *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) criou um método de classificação das enzimas. Estas foram distribuídas em seis grupos de

acordo com a reação catalisada. Essa comissão distribuiu um código único com quatro números e um nome sistemático para cada enzima. Todas elas pertencem a um dos seis principais grupos. O primeiro número indica a classe principal (oxirredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase); o segundo a subclasse; o terceiro, a sub-subclasse; e o quarto é um número individual da enzima dentro da classe (Lee, 1996).

De acordo com essa nomenclatura, as hidrolases (ou enzimas hidrolíticas) pertencem ao terceiro grupo de enzimas. O número (E.C. 3.*a.b.c*) caracteriza uma enzima específica. Neste código, *a* se refere ao tipo de reação, *b* especifica a natureza do substrato, e *c* é o número individual da enzima (Kanerva, 1996). Esse grupo de enzimas catalisa a quebra hidrolítica de C-O, C-N e C-C e outras ligações, incluindo P-O em fosfatos. As aplicações são muito diversas, abrangendo hidrólise de polissacarídeos, nitrilas, proteínas, lipídeos e esterificação de ácidos graxos (Krishna, 2002).

As lipases são capazes de catalisar uma grande gama de reações. Seus substratos naturais são triglicerídeos, apresentando maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa, e o seu modo de ação se assemelha ao das esterases, porém sua atividade é muito aumentada quando situada na interface polar/apolar. A teoria mais aceita atualmente para este fenômeno relata que uma parte da superfície da enzima encontra-se em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, e que esta conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para catálise (Pastore et al., 2003).

De acordo com sua especificidade, as lipases podem ser classificadas dentro de três grupos: não-específicas, 1,3-específicas e ácido graxo-específicas. As não-específicas quebram as moléculas de acilglicerol em

posições aleatórias, produzindo ácidos graxos livres e glicerol, com monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Lipases 1,3-específicas catalisam a liberação de ácidos graxos nas posições 1 e 3 da cadeia do glicerol. E as ácido graxo-específicas liberam somente um tipo particular de ácido graxo das moléculas de acilglicerol (Yahya et al., 1998).

Sob condições de reação apropriadas, as lipases podem promover formação de ésteres através de reações entre ácido e álcool (esterificação) e de ésteres com ácidos (acidólise), com álcoois (alcoólise) ou com outros ésteres (interesterificação) e lactonização (esterificação intramolecular) (Kapucu et al., 2003). Esta flexibilidade aliada a diferentes possibilidades de especificidade de substrato existentes entre as lipases confere a elas um potencial enorme de aplicações, tais como hidrólise de gorduras, síntese de compostos orgânicos, aditivos para detergente, modificações de óleos e gorduras, e procedimentos analíticos (Yahya et al., 1998; Gandhi, 1997). Embora lipases de diferentes fontes sejam capazes de catalisar a mesma reação, elas podem diferir em seu desempenho sob as mesmas condições de reação (Yahya et al., 1998).

A habilidade das lipases em realizar reações de síntese de ácidos graxos livres e álcoois, faz com que elas sejam amplamente utilizadas para a produção de ésteres de grande importância no mercado (Abbas & Comeau, 2003). Os processos catalisados por estas enzimas têm atraído a atenção devido às condições brandas de reação sob as quais eles ocorrem e a seletividade exibida por esses catalisadores. Ambos os aspectos diferem das reações químicas convencionais. Por essas reações enzimáticas ocorrerem em condições brandas de temperatura, pH e pressão atmosférica, geralmente exigem menos energia e são conduzidas em equipamentos com custos mais baixos, diferentemente dos processos químicos. Além disso, sob estas condições amenas, os produtos são mais

puros e menos degradados quando comparados a reações que utilizam altas temperaturas. Assim, são mais facilmente purificados e há menos desperdício (Gunstone, 1999).

Para induzir as lipases a atuarem como enzimas de síntese, deve-se diminuir o conteúdo de água (até próximo a 5%). Os solventes orgânicos são muito usados para alcançar esse objetivo. Diversas estratégias de imobilização também podem ser utilizadas para atingir esta meta se o uso de solventes orgânicos é indesejado. Porém não há empecilho de ambas as técnicas serem utilizadas conjuntamente (Johnson-Green, 2002).

Quando as lipases estão presentes na interface líquido-orgânica, elas se comportam como enzimas sintéticas, primeiramente devido à menor concentração de água que é um reagente em reações hidrolíticas (Johnson-Green, 2002). Estas enzimas atuam na interface entre a região hidrofóbica e hidrofílica, uma característica que distingue lipases de esterases (Ellaiah et al., 2001).

Outro aspecto importante das lipases como catalisadores enzimáticos é sua alta especificidade para ligações de ésteres, eliminando a presença de reações secundárias e subprodutos (Garcia et al., 1996). Em virtude da seletividade de muitas lipases, é possível adquirir produtos que são de difícil obtenção através de reações químicas convencionais (Gunstone, 1999).

Lipases imobilizadas são particularmente interessantes para propósitos industriais, já que são facilmente manipuladas. Ao contrário das lipases solúveis, as lipases na forma imobilizada são fortemente ligadas em uma fase sólida, promovendo uma fácil separação do catalisador do produto de reação, permitindo seu reuso (Garcia et al., 1996).

Zarevúcka e colaboradores (2004) realizaram uma triagem e produziram novas lipases a partir de três cepas da levedura de *Geotrichum candidum* (DBM 4012, DBM 4013, DBM 4166) e uma cepa de *Geotrichum ludwigii* (DBM 48), em meio líquido adicionado de óleo de oliva, observando-se a produção de lipases extracelulares. Atividade de lipase em enzimas intracelulares não foi demonstrada. A produção máxima de lipase foi verificada na fase estacionária, quando o crescimento das células microbianas atingiu um nível constante.

Rao e colaboradores (1993) otimizaram a produção de lipase produzida por *Candida rugosa* empregando o método de superfície de resposta. A concentração ótima de nutrientes encontrada foi: 0,5% de uréia, 1,5% de maltose e 7,5% de óleo para a produção de lipase.

3.2. Ésteres

Ésteres de alto peso molecular, provenientes de longas cadeias de álcoois e ácidos, apresentando doze ou mais carbonos de comprimento, são conhecidos como ésteres de cera (Keng et al., 2008 ^a, Gunawan et al., 2005). São constituídos de componentes saturados e insaturados que determinam a fluidez da substância química (Keng et al., 2008 ^a). Apresentam um número alto de aplicações em uma grande variedade de campos, incluindo as áreas: médica, alimentícia e indústria de borracha (Keng et al., 2008 ^b). As propriedades recentemente descobertas desses ésteres têm aumentado seu emprego em várias indústrias (Keng et al., 2008 ^a), apresentando grandes aplicações por apresentarem característica umidificante e uma percepção não gordurosa quando aplicados à pele

(Gunawan et al., 2005). Na área cosmética, ésteres de cera são formulados em um grande número de produtos para *personal care*, devido a sua excelente característica emoliente (Keng et al., 2008 ^a), além de sua propriedade calmante, boa solubilidade em gordura e capacidade hidratante (Keng et al., 2008 ^b). São também utilizados em indústrias farmacêuticas como agente antiespumante na produção de Penicilina, além de serem usados como lubrificantes, plastificantes e graxas, em indústrias químicas (Gunawan et al., 2005). Esses ésteres são substâncias químicas de alto valor agregado, os quais são produzidos em pequenas quantidades devido ao seu processo de obtenção natural ser limitado e sua síntese química ainda ser muito cara (Radzi et al., 2006). Por isso são avaliados a preço elevado e com uma alta margem de lucro (Keng et al., 2008 ^a).

3.2.1. Ésteres de Cera de Fontes Naturais

Óleo de jojoba e óleo de baleia cachalote são fontes de ésteres de cera naturais que representam um grupo de substâncias químicas de alto valor agregado. O óleo da jojoba (*Simmondsia chinensis*) tem sido a principal fonte natural de ésteres de cera para aplicações comerciais desde a proibição mundial de caça às baleias (Poisson et al., 1999; Salis et al., 2003; Radzi et al., 2005 ^b; Keng et al., 2008 ^a). Esse óleo, composto de uma mistura de ésteres de cera, é um óleo de semente (Figura 1), com características raras, usado como emoliente em produtos para a proteção da pele e xampus na indústria cosmética; como aditivos para indústria alimentícia; e como lubrificantes para maquinários de alta precisão (Kapucu et al., 2003). As espécies moleculares predominantes no óleo de

jojoba são cis-13-docosenil cis-11-eicosanoato (erucil jojobeonato), variando de 31% a 45% do extrato do óleo de semente (Miwa, 1984).



Figura 1 - Semente de Jojoba

O óleo de jojoba é único por ser um éster de cera ao invés de um típico triglicerídeo. Os ésteres de cera do óleo de jojoba são similares aos do óleo de baleia cachalote e podem ser utilizados como um emoliente natural para pele. Este óleo é amplamente comercializado na indústria cosmética e de lubrificantes dos Estados Unidos, onde 70% da produção é exportada (Harry-O'kuru et al., 2005).

A jojoba é um arbusto nativo do deserto do Arizona (Figuras 2 e 3), Califórnia, e do norte do México (Kapucu et al., 2003), e são cultivados com o propósito de extração de óleo de sua semente. Esta geralmente contém em torno de 50% a 60% em massa de óleo, contendo uma mistura de ésteres de cera líquidos (Harry-O'kuru et al., 2005). Os componentes majoritários do extrato da semente de jojoba têm sido relatados desde

1936 (Miwa, 1971; Spencer et al., 1977). Alguns componentes minoritários, como fitoesteróis e álcoois graxos, foram relatados posteriormente, nos anos 90 (Busson-Breysse et al., 1994; Van Boven et al., 1997). Traços de triglicerídeos têm sido mencionados, embora estas estruturas não tenham sido descritas detalhadamente (Busson-Breysse et al., 1994).

Van Boven e colaboradores (2000) conseguiram isolar triglicerídeos e outros compostos lipo-solúveis do óleo de jojoba por cromatografia, no entanto os triglicerídeos representam apenas 0,4% (m/m) do total de compostos. Esta fração isolada apresentou um fator de retenção, R_f , de 0,58 por cromatografia em camada delgada (sílica gel: eluente hexano/éter dietílico/ ácido fórmico, 80:20:1, por volume), valor idêntico ao padrão de triglicerídeos do milho.

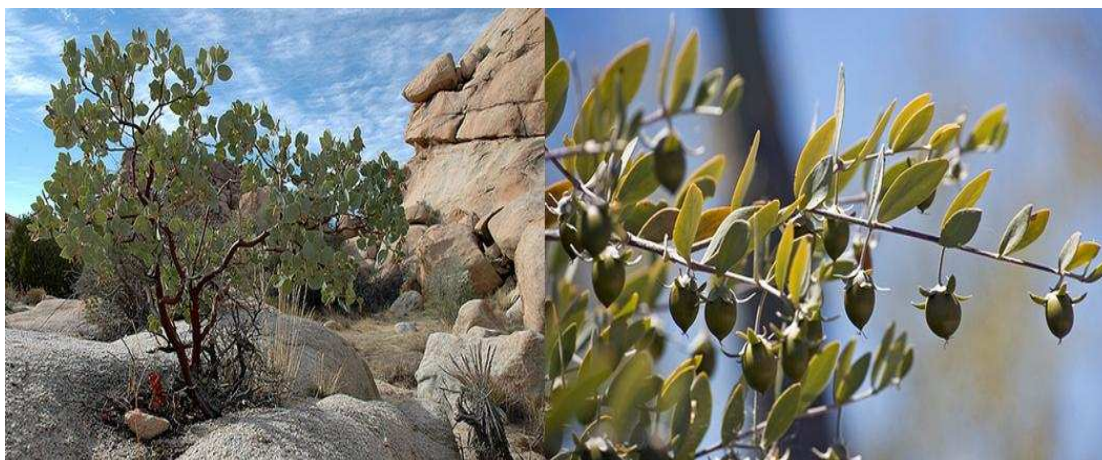


Figura 2 - Árvore de Jojoba



Figura 3 - Fruto da Árvore de Jojoba

A composição dos álcoois e ácidos do óleo de jojoba está listada na tabela 1. Os valores obtidos nas análises feitas por Miwa (1971), utilizando cromatografia gás-líquido (CGL) resultaram da média de cinco amostras de óleo de jojoba do deserto do Arizona. A razão molar do ácido para o álcool foram 50:50, quando calculados tanto para o produto de etanólise quanto para frações isoladas de ácido e álcool. Uma quantidade significativa de ácido oléico ($C_{18:1}$) foi encontrada no óleo de jojoba e o ácido eicosanóico ($C_{20:0}$) representou 70% dos ácidos totais. Mais de 90% dos álcoois foram representados por eicosenol ($C_{20:1}$) e docosenol ($C_{22:1}$) em quantidades iguais. Tetracosenol ($C_{24:1}$) mostrou-se presente em quantidade apreciável, embora não tenha sido identificado em estudos anteriores com o óleo de jojoba. A tabela 2 mostra a variabilidade da composição do óleo de jojoba em diferentes regiões (deserto do Arizona e deserto da Califórnia). São apresentadas as composições dos ésteres de cera, dos álcoois e ácidos. Os valores apresentados também foram resultantes da média de cinco amostras de óleo de jojoba.

Tabela 1 - Composição de Ácidos e Álcoois do Óleo de Jojoba.

Número de átomos de carbono e duplas ligações	Por etanolise e CGL, peso %		Por fracionamento e CGL, peso %	
	Ácidos	Álcoois	Ácidos	Álcoois
14:0	0,1	0,0	0,1	0,0
16:0	0,9	0,3	0,8	0,1
16:1	0,3	0,0	0,2	0,0
18:1	6,0	0,7	6,0	0,6
18:2	0,1	0,0	0,1	0,0
20:0	0,1	1,0	0,0	0,4
20:1	35,0	22,0	35,0	23,0
20:2	0,1	0,0	0,1	0,0
22:0	0,2	1,0	0,0	0,5
22:1	7,0	21	7,0	21,0
22:2	0,1	0,0	0,1	0,0
24:0	0,0	0,0	0,0	0,1
24:1	0,5	4,0	1,0	4,0
Total	50,4	50,0	50,4	49,7

Fonte: Miwa, 1971.

Tabela 2 - Variabilidade na Composição do Óleo de Jojoba.

Análises	Local de Crescimento		
	Deserto do Arizona	Deserto da Califórnia	Desconhecido
Tamanho da semente, g/1000	466	835	480
Conteúdo de óleo, %	48,4	52,5	46,6
Ésteres de cera, área %			
C34	0,2	0,2	0,1
C36 (Oleato de Oleíla)	2,0	2,0	3,0
C38	7,0	6,0	10
C40	30	28	34
C42	50	51	44
C44	10	11	8,0
C46	1,0	2,0	1,0
C48	0,2	0,3	0,1
Ácidos, metil éster, área %			
14:0	0,2	0,1	0,1
16:0	1,0	1,0	2,0
16:1	0,4	0,3	0,3
18:0	0,1	0,1	0,1
18:1 (Ácido Oléico)	11	10	14
18:2	0,1	0,1	0,1
18:3	0,1	0,3	0,2
20:0	0,1	0,1	0,1
20:1 (Ácido Gadolínico)	70	70	69
20:2	0,2	0,1	0,1
22:0	0,2	0,5	0,5
22:1 (Ácido Erúico)	13	15	12
22:2	0,2	0,1	0,1
24:0	0,1	0,1	0,1
24:1	2,0	2,0	1,0
Álcoois, área %			
16:0	0,2	0,1	0,2
18:1 (Álcool Oleílico)	1,0	1,0	2,0
20:0	0,8	0,5	0,6
20:1 (Álcool Eicosenol)	46	42	50
22:0	2,0	2,0	2,0
22:1 (Álcool Docosenol)	42	47	40
24:0	0,2	0,1	0,3
24:1	7,0	8,0	6,0

Fonte: Miwa, 1971.

Dentre os muitos usos do óleo de jojoba propostos ao longo de décadas, sua utilização em cosméticos é uma das mais promissoras como *commodity* comercial. Dentre os cosméticos comerciais contendo jojoba pode-se citar: óleo de banho, óleo corporal, creme de limpeza, esfoliante, creme de nutrição facial, óleo facial, condicionador de cabelo, xampu, batom, demaquilante, creme hidratante, creme de barbear, líquido de limpeza para a pele, sabonete, protetor solar, entre outros (Miwa, 1984).

Potencialmente, o único uso industrial mais amplo e destacado do óleo de jojoba é como lubrificante, formulado com agente sulfurizante sob alta pressão e alta temperatura. Produtos sulfurizados de óleo de jojoba refinados mostram-se iguais ou melhores que óleo de baleia cachalote sulfurizado, e se disponível em estoque suficiente, o óleo de jojoba poderia ser utilizado amplamente na indústria automotiva (Miwa, 1984).

O óleo de jojoba pode se tornar uma fonte majoritária de álcoois graxos lineares primários, que ainda é uma *commodity* rara para o uso industrial. O álcool graxo longo insaturado (jojobenil, erucil), obtido através de hidrólise, pode ser associado com cadeias de polietilenoglicol para formar emulsificantes especiais, com balanço hidrofílico-lipofílico (Miwa, 1984).

Bhatia e colaboradores (1990) estudaram melhorias nas propriedades físico-químicas do óleo de jojoba, fatores limitantes para seu uso como substrato. Resultados indicaram que estas propriedades podem ser modificadas por métodos físicos, químicos e também por tratamentos aditivos. Foi possível aumentar a viscosidade do óleo de jojoba por sulfurização parcial, resultando em uma ampliação do uso em formulações lubrificantes. O hexano foi eleito o melhor solvente para extração do óleo devido ao seu alto rendimento, com tendência a não formação de depósitos

residuais, e também por este solvente ser comumente utilizado em extrações comerciais de óleos vegetais. Este estudo sugeriu que as limitações do óleo de jojoba podem ser superadas e modificadas, podendo ser usado como uma mistura de componentes em formulações de óleos lubrificantes. Em aplicações onde o ponto de fusão não é um ponto crítico, o óleo de jojoba tem um potencial para substituir o óleo mineral.

Entretanto, o principal obstáculo para a produção de óleo de jojoba em larga escala é o custo e a disponibilidade do vegetal (Keng et al., 2008 ^a; Kalscheuer et al., 2006). A fonte natural dos ésteres de cera, como o óleo de jojoba, é exposta a condições climáticas que podem afetar severamente a estabilidade do fornecimento, o preço e, em menor extensão, a consistência do produto (Keng et al., 2008 ^b). Além disso, o plantio comercial da Jojoba exige cinco anos para o início da produção de sementes (Keng et al., 2008 ^a).

A grande demanda por ésteres de cera naturais faz necessário o desenvolvimento de rotas de sínteses para a produção de análogos de pronta disponibilidade e matéria-prima relativamente barata (Kapucu et al., 2003). A partir daí, interesse em preparações utilizando lipases como catalisadores desses ésteres de longa cadeia têm crescido devido à possibilidade de obter uma grande variedade de produtos de alta qualidade sob condições brandas de reação, utilizando substratos seletivos de tais biocatalisadores. Além disso, a crescente demanda para a fabricação de produtos usando processos inofensivos ao meio ambiente tem aumentado o uso de enzimas como biocatalisadores, particularmente na modificação de lipídeos (Steinke et al., 2000; Keng et al., 2008 ^a).

Contudo, a maioria dos relatos encontrados é baseada em escala laboratorial. Há poucas publicações utilizando síntese em larga escala de

ésteres de cera, principalmente de ésteres com comprimento de cadeia com trinta carbonos ou mais (Keng et al., 2008^b).

3.2.2. Ésteres de Cera de Fontes Sintéticas

Ésteres de cera são produtos de alto valor agregado. O interesse em desenvolver tais substâncias aumenta se estes produtos sintéticos puderem ser otimizados a uma escala lucrativa de produção (Sánchez et al., 1992).

Ésteres de alto peso molecular provenientes de álcoois e ácidos de longas cadeias são geralmente citados como ceras de óleo de Jojoba e óleo de baleia cachalote, compostos que estão incluídos no grupo de química fina (Sánchez et al., 1992).

O oleato de oleíla, produto da esterificação do ácido oléico com o álcool oleílico, é um análogo sintético do óleo de jojoba (Martinez et al., 1988). Presume-se que as características desse éster sejam similares as de seu análogo, enquanto o preço do produto seria significativamente reduzido (Kapucu et al., 2003).

Esse tipo de esterificação ocorre comumente na presença de ácidos minerais (H_2SO_4) ou ácidos de Lewis (SnCl_2 , FeCl_3) como catalisadores e por processos com vários estágios a altas temperaturas (Kapucu et al., 2003).

Os métodos de produção de ésteres são baseados na reação entre um álcool e um ácido para formar éster e água. Os processos

convencionais de produção são freqüentemente realizados na presença de um ácido mineral. O ácido sulfúrico é muito utilizado para isso, porém promove uma série de problemas, sendo um deles a formação de produtos indesejáveis. Estes compostos resultam em produtos coloridos e aromatizados que requerem processos adicionais de refino (Aracil et al., 2006).

Sanchez e colaboradores (1992) esterificaram ácido oléico e álcool oleílico em reator em batelada utilizando planejamento fatorial para otimizar o processo e pesquisar a relação entre o rendimento do éster e as variáveis de operação. As variáveis estudadas foram temperatura de reação, concentração do catalisador zeólita de sódio e pressão. Análises estatísticas mostraram que a temperatura influenciou positivamente no rendimento do éster, a concentração inicial do catalisador teve uma leve influência positiva na produção, e a pressão reduzida também teve uma influência positiva no processo. Isto era esperado, pois pressões reduzidas (16mmHg) eliminam facilmente a água produzida na esterificação. O maior rendimento obtido (47%) foi utilizando 180°C, 0,6% em massa de catalisador e pressão de 16mmHg, em 2 horas.

Martinez e colaboradores (1988) sintetizaram ésteres utilizando ácido oléico e álcool oleílico, porém, empregando cloridrato de cobalto como catalisador. Para este estudo utilizaram pressão de 0,1mmHg, temperatura de 150°C, razão molar álcool-ácido de 1,5 e 0,10g de catalisador, obtendo-se 78,10% de esterificação em 2 horas.

Nas últimas décadas, novos sistemas catalíticos vêm sendo estudados com a finalidade de evitar problemas associados com os processos catalíticos convencionais. Em vários trabalhos, o uso de enzimas para síntese de ésteres tem sido investigado e desenvolvido, e

freqüentemente representam uma possível alternativa industrial para processos de produção de ésteres (Aracil et al., 2006).

A água tem um profundo efeito no comportamento das lipases, ou afetando diretamente a hidratação, ou indiretamente mudando a natureza do meio de reação. Além disso, a formação de água apresenta-se como um problema nas reações de esterificação, já que, em quantidades elevadas, favorece a reação reversa (hidrólise de ésteres) (Yahya et al., 1998).

Diversos autores mostram as vantagens da catálise enzimática em meios não convencionais (solventes orgânicos, livres de solvente, ou fluido supercrítico) (Gunstone, 1999; Zaks & Klivanov, 1985; Ballesteros et al., 1995; Kapucu et al., 2003). Muitos desses processos catalíticos utilizando enzimas foram executados em solvente orgânico hidrofóbico ou em meio não-aquoso sem nenhum solvente. As reações catalisadas por enzimas em meio livre de solvente apresentam a vantagem de se trabalhar com altas concentrações de substrato, facilitando o processo de separação, minimizando o impacto ambiental, e diminuindo custos devido à eliminação de solventes das etapas de produção (Kapucu et al., 2003).

A síntese do éster oleato de oleíla através da catálise feita por lipases tem sido realizada, geralmente, em sistema livre de solvente. Contudo, sua produção também é possível em meio aquoso bifásico na presença de solvente orgânico (Kapucu et al., 2003). Entretanto, um modelo ideal para a análise de reações enzimáticas em solvente orgânico deve satisfazer os seguintes critérios: a enzima deve ser de fácil obtenção e ter um baixo custo; deve ser independente de cofator, já que comumente estes são insolúveis em solventes orgânicos; o substrato deve ser solúvel em meio orgânico; e a água não deve agir como um reagente no processo

enzimático. Em geral, as lipases apresentam todas essas exigências satisfeitas (Zaks & Klibanov, 1985).

A razão mais comum para o uso de meios orgânicos para reações enzimáticas é a presença de substrato pouco solúvel em água. Assim a adição de uma quantidade moderada de solvente orgânico é uma maneira direta de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos e, com isso, tornar a reação possível. Tanto os solventes miscíveis em água quanto os não miscíveis podem ser usados. No segundo caso, obtém-se um sistema bifásico com a enzima e outras substâncias hidrofílicas ficando na fase aquosa, enquanto os substratos e produtos hidrofóbicos, na fase orgânica. Para que ocorra a bioconversão, os substratos devem ser transferidos para a enzima na fase aquosa. Depois da reação, os produtos hidrofóbicos são transferidos de volta para a fase orgânica (Adlercreutz, 1996).

O uso de enzimas em meios com baixo teor de água representou um progresso significativo nas últimas décadas. Esta evolução começou com a investigação de sistemas predominantemente aquosos que possuíam pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água, continuou com o desenvolvimento de misturas reacionais bifásicas (aquosa-orgânica), dispersão de uma fase aquosa em uma grande quantidade de solvente, e finalmente levou à introdução e uso de suspensões de enzimas em solventes orgânicos praticamente anidros. Esta última etapa foi especialmente importante porque demonstrou conclusivamente que um baixo teor de água é realmente necessário para as enzimas manterem suas conformações cataliticamente ativas. Desta forma, seria tecnologicamente atrativa a tentativa de dispensar os solventes, com a condução da reação enzimática em uma mistura dos próprios substratos. Este método, se praticável, combinaria a precisão das

catálises biológicas com os altos níveis de produtividade alcançados pelos melhores métodos convencionais (Vulfson et al., 1996).

O oleato de oleíla foi sintetizado por Okumura e colaboradores (1979), obtendo rendimento de 94% usando a lipase *Rhizopus delemar*. A síntese desse éster foi feita também por Miller e colaboradores (1988), sob vácuo utilizando lipase imobilizada (Lipozyme TL IM®), a água formada foi continuamente removida e a esterificação conduzida até completar duas horas.

O rendimento máximo obtido na síntese do oleato de oleíla foi de 56% em 2 horas, e 64% em 48 horas por *Alcaligenes* sp. e *Chromobacterium viscosum*, respectivamente (Habulin et al., 1996).

Na literatura, a produção de oleato de oleíla foi realizada utilizando 5% (m/m de substrato) de Lipozyme (Novozymes), lipase de *Mucor meihei* imobilizada, e uma mistura equimolar de ácido oléico e álcool oleílico (47mmol) a uma temperatura de 60°C (Habulin et al., 1996). Uma concentração de 650g/L (1,4mmol/g de mistura de reação) foi obtida em sete horas. Relatou-se que a concentração de oleato de oleíla foi de 15mmol/g de enzima (695g/L) com 10% (m/m de substrato) de Lipozyme, utilizando uma quantidade equimolar de substratos (1mmol) à mesma temperatura (Mukherjee e Kiewitt, 1988). A otimização da produção de oleato de oleíla foi realizada sob vácuo utilizando Lipozyme (Novozymes), resultando em 73% de conversão (Garcia et al., 1993).

Kapucu e colaboradores (2003) realizaram a produção enzimática de oleato de oleíla utilizando lipase de *Candida antarctica* imobilizada, Novozyme 435 (Novo Nordisk A/S), em um sistema livre de solvente. Um Planejamento Composto Central Rotacional foi empregado utilizando quatro parâmetros: relação molar entre ácido e álcool (0,5-1,5), quantidade

de enzima (2–10%, m/m em relação ao substrato), temperatura de reação (40 – 60°C) e tempo de reação (30 – 90 minutos). Superfície de Resposta foi utilizada para analisar o efeito de variáveis importantes na produção, obtendo-se um rendimento experimental de 734g/L de éster (1,58mmol/g de mistura reacional) com 88% de conversão em 75 minutos. A ANOVA indicou que o modelo estava adequado para representar a relação entre a resposta (concentração de oleato de oleíla) e as variáveis significativas (relação molar entre álcool/ácido, quantidade de enzima, temperatura e tempo de reação).

Rao & Shanmugam (2000) sintetizaram oleato de dodecila e oleato de oleíla utilizando lipase de *Candida rugosa* em meio livre de solvente orgânico. A formação dos ésteres foram caracterizadas de acordo com concentração enzimática (0,4mg/mL), pH (7,2), temperatura (25°C) e concentração dos substratos (0,4mg/mL de dodecanol e 1mg/mL de álcool oleílico, com relação molar de 1:1 em relação ao ácido oléico utilizado). A porcentagem de esterificação alcançada foi de 80% para o oleato de dodecila e 90% para o oleato de oleíla em 4 horas de reação.

Capítulo I – Seleção de Substratos e Lipases

Neste capítulo é apresentada uma seleção de álcoois e ácidos a serem empregados em reação de esterificação, bem como a utilização de várias enzimas a serem testadas para a escolha daquela que apresentar melhor desempenho na síntese de éster.

1. Materiais e Métodos

1.1. Seleção de Substratos

Uma intensa pesquisa na literatura foi realizada a fim de se estabelecer uma listagem de ésteres comercializados como emulsificantes para alimentos, cosméticos e combustíveis e comprovar o interesse comercial pela síntese enzimática de determinados ésteres em especial.

Ésteres de ácidos de cadeias curtas são importantes na indústria alimentícia como constituintes de temperos e aromas (Gillies et al., 1987; Welsh & Williams, 1989). Ésteres metílicos e etílicos de ácidos com cadeias longas fornecem espécies oleoquímicas valiosas que servem como combustíveis de veículos a diesel (Mittelbach, 1990). Por outro lado, ésteres de cadeias longas (derivados de álcoois e ácidos com cadeias carbônicas com 12 carbonos ou mais), são geralmente mencionados como

ceras, tendo um potencial de aplicação de lubrificantes a cosméticos (Trani et al., 1991).

Para o desenvolvimento deste trabalho, uma seleção de álcoois e ácidos a serem utilizados também foi realizada. Metanol, etanol, butanol e álcool oleílico foram testados, assim como os ácidos: oléico, butanóico, láurico e esteárico, com a finalidade de escolher a combinação mais promissora para a produção de ésteres.

1.2. Seleção de Lipases

Este estudo visou testar a habilidade das lipases fúngicas produzidas no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA – UNICAMP em esterificar variados álcoois e ácidos, comparando os resultados com os disponíveis na literatura e no laboratório, com a lipase comercial Lipozyme TL IM[®], da Novozymes, reconhecidamente empregada como catalisadora das reações da síntese em estudo. As preparações de lipases que foram empregadas nos experimentos possuem suas fontes nos respectivos microrganismos: *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp. (linhagem 1068) e *Rhizopus* sp., isolados no Laboratório de Bioquímica da FEA – UNICAMP.

Junto às lipases citadas acima, foram testadas as lipases vegetais de Mamona e Pinhão Manso, assim como a lipase microbiana de *Aspergillus parasiticus*, produzidas, caracterizadas e cedidas pelo Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da UFRJ.

1.2.1. Produção de Lipases Microbianas

1.2.1.1. Produção da Lipase de *Rhizopus* sp.

A produção de lipase pelo fungo *Rhizopus* sp. foi realizada como descrito por Costa & Pastore (1997). Para esta produção foi utilizado meio de cultura composto por farelo de trigo e água na proporção de 40% de água e 60% de farelo de trigo (m/m). Os frascos Erlenmeyer de 500mL, contendo 20g do meio de cultura, foram esterilizados por 15 minutos à temperatura de 121°C, a 1atm e posteriormente inoculados com 1mL de suspensão de esporos, preparada com água destilada esterilizada e com esporos de cultura de 96 horas de crescimento em meio inclinado ágar de batata dextrosado (BDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 120 horas. Após a incubação foram adicionados 100mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e após permanecerem em repouso por 1 hora com agitação ocasional, foram filtrados com papel de filtro Whatman nº1 e coletados em recipiente único.

1.2.1.2. Produção da Lipase de *Geotrichum* sp.

A produção de lipase pelo fungo *Geotrichum* sp. foi realizada como descrito por Burkert e colaboradores (2004). Para esta produção foi utilizado meio de cultura composto por 13% de água de maceração de

milho (milhocina); 2,3% de nitrato de amônio e 0,6% de óleo de soja. Os frascos Erlenmeyer de 50mL contendo 15mL do meio de cultura foram esterilizados por 15 minutos à temperatura de 121°C, e posteriormente inoculados com 1mL de suspensão de esporos, preparada com água destilada esterilizada e com esporos de cultura de 48 horas de crescimento em meio Yeast Malt (YM). Os frascos foram incubados a 30°C com agitação de 130rpm, em *shaker*. Após 24 horas, os meios foram centrifugados a 10.000rpm por 15 minutos sob refrigeração.

1.2.1.3. Produção da Lipase de *Aspergillus* sp. n° 1068.

A produção de lipase pelo fungo *Aspergillus* sp. n°1068 foi realizada como descrito por Costa & Pastore (1996). O meio de cultura para a produção da lipase foi constituído de farelo de trigo e água na proporção 1:1 (m/m). Frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 20g de farelo de trigo/água, esterilizados por 15 minutos a 121°C, com 1atm de pressão, foram inoculados com 1mL de suspensão de esporos, preparada com esporos da cultura com 96 horas de crescimento em meio ágar de batata dextrosada (BDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 72 horas. Após a incubação foram adicionados 100mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro e deixados em repouso por 1 hora para extração. Após esse período, o meio foi filtrado em papel Whatman n°1.

1.2.2. Concentração e Obtenção da Enzima Bruta

As enzimas foram precipitadas pelo sulfato de amônio adicionado ao sobrenadante ou ao filtrado obtidos após a produção de cada enzima, em quantidade suficiente para atingir 80% de saturação, permanecendo por 24 horas a 5°C, e recuperada após centrifugação a 10.000rpm por 15 minutos, sob refrigeração. O precipitado foi dialisado, em membrana de celulose (Sigma-Aldrich), contra água destilada por 48 horas a 5°C. Após a diálise, o material foi congelado e liofilizado, sendo denominado de preparação enzimática bruta, onde foram medidas a atividade lipolítica e a concentração de proteínas.

1.2.3. Determinação da Atividade Lipolítica

A atividade das lipases foi determinada em um sistema composto por: 5mL de emulsão de óleo de oliva extra virgem e goma arábica 7% na proporção de 25% de óleo para 75% de goma; 2mL de tampão fosfato pH 7,0, 0,1M e 1mL de solução enzimática na concentração de 10mg/mL de enzima. O sistema foi incubado a 37°C por 30 minutos em banho termostatizado com agitação de 130 rotações por minuto. A reação foi paralisada com a adição de 15mL de solução acetona:etanol (1:1, em volume) e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de NaOH 0,05M usando fenolftaleína como indicador (Macedo et al., 1997).

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo em um minuto, por grama de enzima, nas condições descritas.

1.2.4. Determinação da Concentração de Proteínas

A concentração protéica dos extratos liofilizados foi determinada de acordo com Bradford (1976). Este teste foi feito utilizando-se uma mistura de 200 μ L do reagente de Bradford (Azul de coomassie, etanol, ácido fosfórico e água) com 800 μ L de amostra. Deixou-se reagir por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro (Beckman Coulter™ DU® 640 Spectrophotometer), a 595nm. A conversão da absorbância em μ g de proteína foi feita utilizando-se uma curva padrão de albumina (Anexo 2).

1.3. Síntese de Ésteres por Lipases

As reações de esterificação (Figura 4 e Equação 1) foram realizadas em frascos de vidro cilíndricos de 8,5cm de comprimento e 3,5cm de diâmetro, e capacidade para 60mL, com tampa de rosca, contendo 10 pérolas de vidro com diâmetro aproximado de 4mm, e selados com parafilme. Os ácidos (oléico, butanóico, láurico e esteárico) e alcoóis (metanol, etanol, butanol e oleílico) foram adicionados em diferentes proporções, juntamente com a adição de 1% em massa de enzima em

relação à massa total dos reagentes. Os frascos foram incubados com os substratos por 5 minutos em banho termostatzado a 40°C, com agitação de 130 oscilações por minuto antes da adição da lipase ao sistema. Em seguida, esta foi inserida, mantendo a mesma temperatura e agitação por 72 horas, retirando alíquotas durante este período.

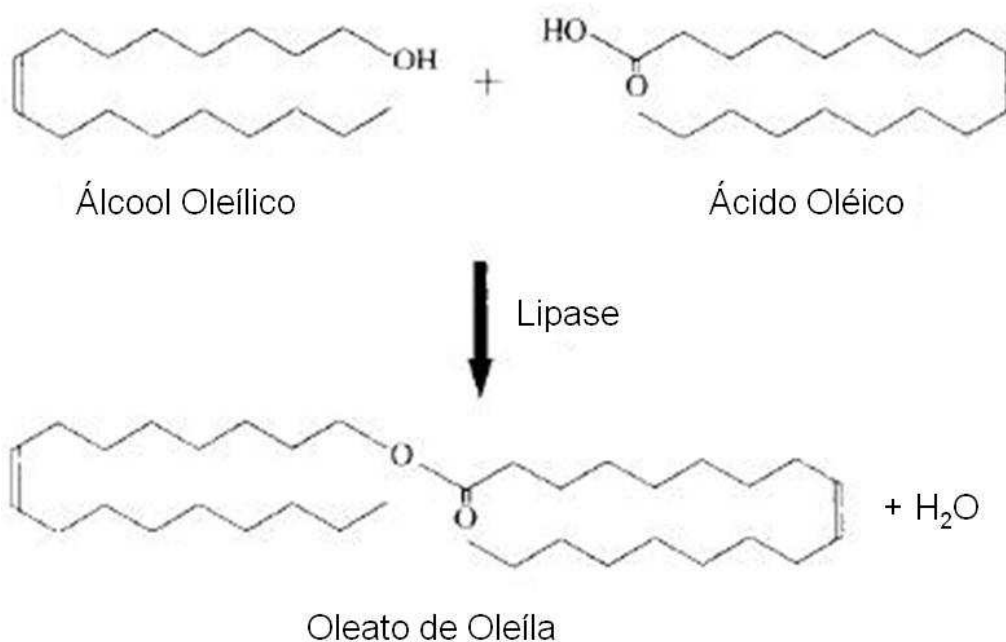
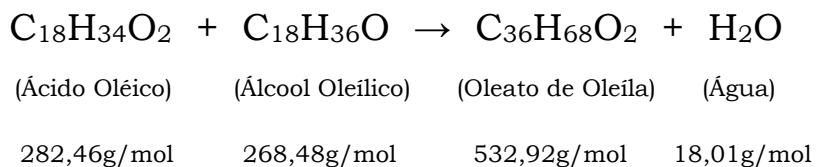


Figura 4 - Síntese Enzimática do Oleato de Oleíla

Reação de esterificação:



(1)

A análise das porcentagens de esterificação nestes ensaios de seleção das enzimas e substratos foi realizada por titulação do ácido residual do sistema após a reação. Este método foi escolhido por ser representativo e rápido, atendendo às necessidades desta fase do estudo.

As alíquotas foram dissolvidas em 10mL de acetona:etanol (1:1 v/v); onde foram adicionadas gotas de fenolftaleína 0,5% e tituladas contra NaOH 0,5M.

A porcentagem de esterificação foi calculada considerando 100% de ácido graxo livre no tempo zero de reação e subtraindo a porcentagem residual de ácido livre calculada pela equação 2:

$$\% \text{ de Esterificação} = \frac{V_{\text{NaOH gasto (sem enzima)}} - V_{\text{NaOH gasto (com enzima)}}}{V_{\text{NaOH gasto (sem enzima)}}} \times 100$$

(2)

2. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos na seleção de lipases avaliando sua capacidade de catalisar a síntese de variados ésteres foram cruciais na escolha daquelas a serem empregadas no estudo que se seguiu.

2.1. Seleção de Alcoóis, Ácidos e Lipases a Serem Empregados

Além da utilização do álcool oleílico, pré selecionado, a ser empregado nas reações de esterificação realizadas neste estudo, outras análises foram feitas com a finalidade de selecionar outros álcoois e ácidos a serem possivelmente aplicados para produção de novos ésteres, usando a enzima comercial Lipozyme TL IM[®] como catalisador. Para isso foram utilizados os ácidos: oléico, butanóico, láurico e esteárico; e os álcoois: metanol, etanol e butanol.

Todos os álcoois relatados acima foram testados com todos os ácidos, de modo a encontrar a melhor relação para a maior produção de éster. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Quantidades de álcool e ácido foram adicionadas de acordo com a razão molar escolhida para cada grupo de reação, levando-se em conta suas massas moleculares.

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam a média dos resultados obtidos neste experimento. Os valores adquiridos com ácido esteárico não são reprodutíveis, pois no momento da titulação houve a formação de um gel denso devido à ocorrência de saponificação, dificultando a observação do ponto de viragem e impedindo uma titulação precisa.

Tabela 3 - Esterificação Utilizando Butanol (1:5, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm

Tempo de Agitação (h)	% de Esterificação			
	Ácido Oléico	Ácido Butanóico	Ácido Láurico	Ácido Esteárico
2	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	2,60 ± 0,10
48	0,70 ± 0,04	0,00	0,00	2,40 ± 0,20
72	1,10 ± 0,02	0,00	0,50 ± 0,40	1,70 ± 0,15

Tabela 4 - Esterificação Utilizando Etanol (1:10, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm

Tempo de Agitação (h)	% de Esterificação			
	Ácido Oléico	Ácido Butanóico	Ácido Láurico	Ácido Esteárico
2	0,00	0,10 ± 0,04	0,00	2,20 ± 0,91
4	0,00	0,00	0,00	11,70 ± 0,91
6	4,10 ± 0,18	0,10 ± 0,07	0,00	11,70 ± 0,85
8	0,70 ± 0,08	0,00	0,00	10,60 ± 0,64
25	11,00 ± 0,15	0,00	1,20 ± 0,35	0,00
48	15,80 ± 0,11	0,00	5,30 ± 0,21	15,60 ± 0,95
72	17,00 ± 0,21	0,00	5,90 ± 0,42	12,70 ± 1,20

Tabela 5 - Esterificação Utilizando Metanol (1:10, ácido:álcool) com 1% da Enzima Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C e 130rpm

Tempo de Agitação (h)	% de Esterificação			
	Ácido Oléico	Ácido Butanóico	Ácido Láurico	Ácido Esteárico
2	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	0,00
48	1,00 ± 0,14	0,00	0,00	1,50 ± 0,64
72	0,00	0,00	0,00	8,10 ± 0,98

Após a execução deste estudo, verificou-se que a taxa de conversão dos ésteres foi abaixo de 20% em todos os casos, mesmo com a utilização de uma enzima comercial como catalisador das reações, o que inviabilizou a produção de ésteres utilizando os reagentes acima. Desta forma,

descartou-se possibilidade de esterificação empregando os álcoois: butanol, etanol e metanol.

Como foi observada a imiscibilidade dos ácidos em álcool oleílico, outro experimento foi realizado com a finalidade de se escolher o ácido a ser utilizado juntamente com este álcool para a produção dos ésteres. Foram testados os ácidos: oléico e butanóico. Os ácidos láurico e esteárico foram descartados devido à falta de referências indicando a importância dos ésteres formados a partir da reação destes com o álcool oleílico e também o ácido esteárico foi descartado devido à grande dificuldade de titulá-lo utilizando NaOH, em decorrência da saponificação.

Para a realização destes experimentos foram utilizadas diversas enzimas como catalisadores (*Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus parasiticus*, Mamona, Pinhão Manso e Lipozyme TL IM®), a fim de se escolher a melhor lipase para a produção dos ésteres. As condições de reação foram as mesmas utilizadas no estudo anterior.

Os resultados obtidos na esterificação estão apresentados nas tabelas 7 e 8. Os experimentos foram realizados em duplicata.

As atividades enzimáticas e os valores de proteínas totais das enzimas utilizadas estão indicados na tabela 6. A curva padrão de NaOH para o cálculo das atividades enzimáticas, e a curva padrão de proteínas totais, para o cálculo destas, estão apresentadas nos anexos 1 e 2, respectivamente.

Tabela 6 - Atividade Enzimática e Proteínas Totais das Enzimas Utilizadas no Experimento

Enzima	Atividade Enzimática ($\mu\text{mol/g/min}$)	Proteínas Totais ($\mu\text{g/g de enzima}$)	Atividade Específica ($\text{U}/\mu\text{g de proteína}$)
<i>Geotrichum</i> sp.	233,60	204,00	1,14
<i>Aspergillus</i> sp. (1068)	424,60	105,70	4,01
<i>Rhizopus</i> sp.	1390,70	102,00	13,63
<i>Aspergillus parasiticus</i>	240,40	107,90	2,22
Mamona	146,60	101,60	1,44
Pinhão manso	107,10	96,80	1,11
Lipozyme TL IM [®]	2708,77	9,80	276,40

Analisando os resultados obtidos, verificou-se claramente que a taxa de conversão do ácido oléico juntamente com o álcool oleílico foi maior quando se fez uso da enzima de *Rhizopus* sp. Por apresentarem porcentagens abaixo de 20% para ambos os ácidos na reação de esterificação, descartou-se a possibilidade do uso das outras enzimas neste experimento, bem como o uso do ácido butanóico, pois da mesma maneira não foram obtidos bons resultados.

Tabela 7 - Esterificação de Álcool Oleílico e Ácido Oléico por Lipases Obtidas de Microrganismos e Vegetais (Comerciais e Não-Comerciais) a 40°C e 130rpm

Tempo de Reação (h)	% de Esterificação						
	<i>Geotrichum sp.</i>	Lipozyme TL IM®	Mamona	Pinhão Manso	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus</i> 1068	<i>Rhizopus sp.</i>
24	0,00	53,80	0,00	0,50	0,00	0,00	47,70
48	0,00	65,00	0,00	5,10	0,00	1,00	68,00
72	1,00	61,40	1,50	6,60	0,00	3,00	69,00
Atividade Específica	1,14	276,40	1,44	1,11	2,22	4,01	13,63

Tabela 8 - Esterificação de Álcool Oleílico e Ácido Butanóico por Lipases Obtidas de Microrganismos e Vegetais (Comerciais e Não-Comerciais) a 40°C e 130rpm

Tempo de Reação (h)	% de Esterificação						
	<i>Geotrichum sp.</i>	Lipozyme TL IM®	Mamona	Pinhão Manso	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus</i> 1068	<i>Rhizopus sp.</i>
24	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,00	3,51
48	0,00	1,75	0,00	0,00	0,00	0,00	12,72
72	0,00	1,75	0,44	2,19	0,00	0,00	13,59
Atividade Específica	1,14	276,40	1,44	1,11	2,22	4,01	13,63

Desta forma, optou-se pela realização dos experimentos do próximo capítulo fazendo-se uso apenas do ácido oléico, álcool oleílico e lipase de *Rhizopus* sp. como catalisador enzimático, comparando sempre seu desempenho com a lipase comercial Lipozyme TL IM®.

A linhagem de *Rhizopus* sp. utilizada foi isolada por Costa & Pastore (1997) e sua lipase já demonstrou grande potencial de aplicação na síntese de ésteres de baixo peso molecular, empregados como formadores de aromas em alimentos, tais como acetato, butirato e propionato de citronelila, de isoamila, de laurato de citronila, etc (Macedo et al., 1997).

Esta lipase foi empregada como biocatalizador na síntese de monolaurato de ácido láurico e glicerol por Koblitiz & Pastore (2005), onde os melhores resultados obtidos foram com relação molar 1:1, meio contendo 100% de peneira molecular, temperatura de 50°C, 200rpm e aplicando 2mg de lipase parcialmente purificada, obtendo-se um rendimento máximo de 17,52% após 72 horas de reação.

A lipase de *Rhizopus* sp. foi utilizada na esterificação de butirato de isoamila por Macedo e colaboradores (2004^b), onde foi empregado álcool isoamílico juntamente com ácido butírico em um sistema livre de solvente. As condições ótimas de reação encontradas foram com uma razão molar de 1,5:1, à 40°C, utilizando-se 5,5% de enzima e, após 48 horas de reação, obteve-se um rendimento de 75%.

A mesma lipase também foi testada na síntese de butirato de citronelila e valerato de citronelila, porém a enzima mostrou maior habilidade em catalisar a síntese de butirato de citronelila. Os melhores resultados foram obtidos com razão molar de 2,41:1 (álcool:ácido) e quantidade de enzima igual a 6,12% (m/m), no qual obteve-se um

rendimento de 100% após 48 horas de reação. Também foi testada na forma imobilizada, onde se conseguiu um rendimento de 100% em 24 horas de reação, porém a lipase não apresentou estabilidade operacional após alguns ciclos de reação (Pastore et al., 2005).

No entanto, a utilização da metodologia do planejamento experimental e superfície de resposta na síntese de valerato de citronelila, em meio livre de solvente orgânico, foi otimizado, obtendo-se assim uma conversão do éster de 91,5% após 48 horas de reação (Melo et al., 2005).

Também foram estudadas a esterificação direta e reação de transesterificação para a produção de acetato e butirato de citronelila em meio livre de solvente orgânico, e em sistema contendo hexano no meio de reação. As reações foram conduzidas à 45°C e em concentrações equimolares de substratos. Somente o butirato de citronelila foi sintetizado por esterificação direta, com rendimento de 95% a 100% após 24 horas de reação, com ou sem hexano. Já o acetato de citronelila foi sintetizado por transesterificação com acetato de etila e citronelol, com rendimento de 58% após 48 horas de reação, e 48% de conversão para a reação entre acetato de butila e citronelol. Estes resultados sugeriram que o tamanho da cadeia alifática do doador acil foi importante na razão de conversão. Ácidos com mais de dois carbonos mostraram ser melhores substratos para a lipase de *Rhizopus* sp.. Ésteres de quatro carbonos utilizados como substrato foram melhores do que ésteres com seis carbonos na síntese do acetato de citronelila por transesterificação (Macedo et al., 2004^a).

Portanto, baseado nos relatos acima, pôde-se notar que a lipase de *Rhizopus* sp. apresenta um perfil de enzima sintetizadora de ésteres.

A caracterização desta lipase também foi feita no Laboratório de Bioquímica, da Faculdade de Engenharia de Alimento – Unicamp, por

Fleuri & Macedo (2008). Verificou-se que o pH de máxima atividade da lipase bruta de *Rhizopus* sp. está na faixa entre 6 e 6,5, sendo que em pH 6,5 se observa 100U de atividade enzimática. Esta lipase apresentou-se mais estável na faixa de pH compreendida entre 6 e 6,5. A temperatura ótima da enzima foi 40°C e apresentou temperatura de estabilidade na faixa de 25°C e 40°C.

A ação da lipase foi estudada sobre ésteres de ácidos graxos contendo 4, 12 e 16 átomos de carbono. A ação da lipase sobre o *p*NP-butirato (C_{4:0}) foi conduzida em tampão fosfato 25mM (pH 7,0). Os valores da atividade lipásica sobre *p*NP-butirato (C_{4:0}), *p*NP-laurato (C_{12:0}) e *p*NP-palmitato (C_{16:0}) após 5 minutos de reação foram, respectivamente: 74,02U; 31,93U e 28,98U. As reações com os *p*NP-ésteres foram conduzidas também até 15 e 45 minutos, entretanto, foi observado um decréscimo da atividade da lipase estudada nestes tempos reacionais, indicando que aos 5 minutos de reação a coloração já havia sido estabilizada (Fleuri & Macedo, 2008).

No estudo da especificidade da lipase estudada, verificou-se que *Rhizopus* sp. apresentou maior atividade sobre o *p*NP-butirato, em relação aos *p*NPs laurato e palmitato, devido ao tamanho de sua cadeia carbônica ser menor. A lipase também apresentou um decréscimo de atividade ao atuar, respectivamente, sobre *p*NP-butirato e *p*NP-laurato. Entretanto, a atividade manteve-se praticamente a mesma ou apresentou uma leve diminuição ao atuar respectivamente, sobre *p*NP-laurato e *p*NP-palmitato (Fleuri & Macedo, 2008).

Capítulo II – Estudo da Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase Obtida de *Rhizopus* sp. e Lipase Comercial Lipozyme TL IM[®]

Neste segundo capítulo, é apresentado o estudo das variáveis que podem modificar o rendimento da reação de esterificação, tais como relação molar entre os substratos, a concentração de lipase e o tipo de meio reacional. A cinética da reação também foi estudada, assim como a concentração de água no sistema e métodos analíticos para a identificação do éster obtido.

1. Materiais e Métodos

1.1. Influência das Variáveis da Reação de Síntese do Éster

Para este estudo, foram realizados planejamentos experimentais com três variáveis, sem pontos axiais, variando a razão molar, a temperatura e a porcentagem de enzima, para diferentes solventes. Os resultados foram medidos após 2, 4 e 6 horas de reação.

A variação da relação molar foi feita com o intuito de se descobrir o efeito do excesso de um dos reagentes adicionados ao sistema, a fim de se deslocar o equilíbrio químico da reação no sentido do produto (Macedo et

al., 1997). Foram usadas relações molares variando de 1:1 até 1:3, ácido e álcool, respectivamente.

A temperatura foi variada de 40°C a 50°C com o propósito de conhecer o ótimo para este tipo de reação.

A concentração enzimática foi estudada considerando-se como 3% (m/m, enzima/reagentes) a concentração mínima para detecção de atividade sintética e 7% (m/m) de enzima, a concentração máxima, segundo Macedo e colaboradores (1997), em função da solubilidade do extrato no meio reacional.

Foram testados diferentes meios reacionais, sendo eles: meio livre de solvente (sem secagem dos substratos), e com solventes orgânicos (hexano, tolueno e n-heptano).

A polaridade do solvente orgânico empregado nas reações de esterificação é conhecida por afetar a atividade das enzimas. O valor de log P do solvente é um parâmetro amplamente usado para descrever a polaridade dos solventes e seus possíveis efeitos na atividade enzimática, onde P é o coeficiente de partição de um composto no sistema bifásico octanol-água. Geralmente recomenda-se o uso de solventes com log P > 4,0 (não-polar) por resultar em uma melhor esterificação. Solventes com valores de log P entre 4,0 e 3,5 geralmente promovem uma esterificação moderada e solventes com log P < 3,5 tendem a resultar numa esterificação mais baixa (Radzi et al., 2005 ^a).

Os solventes utilizados neste experimento: tolueno, hexano e n-heptano, apresentam valores de log P de 2,65, 3,50 e 4,66, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os resultados foram comparados aos resultados obtidos com a enzima comercial Lipozyme TL IM®. A tabela 9 mostra os valores máximos e mínimos que foram estudados para cada variável, e o delineamento experimental é apresentado na tabela 10.

Tabela 9 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental dos Meios Reacionais

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Razão Molar (Álcool:Ácido)	(1:1)	(1:2)	(1:3)
Temperatura (°C)	40	45	50
% de Enzima	3	5	7

Tabela 10 - Delineamento Experimental (Meios Reacionais)

Ensaio	RM	T (°C)	% E (m/m)
	(x ₁)	(x ₂)	(x ₃)
1	(1:1)	40	3
2	(1:3)	40	3
3	(1:1)	50	3
4	(1:3)	50	3
5	(1:1)	40	7
6	(1:3)	40	7
7	(1:1)	50	7
8	(1:3)	50	7
9	(1:2)	45	5
10	(1:2)	45	5
11	(1:2)	45	5

RM = Razão Molar; T = Temperatura; E = Enzima.

1.2. Otimização da Síntese de Oleato de Oleíla

Após a análise do planejamento experimental, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) de 2ª ordem, ou seja, um 2² incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Rodrigues & Iemma, 2005) para um estudo mais aprofundado das variáveis: razão molar entre os substratos e concentração enzimática. As variáveis foram examinadas em cinco níveis codificados como $-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$ ($\alpha = 1,41$). Os valores reais correspondentes a esses níveis foram estabelecidos dentro das possibilidades operacionais do processo e com base nos diversos ensaios preliminares que foram realizados.

As tabelas 11 e 12 apresentam a faixa de estudo para cada variável com as lipases de *Rhizopus* sp. e de Lipozyme TL IM®, respectivamente. Os delineamentos experimentais de cada enzima estão apresentados nas tabelas 13 e 14.

Tabela 11 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental para Lipase de *Rhizopus* sp.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
x ₁ = Relação molar entre álcool:ácido	(1:0,6)	(1:1)	(1:2)	(1:3)	(1:3,4)
x ₂ = Concentração de lipase (m/m)	4,2%	5%	7%	9%	9,8%

Tabela 12 - Valores Utilizados no Planejamento Experimental para Lipase Comercial Lipozyme TL IM®

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
x ₁ = Relação molar entre álcool:ácido	(1:1,6)	(1:2)	(1:3)	(1:4)	(1:4,4)
x ₂ = Concentração de lipase (m/m)	4,2	5	7	9	9,8

Tabela 13 - Delineamento Experimental para Lipase Obtida de *Rhizopus* sp.

Ensaio	Níveis das Variáveis			
	RM (x ₁)		% E (m/m) (x ₂)	
1	-1	(1:1)	-1	5
2	1	(1:3)	-1	5
3	-1	(1:1)	1	9
4	1	(1:3)	1	9
5	-1,41	(1:0,6)	0	7
6	1,41	(1:3,4)	0	7
7	0	(1:2)	-1,41	4,2
8	0	(1:2)	1,41	9,8
9	0	(1:2)	0	7
10	0	(1:2)	0	7
11	0	(1:2)	0	7

RM = Razão Molar; E = Enzima.

Tabela 14 - Delineamento Experimental para Lipase Comercial Lipozyme TL IM®

Ensaio	Variáveis			
	RM (x_1)		% E (m/m) (x_2)	
1	-1	(1:2)	-1	5
2	1	(1:4)	-1	5
3	-1	(1:2)	1	9
4	1	(1:4)	1	9
5	-1,41	(1:1,6)	0	7
6	1,41	(1:4,4)	0	7
7	0	(1:3)	-1,41	4,2
8	0	(1:3)	1,41	9,8
9	0	(1:3)	0	7
10	0	(1:3)	0	7
11	0	(1:3)	0	7

RM = Razão Molar; E = Enzima.

1.3. Cinética de Reação

O estudo da cinética foi realizado para a reação de síntese do oleato de oleíla, utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. e a mesma análise foi feita utilizando a enzima comercial Lipozyme TL IM®. Estes experimentos foram feitos nas condições de reação otimizadas das enzimas, sendo que para a lipase de *Rhizopus* sp. foi empregada razão molar de 1:2 (ácido:álcool) e concentração de enzima igual a 9,8%. Já para a lipase comercial Lipozyme TL IM®, a razão molar foi de 1:3 (ácido:álcool) e a concentração de lipase foi de 7%. Para ambas as enzimas, a temperatura utilizada foi 40°C.

A cinética da reação foi acompanhada nas condições ótimas encontradas, no qual amostras de cada experimento foram retiradas em tempos determinados e porcentagem de esterificação medida em cada ponto. Esta análise foi feita com a finalidade de melhor definição do tempo de reação necessário para maior porcentagem de esterificação do oleato de oleíla.

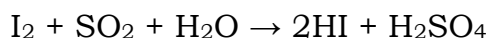
1.4. Efeito da Concentração de Água no Sistema de Síntese

As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para conservar seu estado conformacional tridimensional e conseqüentemente sua atividade biológica. Até mesmo quando a enzima é covalentemente ligada a um suporte isto é verdadeiro. A água contribui para a integridade estrutural, a polaridade do sítio ativo e a estabilidade da proteína. Ela fornece uma interação hidrofóbica com os resíduos polares na molécula da enzima que poderiam, por outro lado, estar interagindo mutuamente, criando uma estrutura conformacional incorreta. A água pode também limitar a solubilidade dos substratos hidrofóbicos ao redor da enzima. A quantidade real de água necessária varia significativamente dependendo da origem da lipase. Alguns pesquisadores sugerem uma monocamada de água ao redor da molécula de enzima, enquanto outros propõem pequenas quantidades embebidas na molécula da enzima (Yahya et al., 1998).

Nas reações de esterificação/hidrólise, o conteúdo de água afeta o equilíbrio da reação, bem como a distribuição dos produtos no meio. Além da atividade, a água afeta também a termo-inativação das enzimas. A estabilidade é mais alta a elevadas temperaturas em meio com baixa

quantidade de água, quando comparada com soluções aquosas (Yahya et al., 1998).

Para a determinação da quantidade de água nos meios reacionais, utilizou-se o método de Karl Fischer, um dos métodos mais importantes para a determinação de água em amostras diversas. Essa metodologia baseia-se na oxidação de SO₂ pelo I₂ em presença de água, como mostra a equação de reação 5 (Laitnen & Harris, 1975).



(3)

Karl Fischer empregou a reação acima para a determinação quantitativa da água. Ele propôs um reagente preparado pela ação de dióxido de enxofre sobre uma solução de iodo em uma mistura de piridina anidra e metanol anidro. A água reage com esse reagente em um processo constituído por duas etapas, no qual uma molécula de iodo se transforma em ácido iodídrico para cada molécula de água presente. O reagente Karl Fischer é preparado de modo que sua capacidade de combinação com a água é determinada pela concentração de iodo na solução. A determinação do ponto final da reação pode ser visual, isto é, quando for percebido um pequeno excesso de titulante e o mesmo adquire uma coloração mais escura (Laitnen & Harris, 1975).

Essa metodologia é empregada para a determinação de água livre ou hidratação em compostos orgânicos ou inorgânicos, sólidos e líquidos. O método é adequado para a dosagem de água em uma ampla faixa de

concentração, isto é, vai desde partes por milhão até a água pura, levando-se em conta a escolha do volume de amostra, a concentração do reagente Karl Fischer e o aparelho empregado. Nestes estudos, o aparelho utilizado foi o KF-1000 (Analyser).

Uma peneira molecular (*molecular sieve*) é um material microporoso, com poros de tamanhos precisos e uniformes, usado como adsorvente para gases e líquidos. Moléculas suficientemente pequenas para atravessarem os poros são absorvidas enquanto com moléculas maiores isto não ocorre. Frequentemente utilizados como dessecantes, a peneira molecular pode absorver até 22% do seu peso em água (Xinyuan Technology Co., Ltd.).

Foram inseridas quantidades (até 40%, em massa) de peneira molecular nos sistemas de reação com a finalidade de retirar a água em excesso e verificar sua influência na produção do éster após 120 minutos de reação. Em seguida, 1mL de cada amostra foi analisada em Karl Fischer, modelo KF-1000, da Analyser.

1.5. Métodos Analíticos

1.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é considerada uma cromatografia em coluna modificada para o plano, pois ela consiste na separação dos componentes de uma mistura por migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente preso sobre uma superfície

plana. Essa superfície é geralmente de vidro plano, porém pode ser também de alumínio, com a vantagem de poder ser recortada. Essa técnica apresenta uma série de vantagens como fácil execução, rapidez, versatilidade, grande reprodutibilidade, baixo custo e aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e da amostra em análise (Cecchi, 2003).

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel (60, 10x10cm, ALUGRAN® Sil G/UV₂₅₄), utilizando como fase móvel éter de petróleo:éter etílico:ácido fórmico na proporção (210:90:0,4 v:v:v) à temperatura de 25°C. As amostras foram aplicadas em uma extremidade da placa, na forma de uma pequena mancha. A placa foi então colocada em uma cuba retangular de vidro com solvente, sendo possível a detecção de diferentes zonas de acordo com a afinidade com o solvente. A revelação foi feita utilizando ácido sulfúrico (5%) em etanol, seguido de aquecimento a 100°C (Paques, 2005). A presença do álcool oleílico, fração de ácido oléico e seus ésteres correspondentes foram detectados como pontos marrons e comparados ao ácido oléico e álcool oleílico, padrões.

1.5.2. Análise e Quantificação dos Ésteres por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa

A análise por cromatografia gasosa com espectrometro de massa (CG-EM) foi conduzida segundo a metodologia descrita por Keng e colaboradores (2008), através da injeção de uma alíquota de 1µL da amostra (10% em hexano) no cromatógrafo gasoso Shimadzu GCMS – QP2010S no modo split, com detector de massas e uma coluna capilar

RTX-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m). As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura do forno foi mantida a 150°C por 2 minutos, aumentando para 290°C com um aumento da razão de 20°C/min e mantida por 20 minutos. Hélio foi usado como gás de arraste na vazão de 1,4mL/min.

2. Resultados e Discussão

2.1. Influência das Variáveis da Reação de Síntese do Éster

A tabela 15 apresenta os valores obtidos no planejamento experimental realizado sem adição de solvente. O melhor resultado obtido neste estudo foi 96,5% de esterificação, no ensaio 8, após 6 horas de reação. As tabelas 16 a 21 apresentam as análises estatísticas e as ANOVAs obtidas nos tempos de reação estudados.

Tabela 15 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de *Rhizopus* sp., sem Adição de Solvente

Ensaio	Variáveis						% Esterificação		
	RM (x ₁)		T (°C) (x ₂)		% E (m/m) (x ₃)		2 horas	4 horas	6 horas
1	-1	(1:1)	-1	40	-1	3	46,5	69,8	87,2
2	+1	(1:3)	-1	40	-1	3	72,7	78,5	93,6
3	-1	(1:1)	+1	50	-1	3	40,7	86,6	88,4
4	+1	(1:3)	+1	50	-1	3	65,1	93,6	95,9
5	-1	(1:1)	-1	40	+1	7	88,4	90,1	90,1
6	+1	(1:3)	-1	40	+1	7	91,9	93,0	94,2
7	-1	(1:1)	+1	50	+1	7	88,4	90,7	93,0
8	+1	(1:3)	+1	50	+1	7	94,2	94,8	96,5
9	0	(1:2)	0	45	0	5	83,7	91,3	92,4
10	0	(1:2)	0	45	0	5	77,9	91,3	92,4
11	0	(1:2)	0	45	0	5	79,1	91,3	92,4

RM = Razão Molar; T = Temperatura; E = Enzima.

Tabela 16 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, sem Adição de Solvente

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	75,74	0,93	81,30	0,0001	71,73	79,75
Razão Molar (L) *	14,98	2,17	6,92	0,0203	5,66	24,29
Razão Molar (Q)	6,75	2,07	3,26	0,0828	-2,17	15,66
Temperatura (L)	-2,78	2,17	-1,28	0,3284	-12,09	6,54
% Enzima (L) *	34,48	2,17	15,92	0,0039	25,16	43,79

* Significância de 95%.

Tabela 17 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, sem Adição de Solvente

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	2825,55	2	1412,78	29,77
Resíduo	379,59	8	47,45	
Falta de Ajuste	360,84	6	60,14	
Erro Puro	18,75	2		
Total	3205,14	10		
R ² = 91,7% F _{2;8;0,05} = 4,46				

Analizando os dados obtidos nas tabelas 16 e 17, tem-se que as variáveis: razão molar e porcentagem de enzima são significativas neste estudo, como mostram seus p-valores, que apresentaram valores abaixo do nível α de significância utilizado (0,05).

Observando-se o valor do t-calculado [t(2)] de ambas as variáveis, nota-se que, tanto a razão molar (6,92) quanto a porcentagem enzimática (15,92), apresentaram valores acima do valor de t-student (4,3), o que demonstra que o efeito foi maior que o erro padrão e, quanto maior o valor do efeito, maior o impacto das variáveis sobre a resposta.

Como o F_{calculado} neste estudo (29,77) é altamente significativo e a porcentagem de variação explicada pelo modelo (R²) foi muito boa (91,7%), pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

A mesma análise pode ser feita para a síntese de oleato de oleíla após 4 horas de reação, observando-se as tabelas 18 e 19. Nestas, analisando-se os p-valores obtidos, tem-se que as variáveis: temperatura e porcentagem de enzima são significativas, pois apresentaram valores abaixo do nível α de significância (0,05).

Ao se observar o $F_{\text{calculado}}$ (6,28), nota-se que este foi maior que o valor do F_{tabelado} (4,46), demonstrando que as análises foram estatisticamente significativas. O t-calculado [t(6)] de ambas as variáveis consideradas significativas apresentaram valores maiores quando comparado ao valor de t-student (2,45), demonstrando que o efeito foi maior que o erro padrão.

Tabela 18 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, sem Adição de Solvente

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	88,53	1,36	65,24	0,0000	85,21	91,85
Razão Molar (L)	5,68	3,15	1,80	0,1220	-2,04	13,39
Razão Molar (Q)	4,16	3,02	1,38	0,2172	-3,23	11,55
Temperatura (L) *	8,58	3,15	2,72	0,0347	0,86	16,29
% Enzima (L) *	10,03	3,15	3,18	0,0191	2,31	17,74

* Significância de 95%.

Tabela 19 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, sem Adição de Solvente

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calc.}}$
Regressão	348,06	2	174,03	6,28
Resíduo	221,54	8	27,69	
Total	569,60	10		

$R^2 = 61,1\%$ $F_{2;8;0,05} = 4,46$

E, finalmente, realizando a mesma análise para o estudo com 6 horas de reação de esterificação (Tabelas 20 e 21), tem-se que as variáveis significativas foram: razão molar, temperatura e porcentagem de enzima,

pois todas apresentaram p-valores abaixo do nível α de significância (0,05). Os valores de t-calculado também apresentaram valores acima do valor de t-student (2,45), concluindo-se que o efeito foi maior que o erro padrão.

O $F_{\text{calculado}}$ (31,29) também foi maior que o F_{tabelado} (4,35), mostrando que as análises foram estatisticamente significativas.

Tabela 20 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, sem Adição de Solvente

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	92,38	0,30	311,05	0,0000	91,65	93,10
Razão Molar (L) *	5,38	0,69	7,79	0,0002	3,69	7,06
Razão Molar (Q)	0,04	0,66	0,06	0,9566	-1,58	1,65
Temperatura (L) *	2,18	0,69	3,15	0,0198	0,49	3,86
% Enzima (L) *	2,18	0,69	3,15	0,0198	0,49	3,86

* Significância de 95%.

Tabela 21 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, sem Adição de Solvente

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calc.}}$
Regressão	76,7	3	25,57	31,29
Resíduo	5,72	7	0,82	
Total	82,42	10		

$R^2 = 93,0\%$ $F_{3;7;0,05} = 4,35$

Analisando a tabela 22, resultado da esterificação de oleato de oleíla pela lipase de *Rhizopus* sp., utilizando tolueno, pôde-se observar que o rendimento máximo obtido foi de 96,5% no ensaio 8, após 6 horas de

reação. As tabelas 23 a 28 apresentam as análises estatísticas e as ANOVAs obtidas nos tempos de reação estudados.

Tabela 22 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de *Rhizopus* sp., em Meio Contendo Tolueno

Ensaio	Variáveis						% Esterificação		
	RM (x ₁)		T (°C) (x ₂)		% E (m/m) (x ₃)		2 horas	4 horas	6 horas
1	-1	(1:1)	-1	40	-1	3	8,10	8,10	75,60
2	+1	(1:3)	-1	40	-1	3	23,80	45,40	93,60
3	-1	(1:1)	+1	50	-1	3	5,80	20,40	39,00
4	+1	(1:3)	+1	50	-1	3	34,90	86,60	94,80
5	-1	(1:1)	-1	40	+1	7	57,00	84,90	91,90
6	+1	(1:3)	-1	40	+1	7	89,50	95,40	95,40
7	-1	(1:1)	+1	50	+1	7	38,40	89,50	91,30
8	+1	(1:3)	+1	50	+1	7	90,10	95,90	96,50
9	0	(1:2)	0	45	0	5	57,00	90,70	94,20
10	0	(1:2)	0	45	0	5	55,80	91,90	93,00
11	0	(1:2)	0	45	0	5	54,70	87,20	92,40

RM = Razão Molar; T = Temperatura; E = Enzima.

Realizando a análise estatística, nota-se que após 2 horas de reação de esterificação, as variáveis consideradas significativas foram: razão molar e porcentagem enzimática. Após 4 e 6 horas, todas as variáveis estudadas foram consideradas significativas no estudo, devido aos seus p-valores apresentarem valores abaixo do valor do nível α de significância (0,05), utilizado na análise.

Quando se faz a análise do valor de t-calculado [t(2)], observa-se que para todas as variáveis citadas acima, obteve-se um valor maior do que o valor de t-student (4,3), concluindo-se que o efeito foi maior que o erro padrão.

E, finalmente, analisando-se os valores de $F_{\text{calculado}}$, nota-se que após 2 horas de reação, este (40,50) foi altamente significativo quando comparado ao F_{tabelado} (4,35), demonstrando que a análise foi estatisticamente significativa. O mesmo pode ser observado após 4 horas de reação, em que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (9,04) é maior que o valor de F_{tabelado} (4,53). Porém, após 6 horas, nota-se que o valor de $F_{\text{calculado}}$ (2,58) é menor que o F_{tabelado} , demonstrando que esta análise não foi estatisticamente significativa.

Portanto, como os dados obtidos após 6 horas de reação utilizando-se tolueno não foram estatisticamente significativos, considera-se a maior taxa de esterificação obtida no ensaio 8, após 4 horas de reação, no qual obteve-se 95,9% de conversão do éster.

Tabela 23 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de Tolueno

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	47,58	0,35	135,92	<0,0001	46,07	49,08
Razão Molar (L) *	32,25	0,81	39,65	0,0006	28,75	35,75
Razão Molar (Q) *	12,38	0,78	15,90	0,0039	9,03	15,73
Temperatura (L)	-2,30	0,81	-2,83	0,1056	-5,80	1,20
% Enzima (L) *	50,60	0,81	62,20	0,0003	47,10	54,1

* Significância de 95%.

Tabela 24 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de Tolueno

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	7535,41	3	2511,80	40,50
Resíduo	434,11	7	62,01	
Falta de Ajuste	431,46	5	86,29	
Erro Puro	2,65	2		
Total	7969,52	10		
R ² = 94,6% F _{3;7;0,05} = 4,35				

Tabela 25 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de Tolueno

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	73,83	0,74	99,35	0,0001	70,63	77,02
Razão Molar (L) *	30,10	1,73	17,43	0,0033	22,67	37,53
Razão Molar (Q) *	24,16	1,65	14,61	0,0047	17,04	31,27
Temperatura (L) *	14,65	1,73	8,48	0,0136	7,22	22,08
% Enzima (L) *	51,30	1,73	29,71	0,0011	43,87	58,73

* Significância de 95%.

Tabela 26 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de Tolueno

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	8778,01	4	2194,50	9,04
Resíduo	1455,20	6	242,53	
Falta de Ajuste	1443,27	4	360,82	
Erro Puro	11,93	2		
Total	10233,21	10		
R ² = 85,8% F _{4;6;0,05} = 4,53				

Tabela 27 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de Tolueno

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	87,58	0,28	314,02	<0,0001	86,38	88,78
Razão Molar (L) *	20,63	0,65	31,83	0,0010	17,84	23,41
Razão Molar (Q) *	8,44	0,62	13,60	0,0054	5,77	11,11
Temperatura (L) *	-8,73	0,65	-13,46	0,0055	-11,51	-5,94
% Enzima (L) *	18,02	0,65	27,81	0,0013	15,24	20,81

* Significância de 95%.

Tabela 28 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de Tolueno

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	1808,16	4	452,04	2,58
Resíduo	1050,47	6	175,08	
Falta de Ajuste	1048,79	4	262,20	
Erro Puro	1,68	2		
Total	2858,63	10		

R² = 63,3% F_{4;6;0,05} = 4,53

Já utilizando-se hexano no meio reacional, os melhores resultados foram adquirido com 4 horas de reação, no ensaios 8, e nos ensaios 4 e 8 após 6 horas de reação, como mostra a tabela 29. As tabelas 30 a 35 apresentam as análises estatísticas e as ANOVAs obtidas nos tempos de reação estudados.

Tabela 29 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de *Rhizopus* sp., em Meio Contendo Hexano

Ensaio	Variáveis						% Esterificação		
	RM (x_1)		T (°C) (x_2)		% E (m/m) (x_3)		2 horas	4 horas	6 horas
1	-1	(1:1)	-1	40	-1	3	77,90	88,40	91,30
2	+1	(1:3)	-1	40	-1	3	78,50	94,20	95,40
3	-1	(1:1)	+1	50	-1	3	84,90	91,90	94,20
4	+1	(1:3)	+1	50	-1	3	87,20	95,40	96,50
5	-1	(1:1)	-1	40	+1	7	90,10	91,30	91,90
6	+1	(1:3)	-1	40	+1	7	94,80	94,20	96,50
7	-1	(1:1)	+1	50	+1	7	91,90	93,60	94,80
8	+1	(1:3)	+1	50	+1	7	94,80	96,50	96,50
9	0	(1:2)	0	45	0	5	70,90	93,00	92,40
10	0	(1:2)	0	45	0	5	73,30	91,90	93,00
11	0	(1:2)	0	45	0	5	73,80	91,90	93,60

RM = Razão Molar; T = Temperatura; E = Enzima.

Analizando os dados estatísticos obtidos para o experimento utilizando hexano, tem-se que, levando-se em conta os p-valores encontrados, após 2 e 6 horas de reação, apenas a variável razão molar foi considerada significativa na reação, e, após 4 horas, razão molar e temperatura foram consideradas significativas. Isto porque seus p-valores foram menores que o nível α de significância (0,05).

Ao se observar os valores de t-calculado [t(2)] para as variáveis significativas citadas acima, nota-se que todas obtiveram valores acima do t-student analisado (4,3), demonstrando que o efeito, foi maior que o erro padrão, concluindo-se que houve um maior impacto as variáveis sobre as respostas.

E, analisando os valores de $F_{\text{calculado}}$, observa-se que em todos os tempos estudados, este valor foi maior que seus respectivos valores de

F_{tabelado} , podendo-se concluir que os experimentos realizados com hexano foram estatisticamente significativos.

Tabela 30 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de Hexano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	82,56	0,47	175,02	<0,0001	80,53	84,60
Razão Molar (L)	2,63	1,10	2,40	0,1390	-2,09	7,34
Razão Molar (Q) *	-14,85	1,05	-14,15	0,0050	-19,36	-10,33
Temperatura (L)	4,38	1,10	3,99	0,0574	-0,34	9,09
% Enzima (L) *	10,78	1,05	9,83	0,0102	6,06	15,49

* Significância de 95%.

Tabela 31 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de Hexano

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	$F_{\text{calc.}}$
Regressão	713,07	2	356,54	33,43
Resíduo	85,32	8	10,67	
Falta de Ajuste	80,51	6	13,42	
Erro Puro	4,81	2		
Total	798,39	10		

$R^2 = 89,3\%$ $F_{2;8;0,05} = 4,46$

Tabela 32 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de Hexano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	92,88	0,19	480,63	<0,0001	92,05	93,71
Razão Molar (L) *	3,76	0,45	8,41	0,0139	5,71	5,71
Razão Molar (Q)	-0,92	0,43	-2,14	0,1655	0,93	0,93
Temperatura (L) *	2,33	0,45	5,18	0,0353	4,26	4,26
% Enzima (L)	1,43	0,45	3,17	0,0866	3,36	3,36

* Significância de 95%.

Tabela 33 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de Hexano

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	39,31	2	19,66	16,41
Resíduo	9,58	8	1,20	
Falta de Ajuste	8,77	6	1,46	
Erro Puro	0,81	2		
Total	48,89	10		

R² = 80,4% F_{2;8;0,05} = 4,46

Tabela 34 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de Hexano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	94,09	0,18	515,36	<0,0001	93,31	94,88
Razão Molar (L) *	3,18	0,42	7,48	0,0174	1,35	5,00
Razão Molar (Q)	-1,64	0,41	-4,03	0,0564	-3,38	0,11
Temperatura (L)	1,73	0,42	4,07	0,0555	-0,10	3,55
% Enzima (L)	0,58	0,42	1,36	0,3081	-1,25	2,40

* Significância de 95%.

Tabela 35 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de Hexano

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	20,16	1	20,16	11,20
Resíduo	16,25	9	1,80	
Falta de Ajuste	15,53	7	2,22	
Erro Puro	0,72	2		
Total	36,41	10		

R² = 55,4% F_{1;9;0,05} = 5,12

E, finalmente utilizando-se n-heptano no meio reacional, o melhor resultado foi alcançado com 4 horas, no ensaio 8 e nas mesmas condições de reação após 6 horas, como mostra a tabela 36. As tabelas 37 a 42 apresentam as análises estatísticas e as ANOVAs obtidas nos tempos de reação estudados.

Tabela 36 - Experimentos de Síntese de Oleato de Oleíla por Lipase de *Rhizopus* sp., em Meio Contendo n-Heptano

Ensaio	Variáveis						% Esterificação		
	RM (x1)	T (°C) (x2)	% E (x3)	2 horas	4 horas	6 horas			
1	-1 (1:1)	-1 40	-1 3	74,40	89,50	90,10			
2	+1 (1:3)	-1 40	-1 3	72,10	90,10	94,20			
3	-1 (1:1)	+1 50	-1 3	76,70	93,60	93,60			
4	+1 (1:3)	+1 50	-1 3	87,20	95,90	95,90			
5	-1 (1:1)	-1 40	+1 7	90,70	90,70	90,70			
6	+1 (1:3)	-1 40	+1 7	89,50	95,90	95,90			
7	-1 (1:1)	+1 50	+1 7	91,90	94,20	94,20			
8	+1 (1:3)	+1 50	+1 7	94,80	96,50	96,50			
9	0 (1:2)	0 45	0 5	66,30	91,90	93,00			
10	0 (1:2)	0 45	0 5	66,90	91,90	93,00			
11	0 (1:2)	0 45	0 5	65,70	91,90	93,00			

RM = Razão Molar; T = Temperatura; E = Enzima.

Realizando-se a análise estatística, nota-se que avaliando os p-valores obtidos, tem-se que após 2 horas de reação, todas as variáveis estudadas foram consideradas estatisticamente significativas. Após 4 horas, razão molar e porcentagem de enzima foram as variáveis significativas. E após 6 horas de reação, apenas a variável razão molar foi considerada estatisticamente significativa.

Ao serem observados os valores de t-calculado para todas as variáveis citadas acima, nota-se que todas obtiveram um valor acima de seu respectivo valor de t-student, demonstrando que seus efeitos foram maiores que os erros padrão encontrados.

E, como última análise, tem-se que para os tempos estudados, todos obtiveram um valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que o seu respectivo valor de F_{tabelado} , concluindo-se que todos os experimentos com n-heptano foram estatisticamente significativos.

Tabela 37 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de n-Heptano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	78,54	0,18	430,19	<0,0001	77,76	79,33
Razão Molar (L) *	2,48	0,42	5,83	0,0282	0,65	4,30
Razão Molar (Q) *	-18,36	0,41	-45,21	0,0005	-20,11	-16,61
Temperatura (L) *	5,98	0,42	14,08	0,0050	4,15	7,80
% Enzima (L) *	14,13	0,42	33,29	0,0009	12,30	15,95

* Significância de 95%.

Tabela 38 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 2 horas, com Adição de n-Heptano

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	1218,35	4	304,59	27,69
Resíduo	66,02	6	11,00	
Falta de Ajuste	65,30	4	16,33	
Erro Puro	0,72	2		
Total	1284,37	10		
R ² = 94,9% F _{4;6;0,05} = 4,53				

Tabela 39 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de n-Heptano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	92,84	0,39	240,25	0,0000	91,89	93,78
Razão Molar (L) *	2,60	0,90	2,90	0,0275	0,40	4,80
Razão Molar (Q)	-1,40	0,86	-1,63	0,1545	-3,50	0,70
Temperatura (L) *	3,50	0,90	3,90	0,0080	1,30	5,70
% Enzima (L)	2,05	0,90	2,28	0,0625	-0,15	4,25

* Significância de 95%.

Tabela 40 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 4 horas, com Adição de n-Heptano

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	38,02	1	38,02	13,60
Resíduo	22,36	8	2,80	
Total	60,38	10		
R ² = 63,0% F _{1;8;0,05} = 5,32				

Tabela 41 - Análise Estatística para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de n-Heptano

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	93,59	0,22	420,18	0,0000	93,05	94,14
Razão Molar (L) *	3,48	0,52	6,71	0,0005	2,21	4,74
Razão Molar (Q)	-0,89	0,50	-1,79	0,1235	-2,10	0,33
Temperatura (L) *	2,33	0,52	4,49	0,0041	1,06	3,59
% Enzima (L)	0,88	0,52	1,69	0,1419	-0,39	2,14

* Significância de 95%.

Tabela 42 - ANOVA para a Síntese de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. após 6 horas, com Adição de n-Heptano

Notas, com base no n-Heptano				
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	34,96	1	34,96	43,16
Resíduo	6,47	8	0,81	
Total	41,43	10		
R ² = 84,4%	F _{1;8;0,05} = 5,32			

Para se observar o quão significativa foi a influência dos solventes na reação de esterificação, foram analisados os pontos centrais obtidos nos planejamentos experimentais acima através do teste de Tukey.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 43, na qual as letras indicam a significância de cada variável na porcentagem de esterificação do éster oleato de oleíla, sendo que letras diferentes demonstram haver diferença significativa entre as variáveis.

Tabela 43 - Análise dos Valores dos Pontos Centrais para Esterificação com e sem Solventes Utilizando Testes de Tukey

Experimentos (Pontos Centrais)	% de Esterificação		
	2 horas	4 horas	6 horas
Sem Solvente	80,23 ± 3,06 a	91,30 ± 0,00 a	92,40 ± 0,00 a
Tolueno	55,83 ± 1,15 d	89,93 ± 2,44 a	93,20 ± 0,92 a
Hexano	72,67 ± 1,55 b	92,27 ± 0,64 a	93,00 ± 0,60 a
n-Heptano	66,30 ± 0,60 c	91,90 ± 0,00 a	93,00 ± 0,00 a

Nota: Médias seguidas da mesma letra não são consideradas estatisticamente diferentes, a um nível de confiança de 95%.

Analizando o teste de Tukey realizado, nota-se que apenas a esterificação feita após duas horas apresentou diferença significativa entre as reações sem solvente com as reações realizadas com o uso de solvente orgânico, com maiores taxas de conversão na ausência de solvente.

A tabela 43 mostra que todos os sistemas com solventes e o sistema de reação sem solvente apresentaram diferença significativa somente após 2 horas, sendo que o melhor resultado foi apresentado pelo sistema sem presença de solvente orgânico. Ainda na tabela 43, demonstra-se que não houve diferença significativa entre as reações com e sem solvente após 4 e 6 horas de reação.

De modo geral, todos os solventes orgânicos mostraram grandes porcentagens na taxa de conversão do oleato de oleíla. Porém, a adição destes não modificou a produção do éster de forma significativa, quando comparada a reação de esterificação sem adição de solvente orgânico.

Para alguns autores, do ponto de vista biotecnológico, há numerosas vantagens que conduzem a conversão enzimática em solvente orgânico em

relação ao uso da água: alta solubilidade da maioria dos compostos orgânicos em meio não-aquoso; habilidade de realizar reações impossíveis em água devido às restrições cinéticas ou termodinâmicas; maior estabilidade da enzima; relativa facilidade em resgatar produtos quando comparado à água; e insolubilidade da enzima em meio orgânico, o que permite uma recuperação mais fácil e reutilização, eliminando assim a necessidade de imobilização (Zaks & Klibanov, 1985).

A importância da síntese catalisada por enzimas na presença de solvente orgânico tem sido relatada em muitos artigos (Chiang et al., 2003; Leblanc et al., 1998; Liaquat & Owusu, 2000; Xu et al., 2002). Porém, o uso de solventes orgânicos vem sendo progressivamente proibido para muitas aplicações (Karra-Châabouni et al., 2006).

Vários fatores devem ser levados em conta na determinação de qual solvente é mais apropriado para dada reação (Dordick, 1989). A natureza do solvente influencia a atividade da enzima em grande extensão (Knez & Habulin, 2002), podendo afetar a catálise enzimática de três maneiras distintas. Primeiro, o solvente pode causar inibição ou inativação por interação direta com a enzima. Neste caso, o solvente altera a conformação nativa da proteína, rompendo as pontes de hidrogênio e as interações hidrofóbicas nas adjacências, levando a uma redução da atividade e estabilidade. Outra maneira do solvente afetar a enzima é interagindo com a dispersão dos substratos ou produtos da reação. E, finalmente, o solvente orgânico pode interagir diretamente com a água de solvatação nas adjacências da enzima. Embora esta interação possa não afetar diretamente a enzima, pode causar consequências maiores para a catálise. Especificamente, solventes de alta polaridade são capazes de solubilizar grandes quantidades de água e apresentam tendência de retirar a camada de água essencial da enzima, causando inativação (Dordick, 1989).

Alguns dos aspectos mais negativos em se usar solvente orgânico nas reações são por ele ser tóxico, inflamável e por seu uso envolver altos custos e investimentos em purificação dos produtos (Karra-Châabouni et al., 2006).

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que os solventes orgânicos não influenciaram de forma significativa a produção de éster. Desta forma, descartou-se definitivamente a utilização de qualquer solvente orgânico na fabricação do éster oleato de oleíla.

Também foi escolhido o tempo de 2 horas de reação para dar seqüência às reações dos itens a seguir como sendo o tempo máximo de reação, já que este apresentou bons resultados na análise estatística das reações de esterificação sem a utilização de solvente.

2.2. Otimização da Síntese de Oleato de Oleíla

Com o intuito de otimizar o rendimento da esterificação do oleato de oleíla por lipase de *Rhizopus* sp., realizou-se um planejamento fatorial completo com cinco níveis e duas variáveis, como descrito anteriormente. Os percentuais de síntese do éster foram medidos após 30, 60 e 120 minutos de reação utilizando-se a enzima obtida de *Rhizopus* sp., e após 120 minutos para a enzima comercial Lipozyme TL IM® para fins comparativos. O objetivo, neste capítulo, era alcançar valores próximos a 100% de esterificação após no máximo 120 minutos de reação, similar aos resultados obtidos por Kapucu e colaboradores (2003), empregando a

lipase comercial purificada e imobilizada *Candida antarctica* (Novozyme 435).

Os parâmetros reacionais avaliados foram concentração enzimática e relação molar entre os substratos na taxa de conversão do éster, visto que foram os parâmetros que mais influenciaram as reações dos estudos anteriores, considerando-se os valores obtidos com 2 horas de reação e sem adição de solvente. A temperatura foi mantida a 40°C, temperatura ótima da lipase, e também devido a esta não influenciar de forma significativa as reações de esterificação no intervalo de temperatura estudado, como foi observado anteriormente.

A tabela 44 mostra o resultado experimental obtido para cada um dos 11 ensaios na síntese do éster oleato de oleíla utilizando a enzima *Rhizopus* sp. nos três tempos já citados. Notou-se que houve uma maior produção de éster após 120 minutos de reação, utilizando a razão molar de 1:2 (ácido:álcool) e 9,8% de enzima (maior concentração enzimática), conseguindo um rendimento de 93,1% de esterificação.

Tabela 44 - Resultados do Planejamento Fatorial Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp. a 40°C

Ensaio	Variáveis				% de Esterificação		
	RM (x ₁)		% E (m/m) (x ₂)		30 minutos	60 minutos	120 minutos
1	-1	(1:1)	-1	5	51,70	69,00	82,80
2	+1	(1:3)	-1	5	60,90	79,30	89,70
3	-1	(1:1)	+1	9	73,60	83,90	88,50
4	+1	(1:3)	+1	9	72,40	86,20	90,80
5	-141	(1:0,6)	0	7	37,90	42,50	56,30
6	+1,41	(1:3,4)	0	7	67,80	82,80	90,80
7	0	(1:2)	-1,41	4.2	46,00	65,50	89,70
8	0	(1:2)	+1,41	9.8	79,30	89,70	93,10
9	0	(1:2)	0	7	67,80	83,90	92,00
10	0	(1:2)	0	7	65,50	83,90	92,00
11	0	(1:2)	0	7	60,90	83,90	92,00

RM = Razão Molar; E = Enzima.

Analisando os dados obtidos, pôde-se perceber que com o aumento da relação molar, levando-se em conta o aumento da quantidade de álcool, a porcentagem de esterificação sofreu um acréscimo (ensaio: 1 e 2; 3 e 4). Porém, quando a quantidade de ácido oléico é maior que a quantidade de álcool (ensaio 5), houve uma queda na porcentagem de esterificação.

A mesma análise pôde ser feita em relação à concentração enzimática. Avaliando a tabela 44, observou-se que com o aumento da porcentagem de enzima, há um aumento na produção do éster (ensaio: 1 e 3; 7, 8 e 9). As tabelas 45 e 46 mostram a análise estatística e a ANOVA das reações de esterificação após 120 minutos, tempo no qual se obteve maior conversão do éster.

Tabela 45 – Análise Estatística para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Obtida de *Rhizopus* sp. em 120 Minutos de Reação

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	91,98	4,15	22,17	<0,0001	81,32	102,64
Razão Molar (L) *	14,50	5,09	2,85	0,0357	1,43	27,58
Razão Molar (Q) *	-15,75	6,07	-2,59	0,0485	-31,36	-0,15
% Enzima (L)	2,91	5,09	0,57	0,5924	-10,17	15,98
% Enzima (Q)	2,20	6,07	0,36	0,7318	-13,41	17,81
RM x % Enzima	-2,3	7,18	-0,32	0,7618	-20,77	16,17

* Significância de 95%.

Tabela 46 - ANOVA para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp. em 120 Minutos de Reação

Sp. em 120 minutos de Reação				
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	831,0	2	415,5	11,58
Resíduo	287,0	8	35,9	
Total	1118,0	10		
R ² = 76,9% F _{2;8;0,05} = 4,46				

Fazendo-se a análise das respostas após 120 minutos de reação, nota-se que apenas a variável razão molar foi estatisticamente significativa, quando o p-valor é analisado.

Avaliando o valor de $t_{\text{calculado}}$ (2,85), observa-se que seu valor é maior que o t_{student} (2,45). E, finalmente, quando se faz a análise da ANOVA, comparando o $F_{\text{calculado}}$ (11,58) nota-se que este é maior que o F_{tabelado} (4,46), concluindo-se que os valores obtidos são estatisticamente significativos.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a porcentagem de esterificação em função da razão molar, está demonstrado abaixo:

Porcentagem de esterificação = $91,98 + 14,50 \text{ razão molar} - 15,75 \text{ razão molar}^2$.

A figura 5 apresenta a superfície de respostas obtida neste experimento, utilizando a lipase *Rhizopus* sp. após 120 minutos de reação.

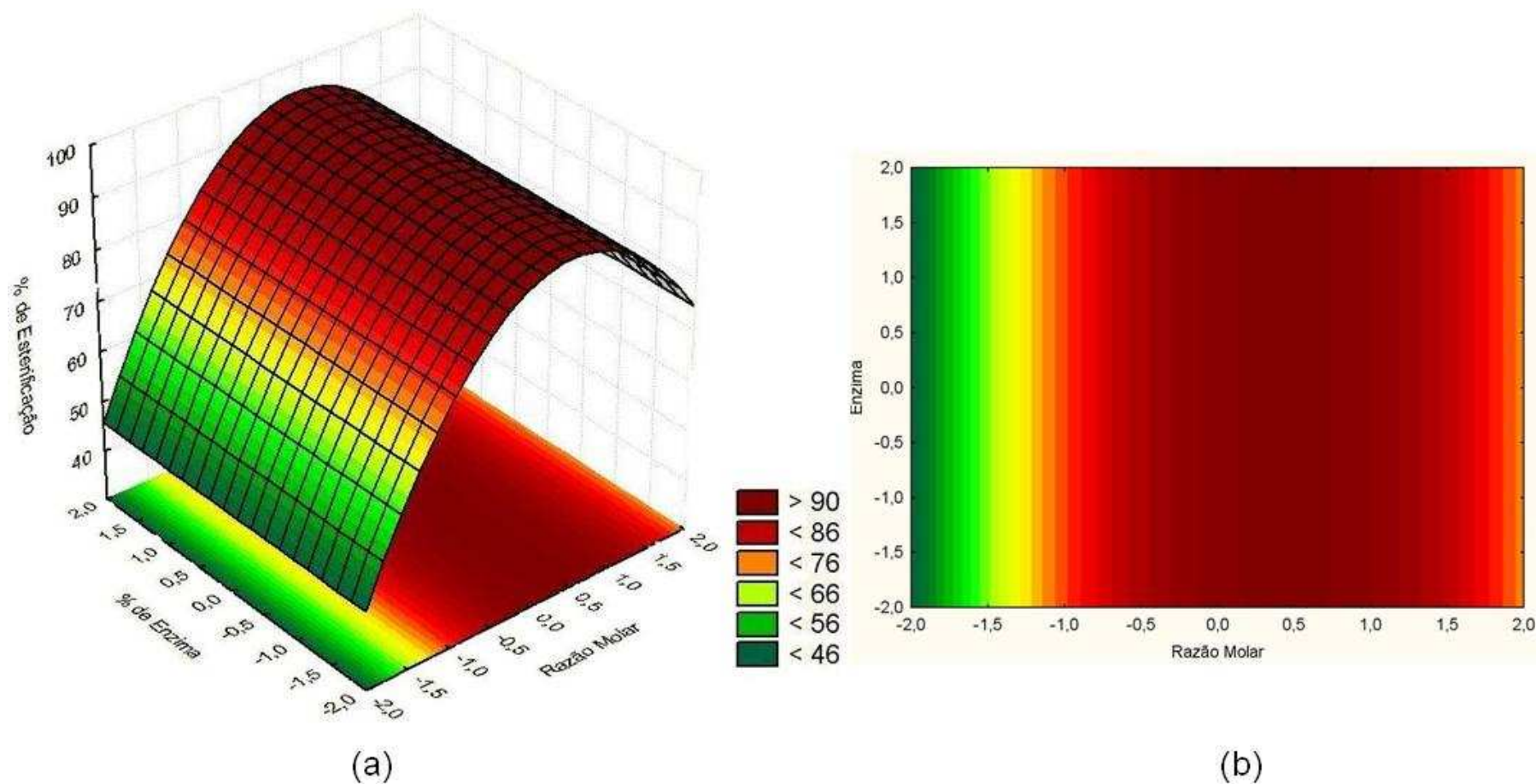


Figura 5 - Superfície de Resposta do Efeito da Relação Molar e Concentração Enzimática na Porcentagem de Esterificação de Oleato de Oleíla Após 120 Minutos de Reação Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp.

Com o intuito de comparar os resultados obtidos a partir da utilização da lipase *Rhizopus* sp. com uma lipase comercial, os mesmos parâmetros de reação foram analisados fazendo-se uso da enzima Lipozyme TL IM®. A porcentagem de esterificação foi analisada após 120 minutos de reação, tempo no qual se obteve o melhor rendimento com a enzima não-comercial (tabela 44). Os resultados alcançados nesta análise estão expostos na tabela 47.

Tabela 47 - Resultado do Planejamento Experimental Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp. e Comparando-se com o Resultado Obtido com a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®, nas mesmas condições de Reação

Ensaio	Variáveis				% Esterificação	
	RM (x ₁)		% E (m/m)(x ₂)		Lipase de Lipozyme TL IM® 120 minutos	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. 120 minutos
1	-1	(1:2)	-1	5	91,30	82,80
2	+1	(1:4)	-1	5	88,40	89,70
3	-1	(1:2)	+1	9	94,20	88,50
4	+1	(1:4)	+1	9	89,50	90,80
5	-141	(1:1,6)	0	7	93,60	56,30
6	+1,41	(1:4,4)	0	7	86,00	90,80
7	0	(1:3)	-1,41	4,2	77,90	89,70
8	0	(1:3)	+1,41	9,8	93,60	93,10
9	0	(1:3)	0	7	94,20	92,00
10	0	(1:3)	0	7	93,60	92,00
11	0	(1:3)	0	7	92,40	92,00

RM = Razão Molar; E = Enzima.

Realizando a análise dos dados obtidos, pôde-se perceber que a enzima comercial Lipozyme TL IM® apresentou porcentagem de esterificação pouco superior ao da lipase de *Rhizopus* sp. nos pontos centrais.

As tabelas 48 e 49 mostram a análise estatística e a ANOVA das reações de esterificação utilizando a lipase Lipozyme TL IM® após 120 minutos de reação.

Tabela 48 – Análise Estatística para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® em 120 Minutos de Reação

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(2)	p-valor	Lim. de Conf. -95%	Lim. de Conf. +95%
Média *	93,39	0,53	176,49	<0,0001	91,11	95,66
Razão Molar (L) *	-4,59	0,65	-7,07	0,0194	-7,38	-1,8
Razão Molar (Q)	-2,04	0,77	-2,64	0,1184	-5,37	1,29
% Enzima (L) *	6,55	0,65	10,10	0,0096	3,76	9,35
% Enzima (Q) *	-6,11	0,77	-7,90	0,0156	-9,45	-2,78
RM x % Enzima	-0,9	0,92	-0,98	0,4296	-4,84	3,04

* Significância de 95%.

Tabela 49 - ANOVA para a Porcentagem de Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® em 120 Minutos de Reação

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc.}
Regressão	174,40	3	58,13	5,78
Resíduo	70,42	7	10,06	
Falta de Ajuste	68,74	5	13,75	
Erro Puro	1,68	2		
Total	244,82	10		

R² = 74,0% F_{3;7;0,05} = 4,35

Analizando os dados estatísticos obtidos, tem-se que as variáveis: razão molar e porcentagem de enzima são significativas, como mostram

seus p-valores, que apresentaram valores abaixo do nível de 0,05 significância.

Observando-se o valor de t-calculado [t(2)] de ambas as variáveis, nota-se que tanto para a razão molar (-7,07) quanto para a porcentagem de enzima (-2,64), os valores de t foram menores que o valor do t-student (3,18).

O valor de $F_{\text{calculado}}$ (5,78) também foi maior que o valor do F_{tabelado} (4,35), demonstrando que as análises foram estatisticamente significativas.

O modelo com as variáveis codificadas que representa a porcentagem de esterificação em função da razão molar e da porcentagem de enzima está demonstrado abaixo:

Porcentagem de esterificação = $93,39 - 4,59 \text{ razão molar} - 2,04 \text{ razão molar}^2 + 6,55 \text{ porcentagem enzimática} - 6,11 \text{ porcentagem enzimática}^2$.

A figura 6 apresenta a superfície de respostas obtida neste experimento, utilizando a lipase Lipozyme TL IM® após 120 minutos de reação.

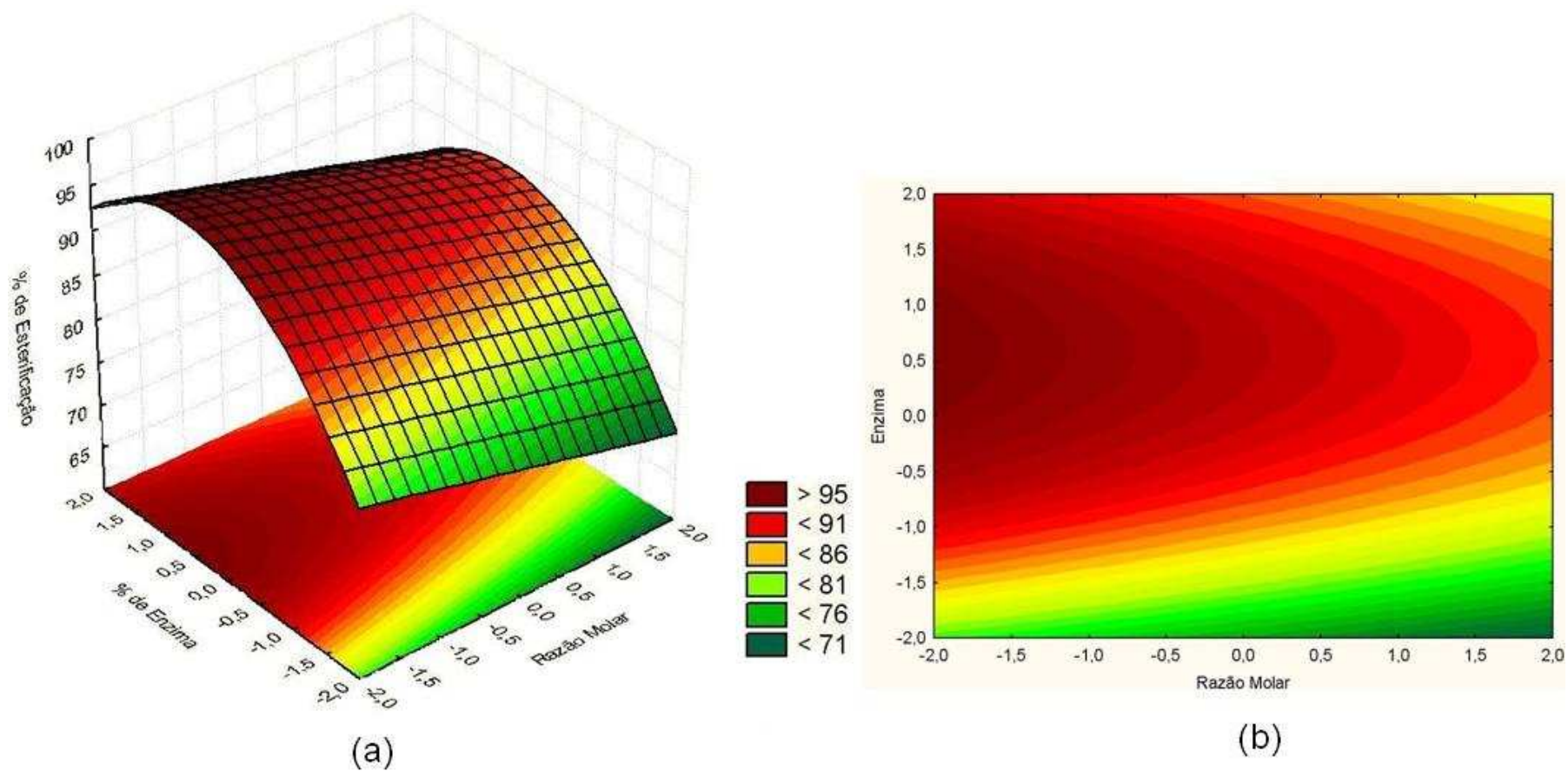


Figura 6 - Superfície de Resposta do Efeito da Relação Molar e Concentração Enzimática na Porcentagem de Esterificação de Oleato de Oleíla Após 120 Minutos de Reação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®

Comparando-se os resultados obtidos através do uso da lipase de *Rhizopus* sp. com a enzima comercial Lipozyme TL IM®, observou-se que ambas atingem porcentagens de esterificação muito próximos. É possível observar que as melhores porcentagens de esterificação obtidas com a lipase comercial Lipozyme TL IM® ocorreram nos ensaios 3 e 9, com 94,2% de esterificação para ambos. Já com a lipase de *Rhizopus* sp., o melhor rendimento obtido foi no ensaio 8, com 93,1% de esterificação após 120 minutos.

Outra análise possível de ser feita a partir dos resultados obtidos nos planejamentos experimentais é que grandes excessos de ácido oléico ou álcool oleílico diminuem a porcentagem de esterificação. É o que mostram os resultados obtidos no ensaio 5 quando se faz uso da lipase de *Rhizopus* sp., e no ensaio 6 utilizando a enzima comercial Lipozyme TL IM®, respectivamente.

E como último estudo a partir dos dados obtidos, foi feito o cálculo do rendimento teórico da produção do éster oleato de oleíla pela enzima obtida de *Rhizopus* sp. e pela enzima comercial Lipozyme TL IM®. Os resultados obtidos foram expostos na tabela 50.

Tabela 50 - Rendimentos Teóricos da Produção de Oleato de Oleíla pela Lipase de *Rhizopus* sp. e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM®

Lipases	Rendimentos Teóricos			
	Produto/Proteína (g éster/ug de proteína)	Produto/ Enzima (g éster/g enzima)	Produto/Te mpo (g éster/hora)	Produto/ Atividade Enzimática (g éster/(mmol/g /min))
<i>Rhizopus</i> sp.	62,6	6,4	0,5	0,0007
Lipozyme TL IM®	695,5	6,8	1,0	0,0008

Os valores dos rendimentos teóricos mostram que considerando o rendimento teórico por grama de proteína, a lipase comercial apresenta um rendimento onze vezes maior do que o obtido com a lipase de *Rhizopus* sp. Isto ocorre, pois a enzima não comercial não está purificada, apresentando uma grande possibilidade de alcançar rendimentos bem próximos ao da enzima comercial se for purificada. Quando se compara os rendimentos teóricos levando-se em conta a quantidade de enzima, obtêm-se valores bem próximos entre a enzima comercial e a lipase de *Rhizopus* sp. Já os rendimentos considerando-se o tempo, têm-se que a lipase comercial Lipozyme TL IM® apresenta um rendimento teórico duas vezes maior do que a lipase não comercial na forma bruta. E ao comparar os rendimentos considerando-se atividade enzimática, nota-se que a lipase comercial Lipozyme TL IM® apresenta um rendimento teórico ligeiramente maior.

Pode-se concluir a análise dos resultados obtidos com a lipase de *Rhizopus* sp. afirmando que a mesma possui habilidade de esterificar o ácido oléico juntamente com o álcool oleílico obtendo-se resultados bastante satisfatórios. Em termos de produtividade, a condição central também parece bastante interessante, pois utilizando-se 7% de enzima, foi possível obter um rendimento de 92%, valor bem próximo ao encontrado no ensaio 8 (93,1%), porém empregando-se uma menor quantidade de enzima, o que, sem dúvida, é bastante atraente do ponto de vista econômico.

2.3. Cinética de Reação

Os resultados obtidos neste estudo com as lipases de *Rhizopus* sp. e a lipase comercial Lipozyme TL IM® estão apresentados na tabela 51. A figura 7 mostra o gráfico da cinética enzimática de ambas as enzimas.

Tabela 51 - Cinética Enzimática da Síntese de Oleato de Oleíla Utilizando a Lipase Obtida de *Rhizopus* sp. e a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® a 40°C

Ensaio	Tempo (h)	<i>Rhizopus</i> sp.			Lipozyme TL IM®		
		RM	% Enzima	% Esterificação	RM	% Enzima	% Esterificação
1	1	(1:2)	9,8	82,4	(1:3)	7	87,2
2	2	(1:2)	9,8	91,6	(1:3)	7	94,2
3	3	(1:2)	9,8	94,2	(1:3)	7	95,9
4	4	(1:2)	9,8	96,7	(1:3)	7	95,9

RM = Razão Molar.

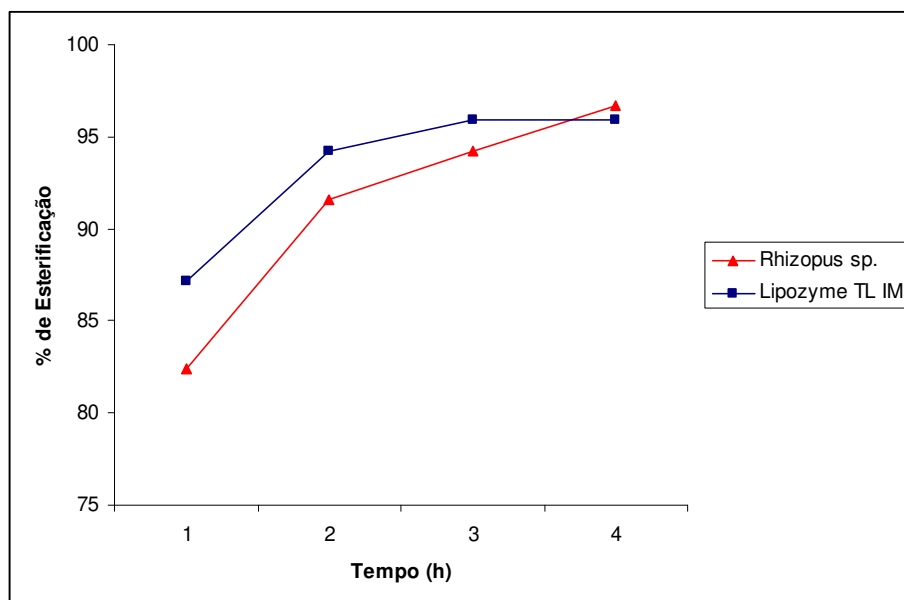


Figura 7 - Cinética Enzimática Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp. e a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® para a Produção de Oleato de Oleíla a 40°C

Ao observar a tabela 51, nota-se que a produção do oleato de oleíla continua aumentando após 2 horas de reação, e que em 4 horas de esterificação a lipase de *Rhizopus* sp. é capaz de sintetizar 96,7% de conversão do éster.

Porém, analisando a cinética de reação da lipase comercial Lipozyme TL IM®, nota-se que a máxima produção do éster é obtida a partir de 3 horas de esterificação, atingindo um rendimento de 95,9%. Após este período, os níveis de produção do éster se mantêm constantes.

2.4. Efeito da Concentração de Água no Sistema de Síntese

As tabelas 52 e 53 apresentam os resultados obtidos com a adição de até 40% de peneira molecular em relação à massa total do sistema, para a retirada da água da reação de esterificação do oleato de oleíla.

A tabela 54 apresenta a porcentagem de água inicial dos sistemas de reação, antes da esterificação.

Analisando-se os dados, pôde-se observar que, neste caso, houve uma pequena alteração na produção do éster após a adição do material dessecante no sistema de reação. Com a adição de até 20% de peneira molecular foi possível perceber um aumento na porcentagem de esterificação, o que permitiu a conclusão de que esta quantidade de água retirada estava prejudicando o equilíbrio da reação, inibindo uma pequena porcentagem de esterificação. Porém, com a adição de 30% de peneira molecular notou-se uma diminuição na produção do éster. Isto porque as

enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter sua atividade em seu estado conformacional tridimensional. A água contribui para a integridade estrutural da enzima. Desta forma, quando a água foi retirada do sistema, restando uma porcentagem de água menor que 1%, a produção do éster diminuiu, obtendo-se o mesmo resultado da esterificação sem a retirada de água do sistema.

Tabela 52 – Estudo da Influência da Quantidade de Água na Taxa de Conversão do Éster Utilizando a Lipase de *Rhizopus* sp. após 120 minutos de reação

Quantidade de Peneira Molecular (% da massa total do sistema)	% de Água no Sistema	% de Esterificação
0	1,42 ± 0,60	91,00 ± 0,15 ^{b*}
10	1,03 ± 0,10	92,10 ± 0,92 ^a
20	1,02 ± 0,15	93,20 ± 0,95 ^a
30	0,79 ± 0,05	91,00 ± 0,55 ^a
40	0,88 ± 0,00	91,00 ± 0,64 ^a

* Teste de Tukey, 95% (Médias seguidas da mesma letra não são consideradas estatisticamente diferentes).

Tabela 53 – Estudo da Influência da Quantidade de Água na Taxa de Conversão do Éster Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM® após 120 minutos de reação

Quantidade de Peneira Molecular (% da massa total do sistema)	% de Água no Sistema	% de Esterificação
0	0,36 ± 0,01	94,30 ± 0,60 ^{b*}
10	0,25 ± 0,05	95,50 ± 0,12 ^a
20	0,25 ± 0,10	95,50 ± 0,45 ^a
30	0,23 ± 0,00	95,50 ± 0,30 ^a
40	0,21 ± 0,05	95,50 ± 0,15 ^a

* Teste de Tukey, 95% (Médias seguidas da mesma letra não são consideradas estatisticamente diferentes).

Tabela 54 - Quantidade de Água nos Sistemas antes de ocorrer Esterificação.

Sistemas	% de Água
Sistema sem Lipase	0,17 ± 0,00
Sistema com Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	0,49 ± 0,10
Sistema com Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	0,36 ± 0,12

Após a análise estatística dos dados obtidos nas tabelas 52 e 53 para o efeito da quantidade de água na taxa de conversão do oleato de oleíla, utilizando o teste de Tukey, pôde-se perceber que a adição de peneira molecular no sistema de reação apresentou um efeito significativo no rendimento da reação. Porém, a variação da quantidade de peneira molecular que foi adicionada ao sistema não foi significativa, tornando-se possível a conclusão de que deve-se acrescentar peneira molecular ao sistema de reação, entretanto apenas 10% da massa total do sistema já são suficientes para se adquirir um aumento na produção do éster, sendo desnecessária a adição de maior quantidade de peneira molecular.

Fonteyn e colaboradores (1994), utilizaram peneira molecular na otimização da síntese de acetato de citronelila em meio livre de solvente, obtendo um aumento de 10% no rendimento da síntese.

Em uma reação de esterificação catalisada pela lipase comercial Lipozyme® em n-hexano, Castro e colaboradores (1992), adotaram 3 estratégias para remoção de água do sistema: por jato de ar diretamente na enzima, por lavagem com acetona seguida de jato de ar e por adição de peneira molecular. Todas as três estratégias resultaram em um conteúdo residual de água semelhante. Enquanto a peneira molecular reduziu o conteúdo de água, a água formada durante a reação foi incorporada à enzima enquanto foi formada, tendo pouco efeito na conversão do produto.

Um declínio na produção foi relatado para a reação de esterificação quando o período de contato da peneira molecular com a enzima foi longo.

2.5. Métodos Analíticos

2.5.1. Identificação dos Compostos Obtidos Utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O resultado obtido utilizando cromatografia em camada delgada pode ser observado na figura 8.

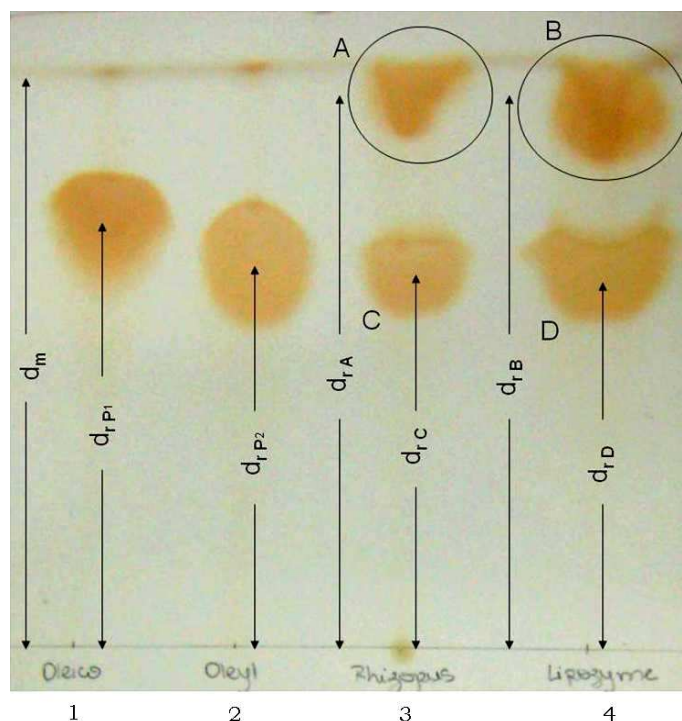


Figura 8 - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Reação de Ácido Oléico com Álcool Oleílico em Meio Livre de Solvente

Onde:

d_m = distância percorrida pelo solvente (fase móvel);

d_r = distância de retenção do soluto (componente da amostra).

As linhas 1 e 2 da figura correspondem ao ácido oléico e álcool oleílico puros, respectivamente. Já as linhas 3 e 4 correspondem ao éster oleato de oleíla produzido pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, respectivamente.

A e B são os ésteres de oleato de oleíla produzidos pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, respectivamente, nas condições ótimas de reação definida neste trabalho.

C e D são resíduos de álcool oleílico contidos no produto de esterificação utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. e a lipase comercial Lipozyme TL IM®, respectivamente.

Após esta análise foram calculados os fatores de retenção, através da equação 4:

$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

(4)

Os valores para as distâncias percorridas foram: $d_m = 8,1\text{cm}$; $d_{r_{P1}} = 5,9\text{cm}$; $d_{r_{P2}} = 5,3\text{cm}$; $d_{r_A} = 7,3\text{cm}$; $d_{r_B} = 7,6\text{cm}$; $d_{r_C} = 5,4\text{cm}$; $d_{r_D} = 5,4\text{cm}$.

Os valores de R_f obtidos foram: 0,73 e 0,65 para os padrões de ácido oléico (P₁) e álcool oleílico (P₂); 0,90 e 0,94 para os ésteres obtidos com o uso da lipase de *Rhizopus* sp.(A) e utilizando a lipase comercial Lipozyme TL IM[®] (B); 0,64 para ambos os resíduos (C) e (D).

Pôde-se notar que nas amostras dos ésteres ainda há resíduo de álcool oleílico (Figura 8), indicados pelas letras C e D. Esta conclusão foi feita devido ao R_f obtido ser bem próximo ao R_f do padrão do álcool oleílico e não do ácido.

O álcool oleílico e o ácido oléico apresentam graus de polaridade mais elevados quando comparados aos ésteres produzidos e desta forma foram absorvidos mais rapidamente pela fase estacionária do que os ésteres obtidos na esterificação, gastando menos tempo na fase móvel e, portanto, movendo-se pela fase estacionária mais lentamente.

2.5.2. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massa para a Identificação do Éster

O éster obtido nas condições reacionais otimizadas foi analisado no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa Shimadzu QP2010S. As figuras 9 e 10 mostram os resultados obtidos utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. e a lipase comercial Lipozyme TL IM[®], respectivamente.

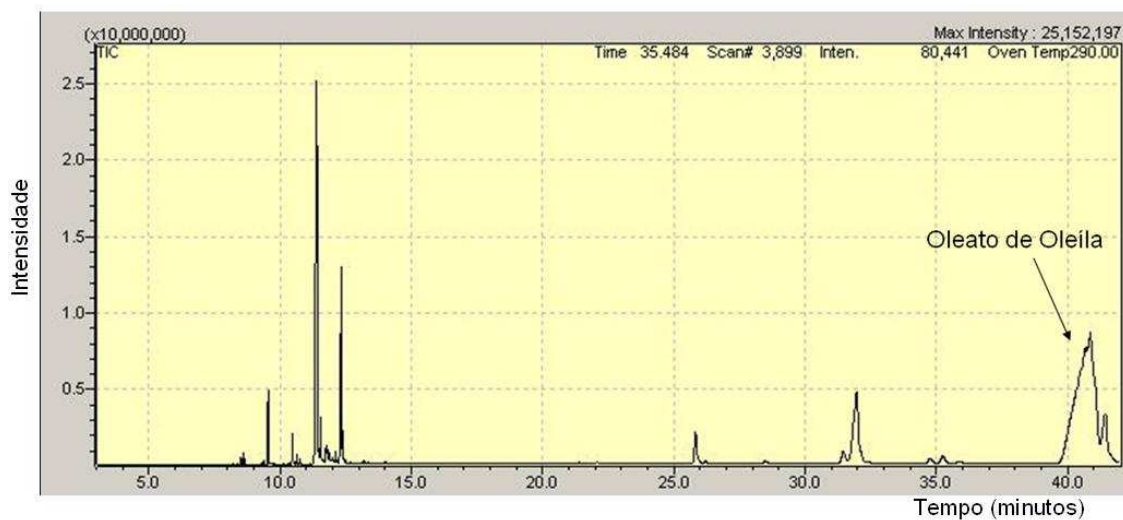


Figura 9 - Cromatograma do Êster Obtido Através da Esterificação Utilizando Lipase de *Rhizopus* sp.

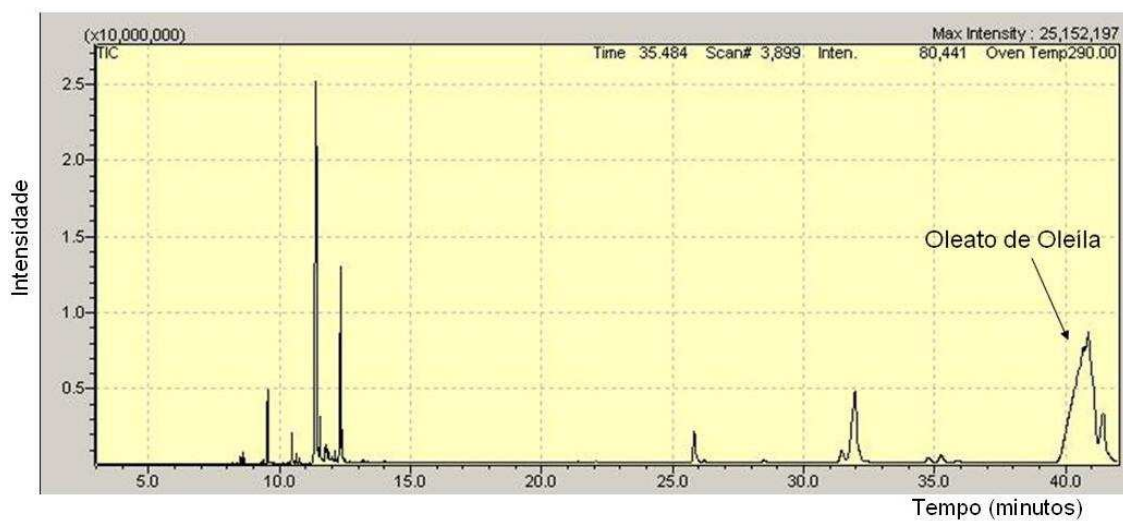


Figura 10 - Cromatograma do Êster Obtido Através da Esterificação Utilizando a Lipase Comercial Lipozyme TL IM®

A identificação do oleato de oleíla nos cromatogramas acima foi realizada através de comparação com os dados contidos na biblioteca NIST 05 (*National Institute of Standard and Technology*), onde o pico do éster é formado após 40 minutos de corrida cromatográfica. Os demais picos não foram identificados, pois não apresentavam interesse neste trabalho.

Capítulo III – Determinação das Propriedades do Oleato de Oleíla

Neste capítulo é apresentado o estudo da caracterização do éster a partir de testes como atividade emulsificante e atividade antimicrobiana.

Sendo o oleato de oleíla um possível substituto do óleo de Jojoba (cera líquida) e tendo este aplicações como: lubrificantes, substituto do óleo de baleia, componente de óleo para cabelo, xampu, sabonete, creme facial e óleo para bronzear; revestimento para algumas preparações medicinais, estabilizador de penicilinas, inibidor do crescimento do bacilo da tuberculose, tratamento de erupções da pele e restaurador de cabelo, dentre outras; decidiu-se testar as características de emulsificante e potencial antimicrobiano do éster oleato de oleíla obtido pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM®.

1. Materiais e Métodos

1.1. Atividade Emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada segundo metodologia descrita por Johnson e colaboradores (1992). O ensaio foi realizado utilizando 3,5mL de solução de éster ou outro emulsificante (SDS e Tween

80) em água (na proporção 3:4); adicionado de 2,0mL do substrato a ser emulsificado (gasolina, hexano e óleo de milho). Esta mistura foi agitada em vórtex a 700rpm por 1 minuto. Após 60 minutos de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro a 610nm e ao final de 24 horas, a relação entre a altura total de óleo e a altura de óleo emulsificado, sendo esta a atividade emulsificante água/óleo (Broderick & Cooney, s/d).

A atividade emulsificante água em óleo ($AE_{w/o}$) foi definida como o volume de éster necessário para manter estável por 24 horas a emulsão de 1% da fase hidrofóbica, expressa em Unidade Emulsificante por mL de meio fermentado ($UE.mL^{-1}$). A atividade emulsificante óleo em água ($AE_{o/w}$) é expressa em Unidades Emulsificantes ($UE.mL^{-1}$) definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1,0 a 610nm, quando comparado com o branco.

Os valores de atividades emulsificantes (água em óleo e óleo em água), foram definidos pelas equações 5 e 6:

$$AE_{w/o} = \frac{E \times D}{[v(1 - U)]} \quad (5)$$

$$AE_{o/w} = \frac{Abs \times D}{[v(1 - U)]} \quad (6)$$

Onde:

$AE_{w/o}$ = atividade emulsificante água em óleo (UE/g);

$AE_{o/w}$ = atividade emulsificante óleo em água (UE/g);

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total;

Abs = absorbância da suspensão do óleo em água à 610nm;

D = diluição da amostra em água;

v = volume da amostra (mL);

U = umidade do meio fermentado.

1.2. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do éster oleato de oleíla foi verificada, em virtude do óleo de jojoba apresentar atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos, como citado na literatura. Para isto, utilizou-se o microrganismo *Bacillus subtilis*, uma das bactérias mais amplamente estudadas, essencialmente em razão de sua sensibilidade (Hoch, 1991). É o melhor membro caracterizado de bactérias gram positivas, aeróbia, formadora de endosporos e comumente encontrada no solo, fontes de água e em associação com plantas (Harwood, 1992).

Os testes, tanto com o éster produzido pela lipase de *Rhizopus* sp. quanto o éster produzido pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, em ambos os métodos, foram feitos em triplicata e, em cada placa, foram aplicadas 3 amostras do éster e 3 amostras do antibiótico cloranfenicol como padrão.

A atividade antimicrobiana do éster foi testada contra a bactéria *Bacillus Subtilis* por dois métodos. O primeiro foi o método de difusão em ágar, método atualmente recomendados pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), 2003, para testes de sensibilidade por disco-difusão. O segundo foi utilizando o método do cilindro-placa (Pharmacopeia/USP 24 – NF 19).

1.2.1. Método de Difusão em Ágar

Para a execução deste teste foi utilizado ágar Müeller-Hinton, da marca Oxoid, como meio de cultura. Após o preparo do meio, este foi despejado em placas de petri de fundo chato, garantindo uma profundidade uniforme de 4mm.

Discos contendo o éster, bem como discos controle contendo o antibiótico cloranfenicol (62,5µg/mL) foram testados.

O método de crescimento foi realizado selecionando-se pelo menos de 3 a 5 colônias, bem isoladas, do mesmo tipo morfológico. A superfície de cada colônia é tocada com uma alça e os microrganismos são transferidos para um tubo contendo 4,5mL de um meio de cultura adequado, como o ágar Müeller-Hinton. A cultura é então incubada em caldo, a 35°C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (em geral de 2 a 6 horas), como descrita pela NCCLS. A absorbância da solução padrão de McFarland a 0,5 deve variar de 0,08 a 0,10, utilizando um comprimento de onda de 625nm.

A turbidez da cultura em crescimento é ajustada com solução salina estéril (0,85%), de modo a obter uma turbidez ótica comparável à da solução padrão de McFarland a 0,5. Isso resulta numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922. Para a realização dessa etapa utilizou-se um espectrofotômetro.

Para a inoculação das placas de testes, em condições ideais, mergulhou-se um *swab* de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. A superfície seca da placa de ágar Mueller-Hinton foi inoculada esfregando o *swab* em toda a superfície estéril do ágar. A tampa foi deixada entreaberta de 3 a 5 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes de se aplicar os discos impregnados.

Um conjunto de seis discos de papel filtro (Whatman nº3, diâmetro 0,5cm) foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada. Cada disco, já embebido com o éster, foi posicionado de encontro à placa de maneira a assegurar contato completo com a superfície de ágar. Os discos foram distribuídos por igual. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa a 35°C, até 15 minutos após a aplicação dos discos.

As placas foram examinadas após 16-18 horas de incubação. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu. O crescimento de pequenas colônias, detectáveis apenas com lente de aumento, na margem do halo de inibição do crescimento foi ignorado.

1.2.2. Método do Cilindro-Placa

A preparação do inóculo para esta metodologia foi realizada da mesma maneira utilizada na técnica anterior.

Neste teste foi utilizada a técnica de “pour plate”, na qual a inoculação do ágar foi feita antes da sua solidificação (no entanto, após a retirada do meio da autoclave foi necessário deixá-lo esfriar até 45°C). Nesta técnica, o meio de cultura arrefecido, mas ainda líquido, foi misturado com o inóculo de bactérias e posteriormente vertido em placas de petri e incubado. Desta maneira, as colônias podem desenvolver-se por todo o meio.

A aplicação foi realizada da mesma maneira feita na técnica anterior, entretanto, ao invés de serem utilizados discos de papel filtro, foram colocados cilindros metálicos nas placas de petri com ágar já inoculadas, como mostra a figura 11. Após a aplicação dos cilindros, 100µL da solução de éster ou do antibiótico foram injetados dentro dos respectivos cilindros.

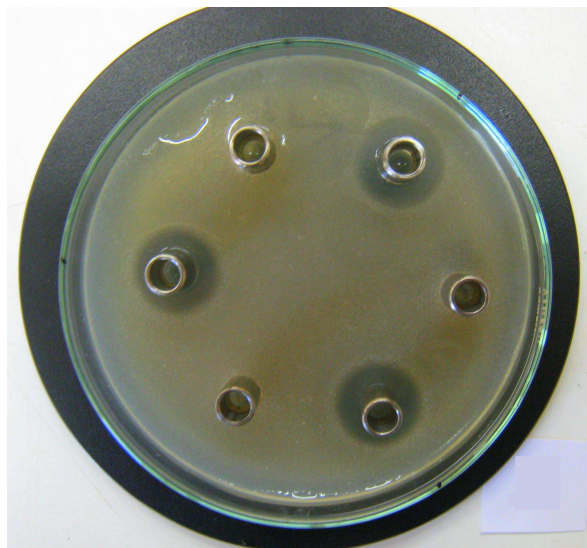


Figura 11 - Placa de Petri com Cilindros Metálicos

As placas foram examinadas, da mesma maneira utilizada na técnica anterior. Entretanto, para observar os halos formados e interpretar os resultados, todos os cilindros metálicos foram retirados após o tempo de incubação pré-determinado (16-18 horas).

2. Resultados e Discussão

2.1. Atividade Emulsificante

A capacidade emulsificante do éster oleato de oleíla foi testada, segundo metodologia descrita anteriormente. Os valores de E e das

absorbâncias à 610nm obtidos estão expostos na tabela 55. O volume das amostras foi de 5,5mL, com diluição de 1,2 vezes e umidade de 55,5%.

Tabela 55 - Valores para os Cálculos da Relação Centesimal entre a Altura da Emulsão e a Altura Total da Amostra

Substrato + Emulsificante	Altura da Emulsão em 1 hora (cm)	Altura da Emulsão em 24 horas (cm)	Altura Total (cm)	E		Absorbância	
				1 hora	24 horas	1 hora	24 horas
Gasolina							
SDS	1,3	0,9	3,6	36,11	25,00	0,5259	13,112
Tween 80	3,8	3,8	3,8	100,00	100,00	0,3000	0,5731
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	3,3	0,5	3,6	91,67	13,90	0,6326	0,7317
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	2,7	0,3	3,7	72,97	8,1	0,4119	0,7705
Hexano							
SDS	1,9	1,0	3,8	50,00	26,31	13,723	0,0400
Tween 80	2,7	2,7	3,7	72,97	72,97	0,0096	0,2689
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	0,2	0,2	3,9	5,13	5,13	22,616	10,619
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	0	0	3,2	0	0	0,9289	0,0048
Milho							
SDS	0,1	0,1	3,8	2,63	2,63	0,1855	0,4526
Tween 80	3,0	2,7	3,8	78,95	71,05	0,6227	10,027
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	0,4	0,1	3,8	10,53	2,63	13,768	15,218
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	0,4	0,2	3,8	10,53	5,26	14,441	14,889

Os resultados obtidos para as atividades emulsificantes estão apresentados na tabela 56 e expostos nas figuras 12 a 14.

Tabela 56 - Resultados Obtidos de Atividade Emulsificante				
Substrato + Emulsificante	AE _{w/o}		AE _{o/w}	
	1 hora	24 horas	1 hora	24 horas
Gasolina				
SDS	17,70	12,26	0,2578	0,6429
Tween 80	49,03	49,03	0,1471	0,2810
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	44,95	6,82	0,3102	0,3587
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	35,78	3,97	0,2020	0,3778
Hexano				
SDS	24,52	12,90	0,6728	0,0196
Tween 80	35,78	35,78	0,0047	0,1318
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	2,52	2,52	11,089	0,5206
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	0,00	0,00	0,4554	0,0024
Óleo de Milho				
SDS	1,29	1,29	0,0909	0,2219
Tween 80	38,71	34,84	0,3053	0,4916
Lipase de <i>Rhizopus</i> sp.	5,16	1,29	0,6750	0,7461
Lipase Comercial Lipozyme TL IM®	5,16	2,58	0,7080	0,7300

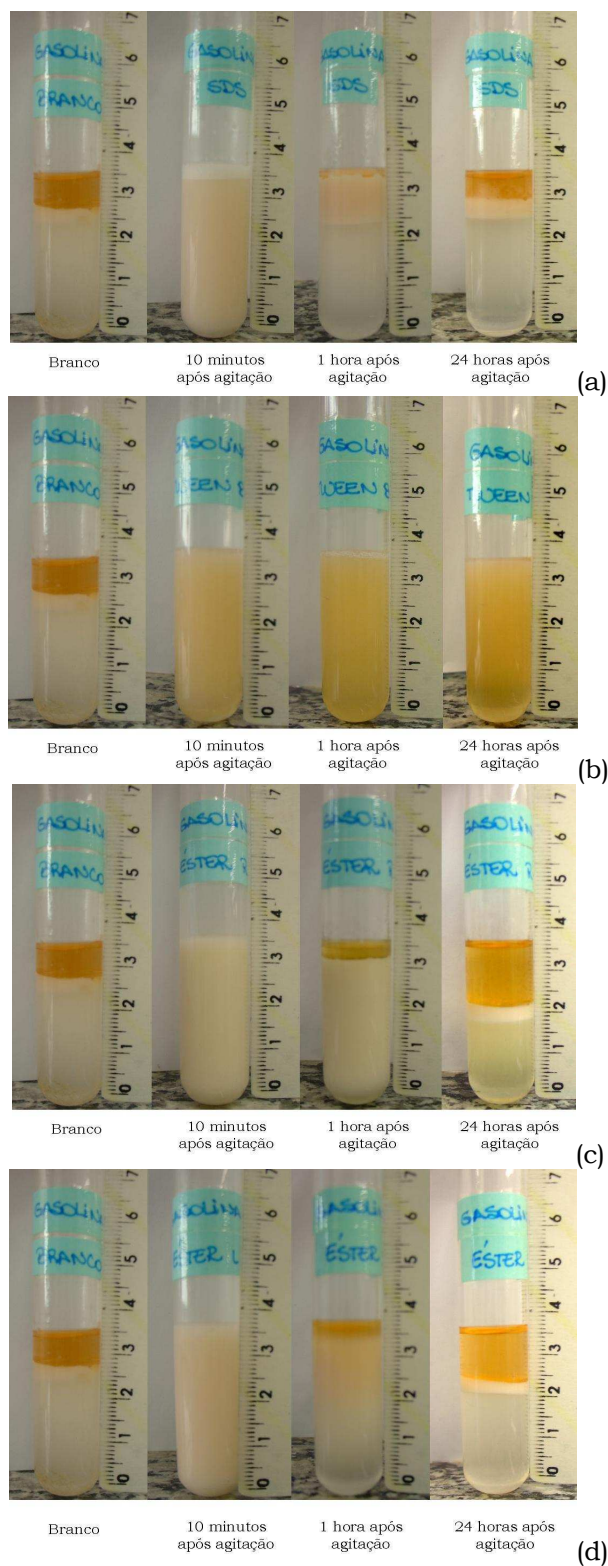


Figura 12 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Gasolina como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleíla Produzido por Lipase de *Rhizopus* sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d)

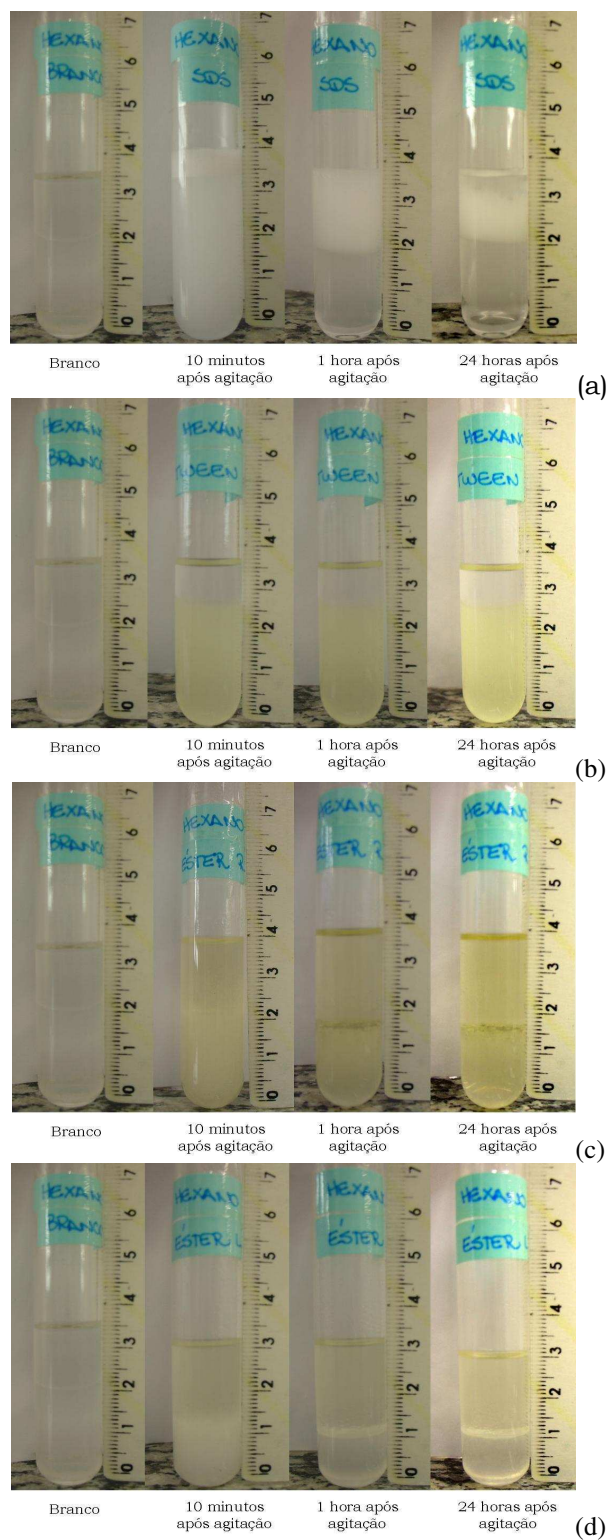


Figura 13 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Hexano como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleila Produzido por Lipase de *Rhizopus* sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d).

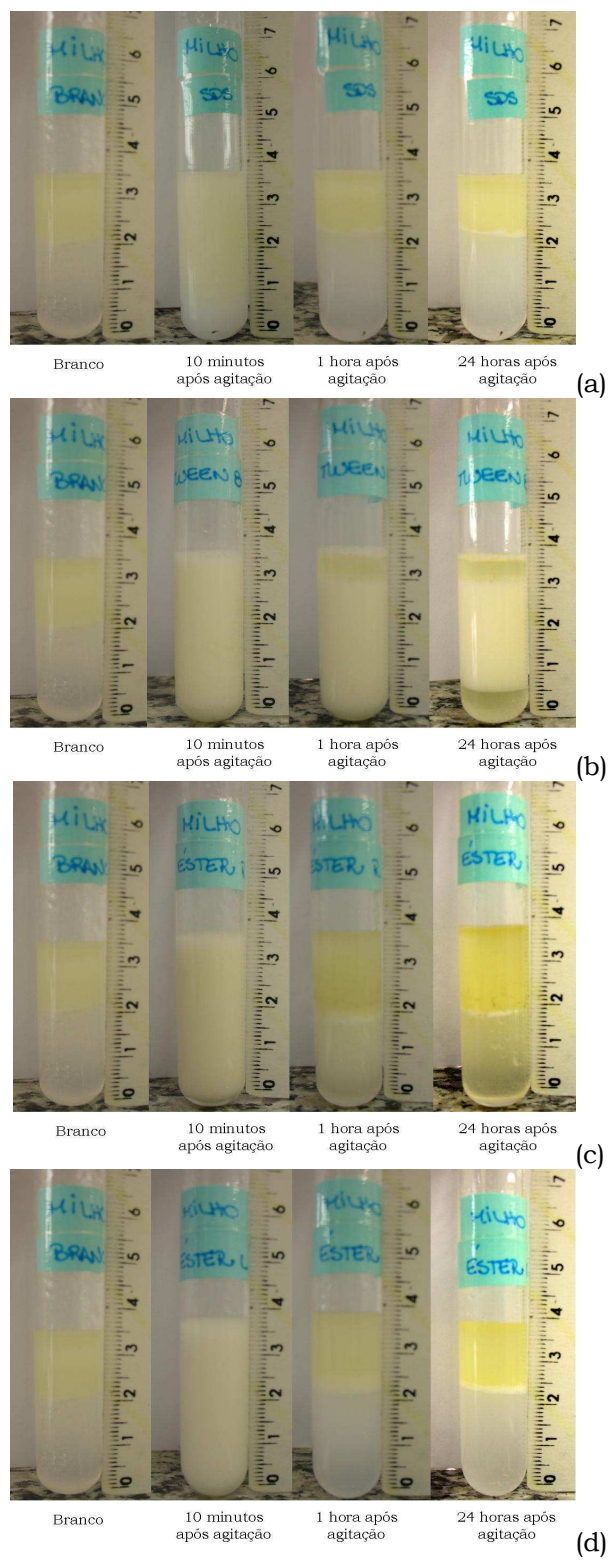


Figura 14 - Testes para Atividade Emulsificante Utilizando Hexano como Substrato e SDS (a), Tween 80 (b) e Oleato de Oleila Produzido por Lipase de *Rhizopus* sp. (c) e pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM® (d)

Analisando os resultados obtidos, pôde-se perceber que as emulsões formadas pelos ésteres oleato de oleíla, tanto produzidos utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. quanto utilizando a lipase comercial Lipozyme TL IM® não formaram emulsões muito estáveis. Porém, o éster produzido pela lipase de *Rhizopus* sp. apresentou melhor característica emulsificante do que o mesmo éster produzido pela enzima comercial Lipozyme TL IM®, possivelmente devido às diferenças na estrutura das moléculas. A melhor emulsão formada pelo éster foi utilizando gasolina como substrato e em seguida o óleo de milho.

Comparando com os emulsificantes comerciais, o Tween 80 foi o que melhor emulsificou a gasolina, o hexano e o óleo de milho, formando emulsões bastante estáveis em 24 horas, sendo que com a gasolina formou a emulsão mais estável.

5.2. Atividade Antimicrobiana

Os resultados obtidos utilizando o método de difusão em ágar e o método do cilindro-placa, tanto para o éster produzido pela lipase de *Rhizopus* sp. quanto o éster produzido pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, estão demonstrados nas figuras 15 e 16.



Figura 15 - Estudo da Atividade Antimicrobiana com Êster Produzido pela Lipase Comercial Lipozyme TL IM®, Utilizando Discos de Papel de Filtro e Cilindros de Metal



Figura 16 - Estudo da Atividade Antimicrobiana com Êster Produzido pela Lipase de *Rhizopus* sp., Utilizando Discos de Papel de Filtro e Cilindros de Metal

Analisando os resultados obtidos, observou-se que não houve formação de halo de inibição na presença dos ésteres produzidos por

ambas as lipases (E). O halo de inibição foi formado apenas quando empregado o antibiótico cloranfenicol (A). Isto ocorreu tanto no método de difusão em discos quanto na metodologia utilizando cilindro-placa. Com isto, concluiu-se que o oleato de oleíla obtidos pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM® não apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *Bacillus subtilis*.

Por esta bactéria apresentar bastante sensibilidade a diversos produtos, e pelo éster não ter sido capaz de inibir seu crescimento, nenhuma outra bactéria ou fungo foi utilizado para o teste de atividade antimicrobiana.

Desta maneira, foi concluído que, provavelmente, outro constituinte do óleo de jojoba seja o responsável pela característica antimicrobiana que ele apresenta, ou então, isto ocorreu devido ao éster estar em sua forma bruta e, portanto, podendo estar abaixo da concentração inibitória mínima, e por isso não apresentar atividade antimicrobiana.

6. Conclusões Finais

A lipase de *Rhizopus* sp. foi a enzima com maior habilidade de esterificação entre as enzimas estudadas (*Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp. n°1068, Mamona, Pinhão Manso e *Aspergillus parasiticus*) e, por esta razão, foi escolhida para a síntese do éster oleato de oleíla.

Esta enzima bruta apresentou excelente capacidade de catalisar a esterificação do éster, podendo seu desempenho ser comparado ao da lipase comercial Lipozyme TL IM® pura e imobilizada.

Como os resultados obtidos com e sem a utilização de solvente orgânico foram semelhantes, recomenda-se a produção do éster sem o uso do solvente orgânico, promovendo-se assim, uma diminuição nos custos da produção e também problemas ambientais e de purificação.

A taxa de conversão do éster foi maior quando se utilizou maior proporção do álcool (2:1) e maior concentração de enzima (entre 7% e 9,8% (m/m) em relação à massa de reagentes). A adição de 10% (m/m) em relação à massa de reagentes, de peneira molecular também contribuiu para o aumento da produção do éster de forma significativa.

Os valores de rendimento teórico obtidos na produção de oleato de oleíla pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, quando considerado o rendimento por grama de enzima, foram bem próximos, sendo 6,4g de éster/g de enzima para a lipase de *Rhizopus* sp. e 6,8g de éster/g de enzima para a lipase comercial Lipozyme TL IM®. Isto demonstra que se a lipase de *Rhizopus* sp. for purificada, este rendimento

pode aumentar ainda mais, sendo esta enzima bastante promissora para a produção deste éster.

Assim, pode-se concluir que a produção de oleato de oleíla por *Rhizopus* sp. é similar à produção pela lipase comercial Lipozyme TL IM®, sendo a grande diferença entre as duas enzimas seu grau de purificação.

O éster oleato de oleíla produzido neste trabalho manifestou atividade emulsificante, porém em menores proporções quando comparada aos emulsificantes comerciais Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Tween 80. Outra observação que pôde ser feita foi a melhor característica emulsificante do éster produzido pela lipase de *Rhizopus* sp. do que pela enzima comercial Lipozyme TL IM®. Provavelmente isto ocorreu pois, apesar de ambas produzirem o mesmo composto, este pode apresentar diferenças em sua estrutura química, podendo promover diferenças em suas propriedades, como esta, observada em relação à atividade emulsificante.

Além disso, o éster produzido não demonstrou ser um bom inibidor da atividade microbiana de *Bacillus subtilis*. A partir deste resultado, pôde-se supor que o éster, por não estar purificado, poderia estar bastante diluído e por isso não ter apresentado atividade ou realmente não apresentar atividade antimicrobiana, sendo algum outro componente do óleo de jojoba o responsável por este efeito.

Embora o éster não tenha apresentado atividade antimicrobiana, é um produto de alto valor agregado no mercado, com atividade emulsificante promissora. Desta forma, conclui-se que a obtenção deste éster por lipase de *Rhizopus* sp. é um processo promissor que pode ser escalonado para obtenção comercial.

7. Sugestões para Trabalhos Futuros

Como continuidade do trabalho, seria interessante tentar imobilizar a lipase *Rhizopus* sp. e utilizá-la em testes comparativos com os obtidos neste trabalho, com a finalidade de reduzir os custos.

Seria interessante também quantificar o oleato de oleíla produzido, purificá-lo e elucidar a estrutura química do éster obtido pela lipase de *Rhizopus* sp. e pela lipase comercial Lipozyme TL IM[®], assim como compará-lo com o óleo de jojoba em si.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp.. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.

ADLERCREUTZ, P. Modes of using enzymes in organic media. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (Ed.). *Enzymatic Reactions in Organic Media*. 1. ed. London: St Edimburg Press, 1996. p. 9-42.

AKOH, C. C.; COOPER, C.; NWOSU, C. V. Lipase G-catalysed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 69, n. 9, p. 257-260, 1992.

ARACIL, J.; VICENTE, M.; MARTINEZ, M.; POULINA, M. Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters. *Journal of Biotechnology*, n. 124, p. 213-223, 2006.

BALLESTEROS, A.; BORNSCHEUER, A. C.; CAPAWELL, A.; COMBES, D.; CONDORET, J. S.; KOENIG, K.; KOLISIS, F. N.; MARTY, A.; MEGE, U.; SCHEPER, T.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Review article enzymes in non-conventional phases. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 13, n. 1, p. 1-42, 1995.

BHATIA, V. K.; CHAUDHRY, A.; SIVASANKARAN, G. A.; BISHT, R. P. S.; KASHYAP, M. Modification of jojoba oil for lubricant formulations. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 67, n. 1, p. 1-7, 1990.

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

BRODERICK, L. S.; COONEY, J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. Contribution n°1149, *Center for Environmental and Estuarine Studies of the University of Maryland*. 8, s/d.

BUCHNER H. Die Bedeutung der aktiven löslichen zellprodukte für den chemismus der zelle. *Münchener, Medizinische Wochenschrift*, vol. 44, n. 12, p. 299-302, 321-322, 1897.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Geotrichum* sp. Using Factorial Design. *Bioresource Technology*, vol. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

BUSSON-BREYSSE, FARINES, J. M.; SOULIER, J. Jojoba Wax: Its Esters and Some of Its Minor Components. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 71, n. 9, p. 999-1002, 1994.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003. 207 p.

CHIANG, W. D.; CHANG, S. W.; SHIEH, C. J. Studies on the optimized lipase-catalysed biosynthesis of *cis*-3-hexen-1-yl acetate in *n*-hexane. *Process Biochemistry*, vol. 38, p. 1193-1199, 2003.

COSTA, M.C. PASTORE, G. M. Produção, purificação e caracterização da lipase de *Aspergillus* sp. 108 páginas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

COSTA, V.R.S.; PASTORE, G. M. Produção, purificação e caracterização bioquímica de uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. 90 páginas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

DE CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; LEGGE, R. L.; MOO-YOUNG, M. Process development for production of terpene esters using immobilized lipase in organic media. *Indian Journal of Chemistry*, vol. 31, n. 12, p. 891-895, 1992.

DORDICK, J. S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 11, n. 4, p. 194-211, 1989.

ELLAIAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; THAER TALEB, A.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, vol. 39, n. 5, p. 525-528, 2001.

FLEURI, F. F.; MACEDO, G. A. Relatório Projeto Petrobrás Redes Biotecnologia – Sigiloso, 2008.

FONTEYN, F.; BLECKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M.; SEVERIN, M. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of citronellyl acetate in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, vol. 16, n. 07, p.693-696, 1994.

GANDHI, N. N. Applications of lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GARCIA , T.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic Synthesis of an Analogue of Jojoba Oil: Optimization by Statistical Analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 15, n. 7, p. 607-611, 1993.

GARCIA, T.; COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases. *Chemical Engineering Science*, vol. 51, n. 11, p. 2841-2846, 1996.

GILLIES, B.; YAMAZAKI, H.; ARMSTRONG, D. W. Production of flavor esters by immobilized lipase. *Biotechnology Letters*, vol. 9, n. 10, p. 709-714, 1987.

GUNAWAN, E. R.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. A. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 37, n. 7, p. 739-744, 2005.

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

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79, n. 12, p. 1535-1549, 1999.

HABULIN, M.; KRMELJ, V.; KNEZ, Z. Synthesis of oleic acid esters catalysed by immobilized lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, n. 1, p. 338-342, 1996.

HAMSAVENI, D. R.; PRAPULLA, S. G.; DIVAKAR, S. Response surface methodology approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry*, vol. 36, p. 1103-1109, 2001.

HARI KRISHNA, S.; MANOHAR, B.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Optimization of isoamyl acetate production by using

immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, n. 2-4, p. 131-136, 2000.

HARRY-O'KURU, R. E.; MOHAMED, A.; ABBOTT, T. P. Synthesis and Characterization of tetrahydroxyjojoba wax and ferulates of jojoba oil. *Industrial Crops and Products*, vol. 22, p. 125-133, 2005.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, vol. 10, p. 247-256, 1992.

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

HOCH, J. A. Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, vol. 204, p. 305-320, 1991.

IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Fungal lipase. In: BORGSTRÖM, B.; BROCKMAN, H.L., Ed. *Lipases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1984. p. 443-469.

JOHNSON, V.; SIGH, M.; SAINI, V. S. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Biotechnology Letters*, v.14, n.6, p. 487-490, 1992.

JOHNSON-GREEN, P. Introduction to food biotechnology. 1 ed. New York: CRC Press LLC, 2002. 293 p.

KALSCHEUER, R.; STÖVEKEN, T.; LUFTMANN, H.; MALKUS, U.; REICHELT, R.; STEINBÜCHEL, A. Neutral Lipid Biosynthesis in Engineered *Escherichia coli*: Jojoba Oil-Like Wax Esters and Fatty Acid

Butyl Esters. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, n. 2, p. 1373-1379, 2006.

KANERVA, L. T. Hidrolases-catalyzed asymmetric and other transformations of synthetic interest. In: KOSKINEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (Ed.) *Enzymatic Reactions in Organic Media*. 1.ed. London: St Edimburg Press, 1996. p.170-223.

KAPUCU, N.; GÜVENÇ, A.; MEHMETOĞLU, Ü.; ÇALIMLI, A. Lipase catalyzed synthesis of oleyl oleate: Optimization by response surface methodology. *Chemical Engineering Communications*, vol. 190, n. 5-8, p. 779-796, 2003.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, vol. 41, n. 7, p. 1692-1698, 2006.

KENG, P. S.; BASRI, M.; ARIFF, A. B.; ABDUL RAHMAN, M. B.; ABDUL RAHMAN, R. N. Z.; SALLEH, A. B. Scale-up synthesis of lipase-catalysed palm esters in stirred-tank reactor. *Bioresource Technology*, vol. 99, p. 6097-6104, 2008. ^b

KENG, P. S.; BASRI, M.; ZAKARIA, M. R. S.; ABDUL RAHMAN, M. B.; ARIFF, A. B.; ABDUL RAHMAN, R. N. Z.; SALLEH, A. B. Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. *Industrial Crops and Products*, 2008, doi:10.1016/j.indcrop.2008.04.002. ^a

KNEZ, Z.; HABULIN, M. Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review. *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 23, n. 1, p. 29-42, 2002.

KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Contribution of Response Surface Design to the Synthesis of Monoacylglycerols catalyzed by *Rhizopus* sp. lipase. *Journal of Food Science*, USA, v. 70, n. 8, p. 503-505, 2005.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzymes catalysis in nonconventional media. *Biotechnology Advances*. v. 20, p. 239-267, 2002.

LAITNEN, H. A.; HARRIS, W. E. Chemical Analysis. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1975. 363 p.

LEBLANC, D.; MORIN, A.; GU, D.; ZHANG, X. M.; BISAILLON, J. G.; PAQUET, M.; DUBEAU, H. Short chain fatty acid esters synthesis by commercial lipases in low-water systems and by resting microbial cells in aqueous medium. *Biotechnology Letters*, vol. 20, n. 12, p. 1127-1131, 1998.

LEE, B. H. Fundamentals of food biotechnology. 1 ed. New York: VCH Publishers, 1996. 431 p.

LIAQUAT, M.; OWUSU, R. K. A. Synthesis of low molecular weight flavour esters using plant seedling lipases in organic media. *Journal of Food Science*, vol. 65, n. 2, p. 295-299, 2000.

MACEDO, G. A. Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico. 143 páginas. Dissertação de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; LOZANO, M. M. S. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *Journal of Biotechnology*, Chile, v. 6, n. 1, p. 13-16, 2004. ^a

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista Brasileira de Microbiologia*, v. 28, p. 90-95, 1997.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M.; RODRIGUES, M. I. Optimising the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a Central composite rotatable design. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 6, p. 687-693, 2004 ^b.

MARTINEZ, M.; TORRANO, E.; ARACIL, J. Synthesis of esters of high molecular weight. An analogue of jojoba oil. A statistical approach. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol.27, p. 2179-2182, 1988.

MELO, L. L. M. M.; PASTORE, G. M. ; MACEDO, G. A. Optimizing the synthesis of citronellyl valerate using lipase from *Rhizopus* sp. *Food Science and Biotechnology*, v. 14, n. 03, p. 368-370, 2005.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 65, n. 6, p. 927-931, 1988.

MITTELBACH, M. Lipase Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 67, n. 3, p. 168-170, 1990.

MIWA, T. K. Jojoba oil wax esters and derived fatty acids and alcohols: gas chromatographic analyses. *Journal of the American Oil Chemicals' Society*, vol. 48, n. 6, p. 259-264, 1971.

MIWA, T. K. Structural determination and uses of jojoba oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 61, n. 2, p. 407-410, 1984.

MUKHERJEE, K. D.; KIEWITT, I. Preparation of esters resembling natural waxes by lipase-catalyzed reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 36, n. 6, p. 1333-1336, 1988.

MULHOLLAND, K. L.; SYLVESTER, R. W.; DYER, J. A. Sustainability: waste minimization, green chemistry and inherently safer processing. *Environmental Program* 19 (Winter (4)), p. 260-268, 2000.

NARODOSLAWSKY, M. Renewable resources – new challenges for process integration and synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering*, vol. 17, n. 7, p. 55-64, 2003.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 575, n. 1, p. 156-165, 1979.

PAQUES F. W.; MACEDO, A. M. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAQUES, F. W. Extração e Caracterização da Fração Lipolítica de Resíduos de Processamento de Mamão Formosa. 85 páginas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PASTORE, G. M.; MELO, L. L. M. M.; MACEDO, G. A. Optimized Synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3181-3184, 2005.

PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.

POISSON, L.; JAN, S.; VUILLEMARD, J. C.; SAZARIN, C.; SÉGUIN, J. P.; BARBOTIN, J. N.; ERGAN, F. Lipase-catalyzed synthesis of waxes from milk fat and oleyl alcohol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 76, n. 9, p. 1017-1021, 1999.

RADZI, S. M.; BARSİ, M.; SALLEH, A. B.; ARIFF, A.; MOHAMMAD, R.; RAHMAN, M. B. A.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Eletronic Journal of Biotechnology*, vol. 8, n. 3, p. 291-298, 2005. ^a

RADZI, S. M.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.; ARIFF, A. B.; MOHAMMAD, R.; RAHMAN, M. B. A.; RAHMAN, R. N. Z. A. Large scale production of liquid wax ester by immobilized lipase. *Journal of Oleo Science*, vol. 54, n. 4, p. 203-209, 2005. ^b

RADZI, S. M.; BASRI, M.; SALLEH, A. B.; ARIFF, A. B.; MOHAMMAD, R.; RAHMAN, M. B. A.; RAHMAN, R. N. Z. R. A. Optimization study of large-scale enzymatic synthesis of oleyl oleate, a liquid wax ester, by response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 81, p. 374-380, 2006.

RAO, N. M.; SHANMUGAM, V. M. Lipase-mediated synthesis of dodecyl oleate and oleyl oleate in aqueous foams. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 77, n. 6, p. 605-608, 2000.

RAO, P. V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C. M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 2: medium optimization and effect of aeration. *Process Biochemistry*, vol. 28, p. 391-395, 1993.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia seqüencial de planejamentos. 2.ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 21, n. 4, p. 167-174, 2003.

SÁNCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.; CORMA, A. Synthesis of Oleyl Oleate as a Jojoba Oil Analog. *Journal of American Oil Chemists' Society*, vol. 69, n.11, p. 1150-1153, 1992.

SOO, E. L.; SALLEH, A. B.; BASRI, M.; RAHMAN, R.N.Z.A.; KAMARUDDIN, K.. Response surface methodology study on lipase-catalysed synthesis of amino acid surfactants. *Process Biochemistry*, vol. 39, p. 1511-1518, 2004.

SPENCER, G. F.; PLATTNER, R. D.; MIWA, T. K. Jojoba Oil Analysis by High Pressure Liquid Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 54, n. 5, p. 187-189, 1977.

STEINKE, G.; KIRCHHOFF, R.; MUKHERJEE, K. D. Lipase-catalyzed alcoholysis of crambe oil and camelina oil for the preparation of long-chain esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 77, n. 4, p. 361-366, 2000.

STUART, T. M.; DICOSIMO, R.; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnology*, n. 20, p. 438-450, 2002.

TRANI, M.; ERGAN, F.; ANDRÉ, G. Lipase-Catalyzed Production of Wax Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 68, n. 1, p. 20-22, 1991.

VAN BOVEN, M.; DAENENS, P.; MAES, K.; COKELAERE, M. Content and Composition of Free Sterols and Free Fatty Acohols in Jojoba Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 45, p. 1180-1184, 1997.

VAN BOVEN, M.; HOLSER, R. A.; COKELAERE, M.; DECUYPERE, E.; GOVAERTS, C.; LEMEY, J. Characterization of Triglycerides Isolated from Jojoba Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 77, n. 12, p. 1325-1339, 2000.

VULFSON, E. N.; GILL, I.; SARNEY, D. B. Productivity of enzymatic catalysis in non-aqueous media: new developments. In: KOSKINEN, A.M.P.; KLIBANOV, A.M. (Ed.). *Enzymatic Reactions in Organic Media*. 1.ed. London: St Edimburg Press, 1996. p. 244-265.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase Mediated Production of Flavor and Fragrance Esters from Fusel Oil. *Journal of Food Science*, vol. 54, n. 6, p. 1565-1568, 1989.

Xinyuan Technology Co., Ltd. Disponível em <www.molecularsieve.org>. Acessada em novembro de 2008.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; ZHANG, K. C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from

Rhizopus chinesis CCTCC M 201021 in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 18, n. 1-3, p. 29-37, 2002.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalysed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 23, p. 438-450, 1998.

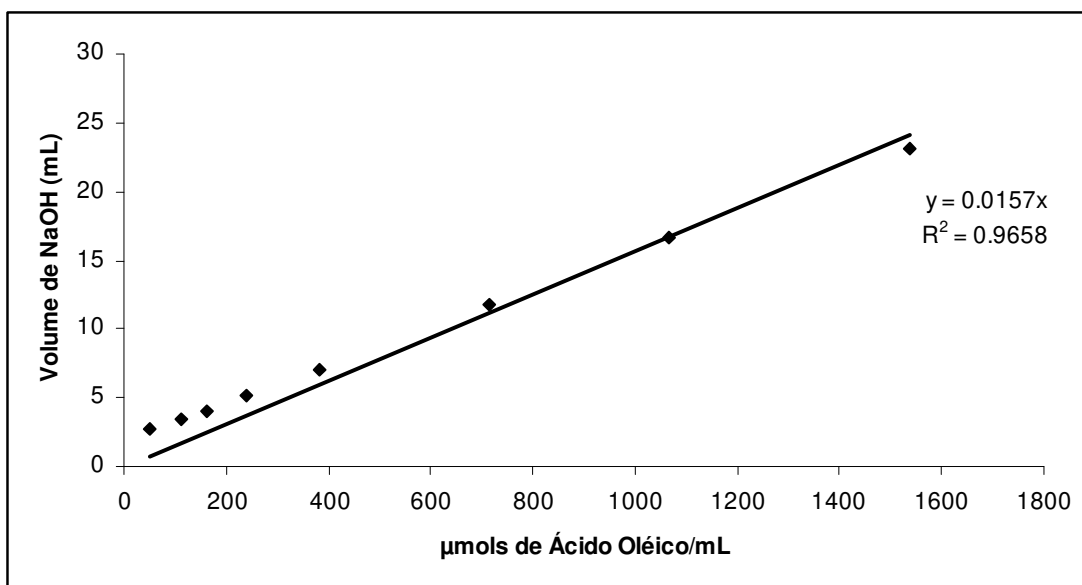
ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 82, p. 3192-3196, 1985.

ZAREVÚCKA, M.; KEJÍK, Z.; SAMAN, D.; WIMMER, Z.; DEMNEROVÁ, K.. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 37, n. 5, p. 481-486, 2004.

ANEXOS

Anexo 1 – Curva Padrão de Ácido Oléico x NaOH (0,05M).

$\mu\text{mols de Ácido Oléico/mL}$	Volume de NaOH (mL)
1538,93	23,1
1064,54	16,6
714,77	11,7
383,05	7,1
240,73	5,1
162,85	4,0
112,93	3,45
48,50	2,7



Anexo 2 – Curva Padrão de Proteínas Totais

Concentração da Proteína Albumina($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (595nm)
0	0
1,25	0,0879
2,5	0,1089
5	0,2005
7,5	0,2566
10	0,2909

