

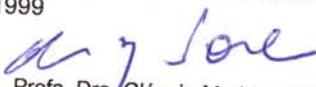
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDOS DA OBTENÇÃO DE ÉSTERES POR
LIPASE DE *Rhizopus sp* LB-FEA-14.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maricy Machado Cavalca Vieira aprovada pela Comissão Julgadora em 24 de fevereiro de 1999.

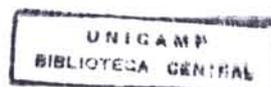
Campinas, 24 de fevereiro de 1999


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

Tese Apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas
para a Obtenção do
Título de Mestre em
Ciência Alimentos

**Maricy Machado Cavalca Vieira
Farmacêutica - Bioquímica
Profa. Dra. Gláucia M. Pastore
Orientadora**

Campinas, janeiro de 1999.



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	V673e
V.	Ex.
TOMBO BC/	37789
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/06/99
N.º CPD	

CM-00123926-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

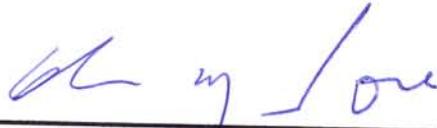
V673e

Vieira, Maricy Machado Cavalca
Estudos da obtenção de ésteres por lipase de
Rhizopus sp. LB-FEA-14. / Maricy Machado Cavalca
Vieira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

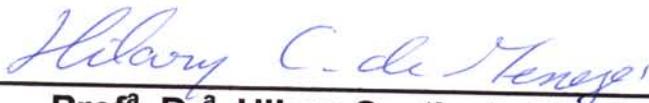
Orientador: Gláucia Maria Pastore.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Lipase. 2. Esterificação (Química). 3. Ácidos
graxos. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

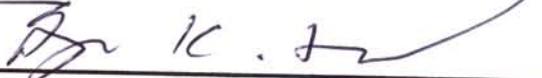
BANCA EXAMINADORA



**Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore
(Orientadora)**



**Prof^a. Dr^a. Hilary Castle de Menezes
(Membro)**



**Prof. Dr. Young Kun Park
(Membro)**

**Prof^a. Dr^a. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
(Membro)**

Campinas, de 1999.

*“ Ensina-nos a usar bem os dias da
nossa vida, para que nos tornemos sábios. ”*

Salmo 90.12

*Ao meu marido, Mauricio, por
sempre me inspirar a ser o melhor que
posso ser e a compartilhar o que nós
aprendemos juntos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir tornar tudo possível.

Aos meus pais, Genivaldo e Edna, e sogros, Djalma e Maria Helena, exemplos de dedicação, respeito e seriedade.

À orientadora Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pelas diretrizes seguras e permanente incentivo.

Aos meus alunos, que têm sido a grande razão e incentivo de meu aprimoramento.

Aos meus amigos e alunos Sérgio, Roberto, Maristela, Reducino, Andréa, Fernando, João Paulo e José Henrique pelo constante apoio.

À Universidade Santo Amaro pelo auxílio na confecção da tese.

À Maria das Dores Oliveira pela amizade e atenção oferecidas sempre com boa vontade.

À Prof^a. Roseli de Sousa Neto pela amizade e auxílio no trabalho.

Ao Prof. Claudio Pereira Magalhães pela revisão ortográfica da tese.

Aos amigos do curso: Vinicius, Márcia, Cristine, Patrícia, Miriam, Michel, Marta e Walfrido que compartilharam momentos do mestrado.

Aos funcionários da Biblioteca, Secretaria do Departamento e da Pós-Graduação pela atenção sempre dispensada.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

À todos que compartilharam e incentivaram este trabalho.

ÍNDICE GERAL	página
ÍNDICE DE TABELAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
SUMMARY	vii
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAL	41
4.1.1 Reagentes Específicos.....	41
4.1.2 Equipamentos.....	42
4.2 MÉTODOS	44
4.2.1 Produção da Enzima.....	44
4.2.1.1 Preparo do Inóculo.....	44
4.2.1.2 Fermentação Semi-Sólida.....	44
4.2.1.3 Extração da Enzima.....	45
4.2.1.4 Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	45
4.2.2 Determinação da Atividade Lipolítica da Enzima Bruta.....	46
4.2.2.1 Determinação da Atividade Lipolítica no Substrato Óleo de Oliva.....	46
4.2.3 Estudo de Esterificação de Glicerol e Ácidos Graxos pela Lipase Bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	47
4.2.3.1.Preparo da Mistura de Reação.....	47
4.2.3.2 Cromatografia em Camada Delgada(CCD) dos Produtos de Esterificação de Ácidos Graxos e Glicerol pela Lipase Bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	48
4.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Produtos de Esterificação de Ácidos Graxos com Glicerol pela Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	48
4.2.4 Estudo de Esterificação de Álcoois e Ácidos Graxos, em Hexano, por Ação de Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	49
4.2.4.1 Preparo da Mistura de Reação de Esterificação de Ácidos Graxos e Álcoois em Hexano.....	49
4.2.5 Caracterização Bioquímica do Sistema de Reação de Ácido Láurico e Butanol em Hexano por Ação de Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	50
4.2.5.1 Efeito da Temperatura na Síntese de Ésteres pela Lipase.....	50
4.2.5.2 Efeito na Concentração de Enzima na Síntese dos Ésteres.....	51
4.2.5.3 Efeito da Relação Molar.....	51
4.2.5.4 Efeito da Presença de Hexano no Sistema de Reação.....	52
4.2.6 Estudo de Esterificação entre Carboidratos e Ácidos Graxos por Ação da Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	52

4.2.6.1 Preparo do Sistema de Reação para Síntese de Ésteres de Carboidratos e Ácidos Graxos em Sistema Aquoso.....	52
4.2.6.2. Estudo da Relação Molar entre Sacarose e Ácido Oléico na Reação de Esterificação pela Lipase.....	53
4.2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Consumo de Ácido Oléico na Esterificação com Sacarose pela Lipase.....	53
4.2.6.4 Determinação da Tensão Superficial.....	54
4.2.6.5 Verificação do Potencial Bacteriostático do Éster de Sacarose e Ácido Oléico.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Produção de Lipase em Meio Semi-Sólido.....	55
5.2 Estudos de Esterificação de Glicerol e Ácidos Graxos por Ação da Lipase de <i>Rhizopus sp</i>	58
5.3 Estudo de Esterificação entre Álcoois e Ácidos Graxos em Hexano por Ação da Lipase de <i>Rhizopus sp</i>	64
5.4 Caracterização Bioquímica do Sistema de Reação Composto por Ácido Láurico e Butanol em Hexano	70
5.4.1 Estudo do Efeito da Temperatura na Síntese de Éster Butil Laurato.....	71
5.4.2 Estudo do Efeito da Concentração de Enzima na Síntese de Éster.....	72
5.4.3 Efeito da Relação Molar Ácido Graxo/ Butanol	73
5.4.4 Estudo do Efeito da Presença de Hexano no Sistema de Reação.....	75
5.5 Estudos de Esterificação entre Carboidratos e Ácidos Graxos por Ação da Lipase de <i>Rhizopus sp</i>	76
5.6 Determinação da Tensão Superficial do Éster de Sacarose Produzido.....	83
5.7 Estudo do Efeito Bacteriostático do Éster Produzido.....	85
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA -1. Estudo Comparativo dos Valores de Tensão Superficial entre o Produto de Reação e Sugar-Éster Comercial, em Diferentes Concentrações.....	84
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Derivados de Ácidos Graxos.....	4
FIGURA 2 - Fluxograma da Produção da Lipase Bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	57
FIGURA 3A- Porcentagem de Esterificação dos Sistemas utilizando-se Diversos Ácidos Graxos.....	58
FIGURA 3B- Porcentagem de Esterificação em Função do Tempo.....	59
FIGURA 3C- Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Esterificação de Ácido Graxo e Glicerol pela Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	62
FIGURA 3D- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Consumo de Ácido Oléico na Reação de Esterificação com Glicerol pela Lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	63
FIGURA 4- Porcentagem de Esterificação com Diferentes Álcoois.....	64
FIGURA 4A- Porcentagem de Esterificação em Etanol e Ácidos Graxos, em Hexano.....	65
FIGURA 4B- Porcentagem de Esterificação de Etanol com Ácidos Graxos em Função do Tempo.....	66
FIGURA 4C- Porcentagem de Esterificação com Propanol, em Hexano.....	67
FIGURA 4D- Porcentagem de Esterificação de Ácidos Graxos com Propanol em Função do Tempo.....	67
FIGURA 4E- Porcentagem de Esterificação com Butanol, em Hexano.....	68
FIGURA 4F- Porcentagem de Esterificação de Ácidos Graxos em Função do Tempo.....	69
FIGURA 5- Efeito da Temperatura na Produção do Éster Butil Laurato.....	71
FIGURA 6- Efeito da Porcentagem de Extrato Bruto Enzimático na Reação.....	72
FIGURA 7- Efeito da Relação Molar de Ácido Láurico/Butanol na Reação.....	74
FIGURA 8- Efeito da Quantidade (mL) de Hexano na Reação.....	75
FIGURA 9- Porcentagem de Esterificação dos Carboidratos com Ácido Oléico.....	77
FIGURA 9A- Porcentagem de Esterificação de Carboidratos com Ácido Oléico em Função do Tempo.....	78
FIGURA 10- Porcentagem de Esterificação das Diferentes Proporções Molares de Sacarose e Ácido Oléico.....	80
FIGURA 11- Cromatograma do Consumo de Ácido Oléico na Reação de Esterificação com Sacarose pela Ação da Lipase.....	82
FIGURA 12- Efeito Bacteriostático do Éster de Sacarose com Ácido Oléico Produzido.....	86

RESUMO

Ésteres de ácidos graxos tem larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Além do seu efeito conservante, os ésteres podem ser utilizados como aromatizantes naturais na indústria alimentícia.

Lipases são enzimas pertencentes a classe das Hidrolases que atua em ésteres de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água em um sistema insolúvel ou heterogêneo. Esta característica peculiar se deve ao fato de serem solúveis em água e atuarem em substratos insolúveis em água.

O objetivo deste estudo foi verificar as condições ótimas de produção de ésteres em meio reacional aquoso e em solvente orgânico por lipase microbiana.

Neste trabalho, foram selecionadas lipases de diferentes microrganismos para produção de ésteres. A lipase de *Rhizopus sp* FEA-LB-14 foi a enzima mais ativa para a produção de ésteres. As condições ideais para produção de ésteres de sacarose e ácido oléico foram com relação molar de 0,05mol/L:0,05mol/L, respectivamente em tampão acetato 0,05M pH 5,6 à 40°C por um período de 96h, usando 4g/L de enzima bruta de *Rhizopus sp*.

A mesma enzima mostrou melhor atividade para a produção de Butil Laurato, em solvente orgânico, frente a outros substratos. As condições ótimas de reação foram: relação molar de butanol e ácido láurico de 1:1, em hexano, à temperatura de 50°C por 2 horas.

A reação de esterificação entre glicerol e diferentes ácidos graxos foi examinada e verificou-se que a enzima esterifica o ácido láurico e glicerol com maior rendimento, produzindo mono, di e triglicerídeos.

SUMMARY

Fatty acid esters are widely applied as emulsifiers in food, cosmetics and pharmaceutical products. Besides their activity in inhibiting microbial growth, these esters can be used as natural flavouring in the food industry. Lipases are enzymes classified as Hidrolases, that act on fatty acid esters and glycerol, at the oil - water in interface, insoluble or heterogeneous systems. This special characteristic is due to its solubility in water and its action on water insoluble substrates.

The objective of this work was to verify the optimum conditions for ester production by microbial lipase in an aqueous system and in an organic solvent.

In this work, lipases from different microorganisms were selected for ester production. *Rhizopus sp.* FEA-LB-14 lipase was the most active enzyme found for the production of esters. For oleic acid esters of sucrose, the best conditions for production were obtained with a sucrose: oleic acid molar ratio of: 0.05 Mol/L: 0.05 Mol/L in 0.05 M acetate buffer pH 5.6 at 40°C for 96 hours, using 4g/L *Rhizopus sp* crude enzyme.

Butyl laurate ester was the product with the highest yield, obtained by a lipase catalysed esterification of different fatty acids and alcohol. The optimum reaction conditions were: 1:1 molar ratio of butanol and lauric acid in hexane at 50° C for 2 hours.

The esterification reaction between glycerol and different fatty acid was examined. It was verified that the enzyme gives the greatest yields by esterifying lauric acid and glycerol, producing, monoglyceride, diglyceride and triglyceride.

1. INTRODUÇÃO

Lipases constituem um grupo de enzimas associadas ao metabolismo de triacilgliceróis, bem como sua degradação. Podem ser de origem microbiana ou de origem vegetal e animal.

As Lipases compreendem um grupo de enzimas classificadas como Hidrolases (E.C.3.1.1.3), e também são conhecidas como Acilglicerol, Acilhidrolases ou Glicerol Éster Hidrolase. Sua função biológica é a hidrólise de ésteres de ácidos graxos e glicerol resultando na formação de diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos livres. Estas enzimas podem atuar de modo reversível, catalisando também a esterificação de ácidos graxos e glicerol produzindo diversos glicerídeos. Este tipo de reação ocorre na interface óleo/água, característica esta peculiar às lipases que são solúveis em água e atuam em substratos não solúveis em água, sendo necessária a interação lipase-lipídeo de modo que resulte na emulsificação entre o substrato líquido e a água, na qual a lipase está envolvida. A lipólise enzimática, na interface óleo/água, ocorre devido a uma orientação ideal da enzima, onde a parte hidrofílica dirige-se para o exterior (água) e a parte hidrofóbica para o interior (óleo).

As enzimas lipolíticas são importantes no contexto industrial devido a aplicação em diversas áreas como síntese orgânica, composição de detergentes, produtos de biotransformação que não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais e que possuem grande aplicação no setor farmacêutico, cosmético e de alimentos.

A seleção e o isolamento de microrganismos produtores de lipases são objetos de estudos, pois esta enzima pode ser produzida em larga escala, em relação as dos vegetais e animais, através de processos fermentativos com a utilização de substratos de baixo custo.

A cinética de reação enzimática catalisada por lipases depende de sua origem, grau de purificação e especificidade, sendo estas influenciadas pelas condições de reação como: pH, temperatura, homogeneização, área superficial (óleo/água) e tipo de substrato. Dependendo das características do experimento, a lipase poderá realizar reação de hidrólise ou esterificação, neste caso é necessária a diminuição da atividade de água do meio.

Outra forma de aplicação das lipases é a hidrólise de óleos vegetais, de acordo com sua especificidade, podem-se clivar as posições 1,2 ou 2,3 do triacilglicerol ou ainda pelo tamanho da cadeia dos ácidos graxos.

O potencial de aplicação de lipases tem sido alvo de muitos estudos e é de considerável importância tecnológica. Esta tecnologia é reforçada pela aplicação das lipases microbianas em hidrólise de lipídeos onde, por exemplo, no tratamento de triacilgliceróis contendo altos teores de ácidos graxos poliinsaturados, a hidrólise deste material pela lipase permite um enriquecimento do valor nutricional de um alimento ou amplia sua aplicação em produtos farmacêuticos.

Processos de esterificação enzimática catalisados por lipases tem sido utilizados com sucesso para síntese e modificação de compostos orgânicos, pois podem melhorar as propriedades organolépticas, reduzir total de gorduras saturadas, etc. Um dos objetivos da indústria de óleos

está centrado no desenvolvimento de novos triglicerídeos com propriedades de fusão variáveis, através de processos de interesterificação dos triglicerídeos disponíveis por catálise de lipase microbiana, facilitando assim sua aplicação.

As lipases podem ser utilizadas em sistemas de reações com solventes orgânicos. Em tais sistemas, a enzima permanece ativa e pode catalisar reações de esterificação e transesterificação.

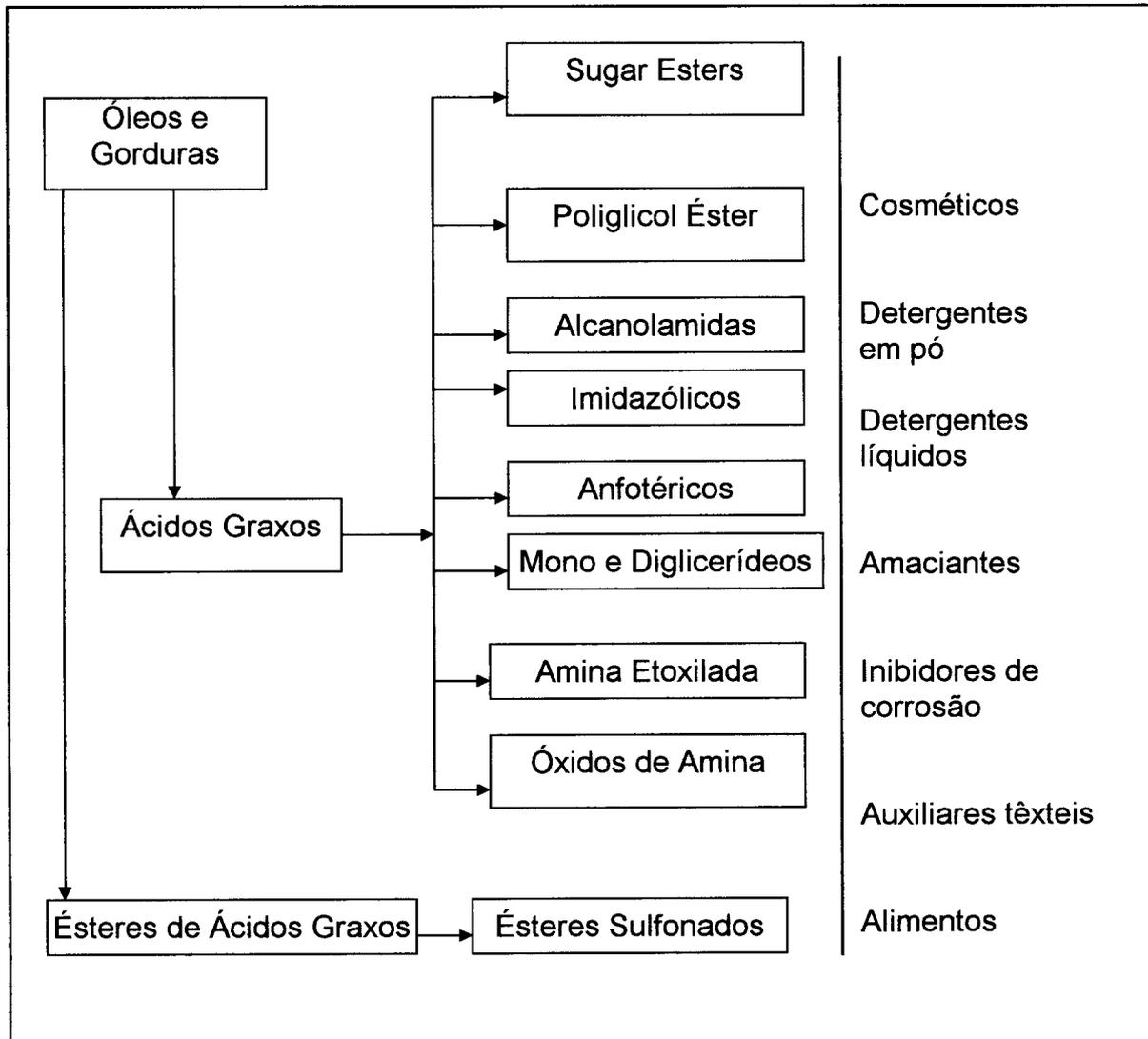
Os ésteres de ácidos graxos podem ser produzidos com altos rendimentos e com um grau de pureza considerável por reações químicas convencionais, porém a via biotecnológica, particularmente a enzimática, tem a vantagem dos ésteres obtidos serem considerados de fontes naturais, tendo, portanto, maior valorização no mercado.

Os ésteres de cadeia curta, como os acetatos, propionatos e butiratos são componentes importantes de aromas naturais usados em indústrias alimentícias.

Síntese de ésteres de ácidos graxos, em solventes orgânicos, por lipases tem sido desenvolvidos para melhorar o rendimento, pois substratos, como o ácido oléico, são insolúveis em fase aquosa e o excesso de água dificulta a síntese enzimática dos ésteres.

Ésteres de ácidos graxos são utilizados em uma extensa classe de produtos. As aplicações mais comuns são lubrificantes, cosméticos, plastificantes, emulsificantes.

A Figura 1 apresenta os principais derivados de ácidos graxos e suas aplicações (**MAAG et alii**, 1984).



Fonte: MAAG et alli, 1984.

Figura 1- Derivados de Ácidos Graxos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- 1) Selecionar lipases de diferentes origens capazes de catalisar a reação de esterificação de ácidos graxos e glicerol, produzindo ésteres como produtos finais.
- 2) Estudos de parâmetros que afetam a produção de ésteres em reação catalisada pela lipase tais como: tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo e álcoois, presença ou ausência de solvente orgânico e temperatura ótima.
- 3) Estudo de esterificação de carboidratos e ácidos graxos pela lipase selecionada.
- 4) Estudo das características do éster de carboidrato produzido quanto às propriedades surfactantes e efeito bacteriostático.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

OSIPOW et alii 1956, iniciaram os estudos sobre métodos de preparação de éster de ácidos graxos e sacarose, produzindo monoéster de sacarose. As condições de reação foram descritas da seguinte maneira: três moles de sacarose, um mol de éster metílico de ácido esteárico, dissolvidos em quatro litros de dimetilformamida. A mistura foi incubada à 60°C e 0,2 moles de sódio foram adicionados para catalisar a reação. A adição de solvente, como dimetilformamida, e o excesso de açúcar produziram monoéster em bom rendimento.

FUKUMOTO et alii 1963, selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* que produziu 21 gramas de enzima bruta para cada 53 gramas de farelo de trigo (ProcessKoji), em um período de incubação de 72 horas à 30°C.

IWAI et alii 1972 estudaram, comparativamente, lipases de: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* quanto às suas propriedades enzimáticas de esterificação. *Aspergillus niger* produziu lipase especialmente em meio sólido constituído de farelo de trigo e CaCO₃, enquanto que os outros produziram grande quantidade de lipase em meio líquido. A principal característica deste meio foi a alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono. De acordo com os autores, todas as lipases produzidas podem ser definidas como Glicerol Éster Hidrolases (E.C.3.1.1.3), devido à sua ação catalítica.

SCHOLNICK *et alii* 1974, estudaram as propriedades dos surfactantes de lactose e ésteres de ácidos graxos. A estrutura química da lactose serve como porção hidrofílica de surfactantes não iônicos. Foram testados vários ésteres de lactose através da mistura de diferentes ésteres metílicos de ácidos graxos com lactose em N-metil-2-pirrolidinona. Monoésteres de ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico e oléico também foram obtidos.

Quando uma proporção molar de 3:1 de sacarose e ésteres metílicos foi utilizada, o produto da reação foi 85% de monoésteres e 15% de diésteres. Outros métodos de síntese destes produtos foram testados, mas sem êxito. Os ésteres produzidos foram verificados em cromatografia em camada delgada (CCD). O sistema de solventes utilizados na fase móvel foi composto de 80% de clorofórmio, 10% de metanol, 8% de ácido acético e 2% de água. O revelador usado foi uma solução de ácido sulfúrico e dicromato. A análise de ésteres foi dificultada pela alta higroscopicidade dos cristais.

Foram verificadas as propriedades tensoativas, estabilidade das emulsões e agente dispersante frente a um emulsificante controle (Triton-X-100) e os melhores resultados foram obtidos com ésteres de lactose e ácido láurico, mirístico e palmítico, provavelmente devido a maior solubilidade e também por serem os de menores pesos moleculares.

OKUMURA et alii 1975, purificaram e caracterizaram duas lipases obtidas em meio semi-sólido, utilizando *Penicillium cyclopium*, comparando suas propriedades. As análises foram feitas por sistemas reacionais iguais, com ou sem agitação. As lipases foram purificadas com sulfato de amônio a 70% de saturação, e o precipitado foi dissolvido em água destilada deionizada; o sal foi retirado em coluna de Sephadex G-25, e posteriormente concentrada em diálise contra polietilenoglicol. Foram feitos testes de pH ótimo de atividade e pH de estabilidade das lipases.

Em 1977, pesquisando lipases fúngicas, **TSUJISAKA et alii** relataram as propriedades enzimáticas de esterificação de lipases de quatro tipos de microrganismos: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* ATCC-34612, *Geotrichum candidum* ATCC-34614 e *Penicillium cyclopium* ATCC-34613. Estas enzimas foram purificadas para estudo de suas aplicações. A mistura de reação para a síntese de glicerídeos foi constituída de 4 ml de glicerol, 1 ml de água e 0,1 ml de solução de enzima e 0,1 ml de ácido oléico. As quantidades de glicerídeos sintetizados pelas lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium* foram inferiores em cerca de 10% em relação as quantidades sintetizadas pela lipase de *A. niger* e *R. delemar* (60%).

Síntese de ésteres por lipase, usando preparação de enzima homogeneizada, foi pesquisada por **OKUMURA et alii**, 1979. A quantidade de éster sintetizado e os produtos foram identificados por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de infra-vermelho.

Lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* sintetizaram ésteres de ácido oléico e vários álcoois primários. Ésteres de álcoois terciários, fenol ou ésteres alcoólicos não foram sintetizados pela lipase. Altas concentrações de álcool foram necessárias para a síntese de éster de etilenoglicol, propilenoglicol ou trimetiletilenoglicol. Lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar* sintetizaram ésteres oléicos de vários ácidos graxos e alguns ácidos bibásicos. Ao contrário, lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* sintetizaram ésteres oléicos somente com ácidos graxos de cadeia média ou longa.

HOLMBERG et alii 1981, produziram monoglicerídeos com 80% de rendimento, através da hidrólise enzimática de triglicerídeos, utilizando lipase de *Rhizopus delemar* em microemulsões. Quando solubilizada em pequena quantidade de água, a enzima, uma vez em microemulsões, é protegida de efeitos desnaturantes de solventes orgânicos. O uso de microemulsões, como meios reacionais, eliminam o problema de insolubilidade de triglicerídeos e outros substratos lipofílicos. Vários fatores foram avaliados para determinar as condições ótimas de reação como: tipo de surfactante, escolha do hidrocarboneto e influência do pH.

O melhor resultado obtido foi o surfactante aniônico di (2 etilhexil) sulfossuccinato de sódio. Portanto, a lipase apresentou melhor atividade com surfactantes aniônicos e não aniônicos, mas não com os catiônicos.

Dentre os hidrocarbonetos testados (n-hexano, n-octano e isoctano) a lipase teve maior ação catalítica em isoctano, utilizando também pH 7,0 à 35°C por 3 horas. A análise dos ácidos graxos foi feita através da

titulação das amostras, dissolvidas em etanol, com KOH 0,1 M em etanol. As reações também foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), usando o sistema de solventes: éter de petróleo, éter dietílico e acetona na proporção: 45:50:5 (v/v/v), respectivamente. O cromatograma foi revelado utilizando iodo sublimado como agente revelador. Dos resultados obtidos, pode-se verificar que a enzima utilizada no experimento foi 1,3 específica, mantendo a posição 2 da molécula do glicerol intacta. A produção de monoglicerídeos de cadeia longa é de grande importância, pois são de larga utilização na área de alimentos como emulsificantes e na área farmacêutica, por serem surfactantes não iônicos.

JENSEN *et alii* 1983, avaliaram os métodos para detecção e determinação de lipases (acilglicerol hidrolases) e a preparação de ensaios foram revistas, incluindo substratos, condições reacionais e seleção de microrganismos. Alguns métodos para determinação da atividade lipolítica foram discutidos, entre eles: titulometria, colorimetria, radioensaio, cromatografia gasosa, tratamento enzimático dos ácidos graxos e verificação dos produtos formados, determinação de lipases por imunologia direta.

A seleção do método a ser usado pode ser influenciado pelo número de amostras e pela precisão desejada. Na titulação direta do ensaio o pHmetro não é necessário, pois os indicadores de ponto de viragem são satisfatórios. A sensibilidade e as vantagens e desvantagens de cada método foram descritas.

GUPTA et alii 1983, desenvolveram um método de purificação de mono e diésteres de sacarose por cromatografia em coluna para larga escala com monitoração das frações por cromatografia em camada delgada (CCD). Cinco litros de éter dietílico foram passados numa coluna de sílica gel, de 70 cm, e em seguida este solvente foi descartado. A amostra foi dissolvida em tolueno (150 g em 250 mL de tolueno) à 60°C, deixando esfriar até 30-35°C e colocado imediatamente após a porção final de dietiléter. Foram adicionados 100 mL de tolueno para eluir a amostra. Os resíduos de glicerídeos e ácidos graxos foram eluídos da coluna pela corrida de 5 L de éter dietílico. Os diésteres e ésteres de alto peso molecular foram eluídos com 7-8 L de n-butanona, e os monoésteres com n-butanona saturada com água. Sendo assim, o processo de purificação foi verificado em cromatografia em camada delgada.

O estudo da hidrólise de óleo de côco e óleo de oliva por lipase de *Candida rugosa* foi relatado por **LINFIELD et alii** 1984. Os autores verificaram que a reação hidrolítica aproxima-se de um produto cinético de primeira ordem. Esta razão não foi afetada pela temperatura numa faixa de 24 a 26° C. O óleo de oliva foi mais rapidamente hidrolisado quando comparado ao óleo de côco. A hidrólise foi afetada por hidrocarbonetos e surfactantes não iônicos. A quantidade de ácidos graxos produzidos foi diretamente proporcional ao logarítimo do tempo de reação e concentração enzimática. Todos substratos foram hidrolisados quase que totalmente após 72 horas. A lipase de *Aspergillus niger* desempenhou esta performance. A lipase de *Rhizopus arrizus* teve uma

baixa taxa de hidrólise devido a especificidade do ataque do grupamento acila aos grupos α hidroxí do glicerol. A esterificação do glicerol, com ácidos graxos, foi estudada com a lipase de *C. rugosa* e *A. niger*. A remoção de água e o uso excessivo de ácidos graxos revertem a reação de hidrólise para esterificação. Entretanto, a esterificação de 70% do conteúdo de glicerídeos foi lenta.

HOQ et alii 1984, realizaram a síntese contínua de glicerídeos de ácido oléico por sete lipases comerciais. O experimento foi feito à 40°C usando biorreator de membrana hidrofóbica micropor. As lipases produzidas por *Rhizopus japonicus*, *Candida cylindracea* e *Phycomyces nitens*, foram inativadas em cerca de 97% em solução de glicerol e apresentaram baixas taxas de conversão de glicerídeos. As demais lipases renderam atividade de síntese de glicerídeos na seguinte ordem: *R. delemar* < *Pseudomonas fluorescens* < *Mucor miehei* < *Chromobacterium viscosum*. Estas quatro lipases apresentaram uma relação entre a conversão e a quantidade de lipase adsorvida na membrana durante a reação. A lipase foi relativamente adsorvida quando a solução de glicerol, água e lipase foi substituída por 97% de solução de glicerol sem lipase. A lipase de *Mucor miehei* foi adsorvida mais fortemente do que a de *Chromobacterium viscosum*. O produto obtido da lipase de *Mucor miehei* foi composto de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos na proporção molar de 3:4:1 respectivamente. Os conteúdos de 2- monoglicerídeos e 1,2 diglicerídeos (isômeros) no produto foram de 80% de conversão produzida pela lipase de *Mucor miehei*.

A meia vida aproximada da lipase de *Mucor miehei* foi estimada em 27 dias de reação contínua em experimento de 54 dias.

MELFFERT et alii em 1984, relatam a importância e o crescimento da utilização de ésteres de ácidos graxos. Os autores consideraram, de acordo com a aplicação tecnológica a seguinte classificação: ésteres de álcoois polifuncionais, ésteres de ácidos graxos etoxilados e ésteres de monoálcoois. A mais importante aplicação citada foi na área de indústria de cosméticos, têxteis, na manufatura e processamento de plásticos e lubrificantes. Ésteres metílicos também podem ser compostos intermediários na conversão química de álcoois graxos, ésteres, amidas e ésteres sulfonados.

SEINO et alii 1984, verificaram que ésteres de sacarose são emulsificantes potencialmente importantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, utilizando-se lipases de *Rhizopus*, *Enterobacterium*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Chromobacterium*, *Candida*, *Mucor* e *Penicillium* e ácidos graxos como oléico, esteárico e linoléico e carboidratos como sacarose, glicose, frutose e sorbitol. A lipase de *Candida cylindracea* foi a mais ativa na síntese de ésteres de carboidratos.

As condições ideais para atividade foram: taxa molar de carboidrato para ácido graxo 0,05mol/L:0,2mol/L, quantidade de lipase 4 g/L dissolvidos em tampão fosfato pH 5,4 com período de reação de 72 horas à temperatura de 40°C.

A formação de ésteres de ácido oléico e sacarose pela lipase de *Candida cylindracea* foi maior que 60%, enquanto que para glicose foi ao redor de 28%.

MAAG et alii 1984, fizeram uma revisão sobre os surfactantes obtidos de ácidos graxos. Devido às suas propriedades indispensáveis, alguns emulsificantes têm sido usados há muito tempo, como os ésteres de açúcares, ésteres sulfonados e ésteres de ácidos graxos. Os ésteres de ácidos graxos podem ser obtidos pela glicerínólise de triglicerídeos. Esta reação ocorre com excesso de glicerol em temperaturas de 200 a 250°C sob atmosfera de gás inerte, especialmente se ácidos graxos insaturados são usados. Ésteres de carboidratos e ácidos graxos, como ésteres de sorbitol, têm sido estudado há vinte anos; onde foram descritos seu preparo, a partir de fontes renováveis, e são fisiologicamente, dermatologicamente e biologicamente aceitados como surfactantes.

EIGTVED et alii 1986, utilizaram uma lipase 1,3 específica produzida pelo fungo *Mucor miehei*, para esterificar um ácido graxo específico nas posições extremas do triglicerídeo, sem alterar o ácido graxo da posição central pelo processo de transesterificação.

A produção de lipase de *Aspergillus foetidus* em reator com banho e agitação foi relatada por **BONE et alii** 1987. A produção máxima de lipase por *A. foetidus* foi obtida no meio com 2% de óleo de oliva e 0,5% de sacarose. As condições ótimas para produção da lipase foram

encontrados com agitação a 500 rpm, com fluxo de ar de 1,5 litros por minuto. A imobilização do microrganismo em polímeros naturais, como alginato, ágar ou quitosanas foi impraticável, pois o mesmo utiliza o polissacarídeo como nutriente.

IBRAHIM et alii 1987, realizaram estudos de hidrólise e esterificação por ação da lipase termoestável de *Humicola lanuginosa*. A faixa de temperatura para a hidrólise e esterificação foi de 45 a 50°C.

Dos ácidos graxos testados (C₂ a C₁₈), foi encontrado uma maior eficiência da enzima nas reações contendo ácidos graxos de cadeias carbônica C₁₂ a C₁₈. A síntese de ésteres de ácido láurico com diferentes álcoois primários, terpênicos e secundários, também foi investigada. A máxima atividade de síntese, com álcool primário, ocorreu com o n-octil, que foi 55,7% de esterificação. Em sistemas de reação, contendo o álcool secundário, a maior porcentagem de esterificação (52,1%) ocorreu com o isoamil e com álcool terpênico o maior rendimento, 87,2%, foi com o geraniol. As atividades de hidrólise e esterificação apresentaram altos rendimentos na presença de solvente orgânico. Foi encontrada a taxa máxima de esterificação em sistema de reação contendo o solvente orgânico n-hexano.

Em 1987, **JASPERS et alii** concluíram que a síntese de ésteres de ácidos graxos e sacarose sempre resulta em misturas complexas. São descritos dois procedimentos para análise quantitativa de monoésteres e diésteres de sacarose, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e coluna de fase reversa.

A mistura de metanol e água (85:15, v/v) foi usada para separação dos monoésteres enquanto que metanol, acetato de etila e água (65:25:10 v/v/v) foram usados para separação dos diésteres. A completa separação dos diésteres não foi possível devido à presença de estruturas isômeras complexas.

BAILLARGEON *et alii* em 1988, realizaram um estudo comparativo de atividades hidrolítica e de síntese entre lipase bruta de *Candida rugosa* e a mesma enzima ligada covalentemente a polietilenoglicol (PEG - lipase) em meios reacionais orgânicos e aquosos. Foram testados polietilenoglicol de diferentes pesos moleculares (750, 1900 e 5000). A estabilidade destas enzimas foi verificada incubando-as em água e benzeno à 45°C por trinta minutos. A atividade lipolítica foi verificada utilizando óleo de oliva como substrato. A lipase modificada (PEG-lipase), apresentou uma maior estabilidade (cerca de 10 vezes) em água, quando comparada com a lipase bruta, porém, apresentou menor estabilidade em benzeno. A seletividade das enzimas para ácido oléico e esteárico também foi verificada, utilizando um molar equivalente de cada ácido (0,091 M) com 2 equivalentes de álcool (0,182 M de metanol ou octanol) à 30°C. O percentual de conversão dos ésteres foi determinado pela titulação dos ácidos graxos livres e a quantidade dos dois ésteres formados foi determinada por cromatografia gasosa (CG).

A esterificação de ácido oléico e 1-octanol pela PEG 5000-lipase foi a reação de maior rendimento. A produção preferencial de 1-octiloleato sobre os ésteres de ácido esteárico sugerem uma pequena alteração na atividade da lipase ou de seu sítio ativo. PEG-lipase de *Candida rugosa*

pode ser usada comercialmente na hidrólise de óleos, principalmente em baixas temperaturas. A alteração da seletividade da PEG-lipase, favorecendo reações com ácido oléico, em relação ao ácido esteárico também pode ser usada.

CHOPINEAU et alii 1988, verificaram a produção de biosurfactantes por açúcares alcóolicos e óleos vegetais catalisada por lipase em meio não aquoso. As lipases pancreática (LPP) e de *Chromobacterium viscosum*, catalisaram reações de transesterificação entre um número de açúcares alcóolicos e vários óleos vegetais e animais em piridina anidra. Os produtos obtidos desse processo foram identificados como monoésteres primários de açúcares alcóolicos e ácidos graxos. Estes açúcares enzimaticamente preparados foram tidos como excelentes surfactantes em relação às suas habilidades de reduzir tensões superficial e interfacial e estabilizarem emulsões.

NISHIO et alii 1988, pesquisaram a síntese de ésteres por lipase de *Pseudomonas fragi* 22.39 B. A lipase usada no estudo foi purificada e liofilizada para ser usada em solução de enzimas e água destilada. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como a quantidade que libera 1 μ mol de ácido graxo livre por minuto à 37°C e pH 9,0. A mistura de reação para síntese de ésteres de ácido oléico e vários álcoois constituiu de 10 mMol de ácido oléico, 10 mMol de álcool e 0,2 mL de solução enzimática (1500 unidades). Para a síntese de álcool oléico e vários ácidos carboxílicos o sistema de reação era formado de 10 mMol de álcool oleato, 10 mMol de ácido e 0,2 mL de solução enzimática

(1500 unidades). Cada mistura foi incubada à 37°C com agitação magnética constante a 300 rpm, por oito horas.

A lipase de *P. fragi* 22.29 B pode catalisar a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia aberta (como os ácidos butírico, láurico e linoléico) e éster alcoólico de oleína, mas não reagiu com ácidos carboxílicos aromáticos (ácido benzóico) e ácido isovalérico e ácido 2-hexildecanoico para a síntese de ésteres oléicos. O ganho da atividade enzimática foi proporcional ao aumento do número de carbonos dos ácidos graxos. A lipase pode sintetizar ésteres de ácido oléico e álcool primário (1-butanol) e álcool secundário (2-butanol), mas não esterificou álcool terciário (butanol terciário). A enzima sintetizou glicerídeos de glicerol e ácido oléico. Monoleína e 1,3 dioleína foram os principais produtos e triloleína o menor. A síntese de monoéster foi pouco afetada pelo conteúdo de água na mistura da reação, enquanto que glicerídeos de ácido oléico foi muito afetado. Os resultados indicaram que a lipase de *P. fragi* 22.39 B tem especificidade nas posições 1,3 para síntese de glicerídeos.

Em 1988, **MERCADE *et alii***, avaliaram a produção de um novo surfactante de *Pseudomonas* 42A2, isolado de uma amostra de água que quando cultivado com sais minerais, óleo de oliva e fonte de carbono produz um novo surfactante, o ácido octadecenoico.

Para as análises químicas do surfactante, o mesmo foi purificado em cromatografia em coluna de sílica gel, usando um sistema solvente de clorofórmio:metanol (9:1 v/v).

Esta análise foi monitorada por cromatografia em camada delgada com fase móvel de clorofórmio:metanol:água (65:25:4 v/v/v).

HIRUTA et alii 1988, estudaram a produção de 9- hidroxiperóxido γ linolênico por lipoxigenase de soja, em sistema de duas fases. Nesse estudo, 9-hidroperoxi- γ -linolênico foi produzido por ação de lipoxigenase utilizando um sistema composto por tampão borato pH 6,5 e hexano a baixas temperaturas (10°C) com alguns surfactantes aniônicos, que mostraram pequeno efeito inibitório na atividade enzimática em pH 6,5. O sistema evita o efeito inibitório de altas concentrações de substrato e de hidroperóxidos, bem como baixa solubilidade do substrato em sistema aquoso. Não a lipoxigenase 2, mas a lipoxigenase 1 foi indicada como responsável pela redução de 9-hidroperoxi- γ -linolênico. Entre os surfactantes aniônicos testados, acetato e sarcosinato mostraram-se efetivos. A produção de 9-hidroperoxi- γ -linolênico foi aumentada pela ação de íons Ca^{++} . A fração da lipoxigenase 1 foi responsável pelo rendimento máximo de 35% na presença de Ca^{++} 0,5M, surfactante aniônico acetato à 10°C e emulsão de ácido γ - linolênico 4,8 M.

DONNELLY et alii, 1988, verificaram que compostos surfactantes produzidos por fermentação apresentam desvantagem como baixo rendimento associados à dificuldades de recuperação dos produtos formados. Baseado nesta condições, o autor apresentou estudos de caracterização de propriedades surfactantes de ésteres de sacarose comerciais.

Foi utilizado cromatografia em camada delgada para pesquisa dos ésteres, tendo como fase móvel CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O , 79: 11: 8: 2 v/v/v/v e as bandas foram visualizadas com vapor de iodo. A tensão superficial foi verificada à temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), usando Du Nouy Tensiometer (Cambridge Instruments London, England) pelo método de placa de vidro, com a concentração de ésteres de sacarose variando entre 0,0001-2,0% p/p. Os ésteres de sacarose não são tão fáceis de se dispersarem em água e para assegurar a medida correta as amostras foram aquecidas até a fusão.

BJÖRKLING *et alii* 1989, verificaram a alta seletividade de enzimas que catalisam a esterificação de glicosídeos simples. A seletividade 6 –0, na esterificação de alquilglicosídeos com ácidos graxos de cadeia longa, apresentou rendimento em torno de 95% de 6-0 monoésteres, usando lipases em sistemas de reação isentos de solvente orgânico. O sistema de reação utilizado foi composto por: 50 g (0,24 Mol) de etil-D - glicopiranosídeo, à 70°C e 0,01 bar com 1,35 equivalentes de ácidos graxos de cadeias C_8 a C_{18} e 2,5%(p/p) de lipase imobilizada de *Candida antarctica* com atividade de 40 BIV (BIV = uma unidade de esterificação formada, que corresponde a 1 mol de ácido hexadecanóico incorporado, até trioctadecenoilglicerol por minuto).

O progresso da reação foi monitorado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A tensão superficial dos ésteres de ácidos graxos de etil-D- glicopiranosídeo foi determinada utilizando-se o tensiômetro Krius tipo K-10. O melhor rendimento, na faixa de 95%, ocorreu quando o ácido octadecenóico e etil ou isopropilglicosídeo foram

utilizados como substrato. Com o objetivo de se atingir a melhor atividade enzimática, a lipase imobilizada foi dissolvida em 10% de água destilada.

A esterificação de ácido oléico com glicerol, usando lipases produzidas por *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus delemar* e *Rhizopus niveus*, foi estudada por **PARK & PASTORE**, 1989. A esterificação máxima foi obtida quando a mistura de reação continha 0,9g de ácido oléico, 8g de glicerol e 0,4 mL de água que continha lipase, era incubada à 40°C. A lipase de *P. roqueforti* esterificava em menor tempo, comparativamente, formando monoglicerídeo, 1,2 (2,3)-diglicerídeo e 1,3-diglicerídeo e não formava triglicerídeo. As lipases de *R. delemar* e *R. niveus* demonstraram forma similar de esterificação, formando todos o glicerídeos, inclusive triglicerídeos, porém, menos 1,2(2,3)-diglicerídeos que a lipase de *P. roqueforti*.

LANGRAND et alii 1990, reportaram detalhadamente a influência do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos (C₂ a C₆) e dos álcoois (C₁ a C₆) primários, bem como a influência da natureza do álcool (terpênico ou não) na síntese do aroma. A preparação de 35 ésteres de cadeia curta, componentes de aroma, foi realizada pelas lipases de *Mucor miehei*, *Aspergillus sp*, *Candida rugosa* e *Rhizopus arrhizus* em sistema com adição de solvente orgânico. Os substratos utilizados foram os ácidos: acético, propiônico, butírico, valérico e capróico; assim como, os álcoois: metanol, etanol, butanol, isopentanol, hexanol, citrionelol e geranil.

Cada preparação de lipase testada apresentou seletividade de reação, de acordo com o ácido ou álcool testado. Por exemplo, a lipase de *Aspergillus sp* foi altamente seletiva para ácidos e álcoois de cadeia carbônica muito curta. Os autores concluíram que as reações enzimáticas catalisadas por lipases são muito convenientes na síntese de ésteres. Contudo, cada síntese apresenta um problema específico, onde as condições de preparação e experimentais devem ser otimizadas para se obter altos níveis de conversão.

A síntese de éster por lipase bruta de *Rhizopus oligosporus* em sistema aquoso foi pesquisada por **ISHII et alii**, 1990. As reações catalisadas por lipases são usadas com sucesso para síntese e modificação de compostos orgânicos. Apesar de se obter altos rendimentos de esterificação na presença de solventes orgânicos, estudos em sistemas aquosos tem sido relatados, pois a vantagem é a ausência de toxicidade do solvente orgânico.

A reação de síntese ocorreu em banho termostaticado com agitação de 120 rpm à 37°C, por 48 horas. A mistura de reação continha 2 g de álcool, 1 g de ácido oléico e 1 mL de solução de enzima (10 mg de enzima em pó, em tampão fosfato 50mM, pH 5,5). A reação foi paralisada devido a adição de 20 mL de etanol/acetona (1:1 v/v).

O grau de esterificação foi calculado pela quantidade de ácido consumido na reação; determinado pela titulação com KOH 0,05N. O produto de reação foi detectado por cromatografia em camada delgada (CCD), com fase móvel composta de éter de petróleo:dietiléter:ácido acético (70:30:1 v/v/v) e visualização das bandas com ácido sulfúrico à

120°C. O maior rendimento de esterificação de todos os álcoois testados, 38,5%, foi com 1-propanol.

LEITGEB & KNEZ 1990, relataram um estudo sobre a influência da água na síntese de n-butil oleato por lipase imobilizada de *Mucor miehei*. Foi investigada a influência da concentração inicial de água na síntese de n-butil oleato. A síntese foi feita com lipase imobilizada do *Mucor miehei* (Lipozyme™) em várias condições de reação. A atividade da enzima foi mais baixa em quantidades maiores de água.

As taxas de reação inicial, bem como a conversão de equilíbrio, elevam em concentrações baixas de água. A ótima concentração de água para a atividade de lipase imobilizada é dependente de temperatura em pressão de 1 bar. A concentração de água inicial efetua apenas o equilíbrio de esterificação a 0,032 bar. Em altas concentrações iniciais, a conversão de equilíbrio, assim como as taxas de reação, decrescem em ambas pressões.

PHERONI & FOURNERON 1990, estudando lipases específicas e não específicas de mamíferos e microrganismos, verificaram que estas enzimas catalisam a hidrólise de ácidos graxos anidros de cadeia curta, média e longa. Todas as lipases testadas no estudo catalisaram mais eficientemente a hidrólise de ácidos graxos anidros puros e em menor grau, a hidrólise de tributirato de glicerol. A presença de 0,5% (por massa) de ácido graxo anidro em um triglicerídeo pode dobrar a taxa inicial de liberação de próton durante a hidrólise enzimática. Esse dado deveria ser levado em conta, quando se verifica a atividade específica de

uma lipase para vários substratos sintéticos. A inibição pareceu estar relacionada com a hidrólise anídrica. As taxas de inibição dependiam do ácido graxo anidro e da origem da lipase.

MUKHERJEE et alii 1991, estudaram o enriquecimento de ácido γ -linoléico produzido por fungo pela reação catalítica por lipase. A esterificação ocorreu com butanol, catalisado por lipase microbiana. A reação foi realizada à temperatura de 30°C usando 250 mM de óleo produzido pelo fungo *Mucor sp* (Sigma) e 500mM de n-butanol e 1 ml de hexano na presença de lipase de *Mucor miehei* - Lipozyme (10% do peso do substrato). A reação foi terminada pela separação da lipase do produto de reação por centrifugação.

A lipase de *Mucor miehei* comparada com a enzima lipolítica de *Candida cylindracea*, *Penicillium cyclopium* e *Rhizopus arrhizus* demonstrou ser a mais efetiva no enriquecimento de ácido γ - linoléico no processo de esterificação de ácidos graxos de óleo produzidos por fungos em butanol.

A síntese enzimática de ésteres de carboidrato em 2- pirrolidona foi estudada por **JANSSEN et alii** 1991. A esterificação de sorbitol e ácidos graxos, mediada por lipase, foi investigada através de um sistema de 2 fases com 2-pirrolidona como solvente do sorbitol. A lipase de *Chromobacterium viscosum* mostrou uma taxa de esterificação inicial de 1,4 mMol g⁻¹ h⁻¹, e após 74 horas, 80% do conteúdo inicial de sorbitol foi convertido em ésteres de sorbitol. Com frutose ou glicose como substrato, taxas iniciais de esterificação foram de 0,2 e 0,04 mMol g⁻¹h⁻¹,

respectivamente. Os efeitos das concentrações de sorbitol, ácidos graxos, água e 2-pirrolidona na atividade de esterificação foram estudados. Uma concentração excessiva de ácidos graxos e água (1M), fez-se necessária para melhor produção de ésteres. O co-solvente orgânico polar 2-pirrolidona pode inativar a lipase. Este é um co-solvente apropriado para carboidratos em baixas concentrações. A esterificação foi estudada também em reator de membrana de duas fases. Os valores de reação inicial enzimática foram a metade da razão de reação num sistema de emulsão. A atividade de água num sistema de membrana foi relativamente alta, resultando em baixo rendimento de produto.

Em 1992, **BLOOMER *et alii*** estudaram a síntese de ésteres de ácido graxo e etanol por lipase de *Rhizomucor miehei* E.C.3.1.1.3 com o objetivo de aumentar o rendimento da reação pela evaporação da água produzida pelo sistema. Isto permitiu uma produção mais rápida dos ésteres, tendo o refluxo de pentano ou hexano. O procedimento geral da reação dispunha de 400 mg de substrato, ácidos graxos poliinsaturados (ácido oléico, ácido linoléico, ácido α -linoléico, ácido γ -linoléico, ácido araquidônico, ácido docosahexanóico e ácido esteárico) e 1,25 molar de etanol e como solvente 20 mL de pentano com 80 mg de Lipozyme. Altos rendimentos foram obtidos na síntese dos ésteres e sem a ocorrência da peroxidação das duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados.

Proporções molares de etanol: ácido esteárico de 1:1, 1,25:1, 1,5: 1 e 3: 1 foram usadas para testar a influência da quantidade de substrato no tempo de reação.

A síntese de etillaurato em escala foi obtida com 50 g de ácido esteárico e 12,8 ml de etanol (1,25 molar), dissolvidos em 200 mL de hexano; sendo esta conversão obtida em 50 minutos.

Utilizando a lipase de *Mucor miehei* (Lipozyme™), **GHOSHAY et alii** em 1992, preparou ésteres de ácidos ricinoléico de cadeia longa (extraídos a partir do óleo de mamona), como decilricioleato, dodecilricinoleato, tetradecilricioleato, hexadecil e octadecilricinoleato e álcool de cadeias C₁₀ a C₁₈ puro, com alto rendimento.

A formação dos ésteres foi analisada através da cromatografia em camada delgada (CCD). O sistema de solventes (fase móvel) utilizados para a cromatografia foi composto de: hexano, éter etílico e acético na proporção: 90:10:1 (v/v/v), respectivamente. Em relação à tensão superficial, foi verificado que o éster tetradecilricinoleato, dentre os monoglicerídeos obtidos, foi o que apresentou a melhor ação tensoativa de acordo com as medidas de tensão superficial relatadas.

PECNIK et alii 1992, estudaram a síntese de ésteres de ácidos graxos por lipase imobilizada 1,3 específica de *Mucor miehei* (Lipozyme™). A síntese de 1,2- isopropilideno glicerol ocorreu por catálise ácida e condensação de glicerol e acetona com ácido oléico na presença da lipase de *M. miehei* (Lipozyme™), produzindo 1,2- isopropilideno-3-oleilglicerol. Os melhores parâmetros (temperatura e pressão) e concentrações (enzima/ substrato) foram investigados.

BENNETT et alii 1992, estudaram a síntese biocatalisadora do adoçante dissacarídeo sucralose, utilizando tetraclororafinose como intermediário. O procedimento realizado neste estudo, envolve a cloração química da rafinose para formação do intermediário tetraclororafinose, seguida da hidrólise enzimática da ligação α -1,6 glicosídeo do tetradeoxigalactorafinose para produzir sucralose e 6-clorogalactose. Preparações comerciais enzimáticas e de microrganismos foram utilizados para selecionar α -galactosidase com alta atividade catalítica. A enzima de maior atividade foi produzida pela cultura de *Mortierella vinacea*, com uma taxa máxima de 118 μ mol de sucralose/seca de células/hora, com 5% da atividade dirigida à rafinose, e K_m de 5.8 mM dirigida a tetradeoxigalactorafinose (TCR). A enzima testada, também poderia ser utilizada na forma de micelas, ou na forma de reator de coluna contínua. A reação também foi estudada em solvente orgânico (metil isobutil cetona) para a melhor solubilidade do TCR e aumentar a produtividade volumétrica. Síntese de rafinose foi obtida de soluções aquosas de galactose saturadas e sacarose, usando α -galactosidase isolada de *Aspergillus niger*.

AKOH em 1992, estudou as propriedades de emulsificação dos poliésteres e mistura de ésteres de sacarose, poliésteres de carboidratos e ácidos graxos. Vários poliésteres de carboidratos e ácidos graxos, substitutos potenciais de gordura, foram examinados por suas habilidades de reduzirem as tensões superficialmente e interfacialmente sozinhos ou em misturas com emulsificantes comerciais. Emulsificantes comerciais de ésteres de sacarose ou poliésteres de carboidratos e ácidos graxos e

suas propriedades de surfactantes, foram examinadas por sua habilidade de reduzir tensões superficialmente e interfacialmente em diferentes concentrações, e por estabilizarem emulsões alimentícias A/O e O/A em temperatura ambiente e refrigerada. Em geral, quando usados sozinhos, os poliésteres de carboidratos foram excelentes estabilizadores de emulsões A/O e ruins para O/A. Misturas de poliésteres de carboidratos com emulsificantes comerciais hidrofílicos (S-1670), produziram emulsões estáveis O/A e instáveis A/O. Esses resultados sugerem que misturas de emulsificantes de substitutos potenciais de gordura com emulsificantes comerciais de ésteres de açúcares, podem ser usados em alimentos dietéticos, cosméticos e emulsificantes A/O e O/A na área farmacêutica.

JONES et alii 1992, descreveram um método que visa a proteção da hidroxila 6 primária da sacarose. Esse método envolve a produção de glicose-6 acetato por fermentação de glicose, usando linhagem de *Bacillus megaterium*, seguida pela conversão da sacarose-6-acetato como um produto cinético, usando uma frutossiltransferase produzida por uma linhagem de *Bacillus subtilis*. A sacarose 6-acetato foi descoberta sendo mais lipofílica do que o esperado e esta propriedade auxiliou na purificação por cromatografia. A sacarose-6-acetato pura pôde ser cloridada e subseqüentemente diacetilada para fornecer o adoçante de alta intensidade 4,1,6 - tricloro - 4,1,6 Trideoxigalactosucrose (sucralose) em altas taxas. Foi relatada intensidade nas moléculas de açúcar que foram sintetizadas por métodos similares, incluindo 4,1,6 -Tricloro, 4,1,6 - Trideoxi-L-arabinosacarose e 4, 1, 6- tricloro- 4, 6, 1, 6 tetradeoxigalactosacarose.

Eles foram obtidos de xilose e 6- deoxiglicose respectivamente, via intermediação da xilsacarose e 6- deoxiglicose, formados pela reação da frutossiltransferase em aceptores monossacarídeos.

MUTUA & AKOH 1993, estudaram a síntese de ésteres de ácidos graxos alquil glicosídeos em meio não aquosos por ação da lipase de *Candida sp*. Ésteres de ácidos graxos alquil glicosídeos são sintetizados com sucesso através da transesterificação de metilglicosídeos, metilgalactosídeos e octilglicosídeos, catalisada por lipases. Os experimentos foram conduzidos em meio orgânico com lipases de *Candida sp* como biocatalisadores. Foram estudados o tempo de reação e produção de ésteres, efeito da temperatura, tipo de solvente, concentração de substrato, adição de água, relação entre a enzima imobilizada e não imobilizada. As condições ótimas para a síntese enzimática foram: uma proporção molar de alquilglicosídeo e metiloleato de 1: 4, a lipase imobilizada de *Candida sp* (SP 382), benzopiridina 2:1 sem adição de água, temperatura de 55° C, tempo de reação de 48 horas e agitação de 200 rpm. Foram encontrados níveis aceitáveis de incorporação de ácido oléico nos alquilglicosídeos (58,6 a 100 mol%).

OGUNTMEIN et alii 1993, estudaram a síntese de ésteres de carboidratos, catalisados por lipases em solventes orgânicos. Neste estudo, foram utilizadas lipases de *Candida* e *Mucor miehei*, que catalisaram a síntese de ésteres dos monossacarídeos glicose e frutose e ácido esteárico em álcool terc- butil, com rendimento de 10 a 24%. Os dissacarídeos sacarose, maltose e palatinose foram também testados

para a produção de ésteres de carboidratos. Os autores observaram que na presença de fenil ou ácido butil borônico, a síntese de ésteres de glicose apresentou maior rendimento em solventes como hexano, heptano, benzeno e tolueno. Na síntese de ésteres de dissacarídeos, foi observado que o dissacarídeo mais efetivo na produção de ésteres foi a palatinose.

OHNISHI et alii 1994, estudaram a produção de lipase de *Aspergillus oryzae* em cultura semi-sólida, e verificaram que o fungo cresceu em meio semi-sólido, porém produziu pouca quantidade de lipase. Os autores concluíram que isto pode ser resultado da degradação da lipase pela quantidade de protease que também foi produzida.

AKOH em 1994, estudou a síntese de ésteres de ácidos graxos acetilados de glicose em solvente orgânico. Para este estudo, foram utilizadas as lipases imobilizadas de *Candida antartica* (SP382) e *Candida cylindracea* (200 I). Estas lipases catalisaram a síntese de ésteres acetilados de ácidos graxos de glicose com penta acetato de glicose (GP) e Trisum 80 (80% ácido oléico), óleo vegetal ou oleato de metila como substratos em solventes orgânicos. O rendimento foi de 6,4 a 52% e a taxa de incorporação de ácido oléico na glicose foi de 31 a 100%. Na reação, estas enzimas foram capazes de catalisar a síntese de ésteres de ácido graxo de glicose livre como substrato. A taxa de maior incorporação de ácido oléico (100) foi obtida em benzeno com lipase (SP382) e Trisum 80 como doador de grupo acil. Quando se utilizou oleato de metila como doador de grupo acil, a taxa de incorporação obtida

em benzeno foi de 90,5% e 75% em isooctano. A lipase de *Candida cylindracea* (200 I) apresentou maior taxa de incorporação (74%) em sistema composto por benzeno:piridina (2:1 v/v) e clorofórmio (61%) e menores taxas em sistemas contendo benzeno ou isooctano puros.

Entretanto, em sistema composto por glicose livre e Trisum 80 como substratos, ambas enzimas tiveram níveis aceitáveis de incorporação de ácido oléico (82-100%) em solventes como benzeno, benzeno:piridina. As melhores condições para a reação foram: lipase (10% do peso do substrato), tempo de incubação de 48 horas, proporção de Trisum: penta acetato de glicose (1:2) respectivamente, 3 mL de solvente e 3% de água. Estes ésteres podem ser utilizados como emulsificantes na área de alimentos, cosméticos e formulações farmacêuticas.

ZAKS et alii, em 1994, relataram a produção de monoglicerídeos por transesterificação de triglicerídeos, catalisadas por lipases em meio alcoólico. No processo realizado, a enzima selecionada foi adicionada a uma emulsão de triglicerídeos em meio alcóolico contendo uma certa quantidade de água. A lipase selecionada foi adicionada no meio de reação e a suspensão é formada, devido ao fato que as lipases são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. A suspensão foi agitada até completar a reação. Após a reação, a enzima foi removida, e os monoglicerídeos produzidos foram separados da mistura reativa. O rendimento do processo foi de 90%. O processo apresentado fornece alto rendimento de β - monoglicerídeos tendo estrutura única, chamados de monoglicerídeos acilados na posição β . Ao contrário, os métodos

químicos tradicionais resultam apenas em monoglicerídeos α - acilados. O processo apresentou diversas vantagens, incluindo baixa formação por produto, condições brandas de reação, fácil separação do produto e formação de ésteres de ácidos graxos, como segundo produto da reação. Os ésteres de ácidos graxos formados podem ser usados diretamente na indústria cosmética ou como material de síntese de vários produtos, tais como álcoois graxos, aminas, etc. A estabilidade operacional da lipase biocatalisadora manteve-se elevada e a biocatalização pode ser facilmente reutilizada. A reação pode ser efetuada em temperatura ambiente ou levemente alta. O processo citado anteriormente, quando comparado com os processos tradicionais, teve a vantagem de exigir pouca hidrogenação de triglicerídeos altamente insaturados e temperaturas brandas de destilação.

SARNEY *et alii* 1994, estudaram a síntese química de ésteres de dissacarídeos de ácidos graxos. A utilização de enzimas para a produção de surfactantes têm sido ativamente exploradas nos últimos anos. Dentre as vantagens do método enzimático relatadas pelos autores, estão as condições de reações brandas e a alta seletividade enzimática. Embora recentes relatos têm aceito a preparação de monossacarídeos e ésteres alquil glicosídeos, a síntese de ésteres de dissacarídeos permanecem um desafio. Isto é devido à baixa solubilidade de dissacarídeos em solventes orgânicos, que são geralmente considerados apropriados para a biocatálise, uma vez que poucas enzimas são conhecidas por reter a atividade catalítica em piridina ou dimetilsulfóxido (DMSO), podendo solubilizar estes açúcares em altas concentrações.

Para resolver este problema, os autores adotaram uma alternativa previamente desenvolvida para o preparo de ésteres de monossacarídeos de ácidos graxos, chamada acetalização de dissacarídeos que foi tentada para melhorar sua solubilidade com ácidos graxos, evitando o uso de solventes muito polares no meio de reação. Os autores descrevem a síntese de monoésteres de lactose e maltose enzimaticamente preparados para corresponder aos dissacarídeos acetilizados. Foi obtido um produto final com bom rendimento, após a hidrólise ácida catalisada dos grupos acetatos.

SARNEY *et alii* 1995, fizeram uma revisão sobre a aplicação de enzimas em síntese de surfactantes. O trabalho sugere dois métodos para síntese de ésteres de açúcares e ácidos graxos. O primeiro método foi baseado no uso de solventes orgânicos, dimetilsulfóxido ou piridina, capaz de solubilizar ambos os substratos e o segundo método em meio isento de solvente orgânico. Outra alternativa é o emprego de carboidratos acetilados, pois facilita a solubilidade dos reagentes. Os produtos finais, ésteres de ácidos graxos com mono e dissacarídeos, foram obtidos por catálise com lipases e com alto índice de rendimento.

ADELHORST *et alii* 1995, preparam 6-O-monoéster de alquilglicopiranosídeo com rendimento de 90%, através da catálise enzimática direta. A esterificação de sacarose ou glicose com ácidos graxos de cadeia curta ($C_8 - C_{10}$) e longa ($C_{12} - C_{18}$) ocorreu em meio isento de solvente orgânico sob agitação à 70° C com catálise de lipases imobilizadas de *Candida antarctica* e *cylindracea*, *Humicola sp* e

Pseudomonas sp. Dentre as enzimas estudadas, a lipase de *C. antarctica* foi a mais estável à temperatura, enquanto as lipases de *Pseudomonas cepacia* e *C. cylindracea* foram as que mostraram menores rendimentos catalíticos. Também foi observado que as reações mais rápidas ocorreram com ácidos graxos de cadeia longa ($C_{12} - C_{18}$) quando comparados com os ácidos graxos de cadeia curta ($C_8 - C_{10}$). Este efeito comprovou a preferência geral de lipases por *substratos* lipofílicos.

Estudos de especificidade de ácidos graxos pela lipase de *Rhizomucor miehei* contra 20:1n-9, 20:5n-3, 22:n-9 e 22:6n-3, foram realizados por **PEDERSEN et alii**, em 1995. Este estudo foi realizado comparando-se a alcoólise em propanol de várias misturas de ácidos graxos com cadeias carbônicas entre C_{20} e C_{22} (FFA), ou seus etil-ésteres correspondentes (FAEE) em n-heptano. Para todos os ácidos graxos examinados, o grau de conversão foi muito maior quando se utilizou ácidos graxos em relação aos etil - ésteres. A lipase apresentou alta especificidade contra o substrato 20:1n-9, e menor especificidade em relação aos ácidos graxos poliinsaturados, especialmente 22:6n-3. O grau de conversão de ácidos graxos n-3, apresenta uma clara preferência para 20:5n-3 sobre 22:6n-3, não somente quando este se apresenta sozinho ou nas diferentes misturas examinadas.

COULOND et alii 1995, realizaram estudos de comparação de esterificação direta e transesterificação de frutose por ação da lipase de *Candida antarctica*. Neste estudo, a síntese de frutose oleato foi realizada em fermentador pela lipase imobilizada de *Candida antarctica* em sistema

de reação com ou sem solventes orgânicos. No entanto, quando se utilizou solvente orgânico no sistema de reação, foi obtido 65% e 46% de conversão de frutose por transesterificação e esterificação respectivamente.

LINKO et alii 1995, estudaram a síntese de ésteres de butil oleato e por ação de 25 lipases comerciais, entre estas, as lipases de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizomucor miehei* apresentaram maior rendimento na síntese de butil oleato no teor de 85,5%, 87,3%, 87% e 84,6%, respectivamente. O efeito da proporção molar 1-butanol/ácido graxo e a concentração da enzima foram investigados. Foi encontrado que, na proporção molar de álcool/ácido graxo, 0,5:1,0 a síntese de 80% do éster foi produzida pela lipase de *Candida rugosa*. Para as lipases de *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas fluorescens* a síntese de 90% de éster foi observada na proporção molar 2:1. A lipase de *Rhizomucor miehei*, apresentou uma taxa de produção de butil oleato de apenas 40% na proporção molar 3:1. Em relação ao efeito da concentração da enzima, foi observado um aumento na produção de butil oleato em cerca de 100% quando se utilizou 3,2% de extrato enzimático para a lipase de *Rhizomucor miehei*. Para as outras lipases, não foi observado nenhum efeito o aumento da concentração da enzima na produção do éster.

A esterificação de ácido oléico com glicerol na presença de catalisador óxido de ferro sulfatado foi pesquisado por **GUNER et alii** 1996. A esterificação ocorreu com quantidades equivalentes de reagentes a uma temperatura entre 180-240°C, com agitação à 200 rpm, e nitrogênio (gás inerte, 200mL/min) foi passado sobre a superfície da mistura de reação para garantir uma atmosfera inerte e para remoção de água. O efeito do catalisador na cinética da reação em diferentes temperaturas foi relatado.

Ésteres de carboidratos utilizados como surfactante na esterificação, por lipase, de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa em sistema isento de água, em hexano, foram estudados por **BASHEER et alii**, 1996. Lipases de diferentes fontes foram, inicialmente, tratadas com surfactante do tipo ésteres de carboidratos para garantir a dispersibilidade em solventes apolares. Esta técnica permitiu altos rendimentos de biocatálise. O valor do balanço hidrofílico-lipofílico, o ácido graxo de cadeia longa e os ésteres usado para modificar as lipases, influenciaram significativamente na atividade de esterificação pelo complexo lipase-surfactante.

Aspergillus sp linhagens n° 1068 e 1099 foram selecionadas e isoladas por **COSTA & PASTORE** em 1996, por apresentarem alta produção de lipase. A lipase de *A. sp* n° 1099 hidrolisa preferencialmente gordura do leite de cabra e não apresenta afinidade pelo substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato. A lipase de *A. sp* n°1068 hidrolisa preferencialmente gordura de côco, tem pequena atividade contra óleo de

oliva e apresenta afinidade pelo substrato *p*-nitrofenil-laurato. Devido à sua maior atividade lipolítica, esta enzima foi selecionada para o estudo de purificação enzimática. A reação de esterificação entre ácido oléico e glicerol pela lipase de *Aspergillus sp* no1068 foi pesquisada e verificou-se que a enzima esterifica o ácido oléico e glicerol, produzindo mono, di e trioleína.

HAYES et alii 1996, fizeram uma revisão sobre a atividade catalítica de lipases. Ácidos graxos hidroxilados, originados de fontes naturais e sintéticas, tem muitas aplicações em cosméticos, lubrificantes e na indústria de alimentos. O trabalho relatou a ação de lipases em hidroxiácidos e derivados. Lipases de *Pseudomonas sp* e da porção pancreática são usados com sucesso para a produção de lactonas. As lipases também catalisam reações entre hidroxiácidos e álcoois originando hidroxiésteres como maior produto.

SKAGERLIND et alii 1997, estudaram a síntese de éster glicosídico em microemulsão. O surfactante, etil-6-o-decanoil glicosídico, foi sintetizado por catálise lipolítica. A lipase usada foi de *Candida antarctica*. A microemulsão foi feita com dois substratos para a reação, etilglicosídico e ácidos graxos tendo sais de ácidos graxos ou éster glicosídico como surfactante. Pressão reduzida foi usada para eliminar a água de condensação. Surfactantes de boa biodegradação e baixa toxicidade tem tido considerável interesse. Ésteres de açúcares preparados por condensação de um ácido graxo com um mono ou dissacarídeo, são exemplos de surfactantes não iônicos.

Lipases que catalisam esta condensação em sistema aquoso tem sido relatadas, porém os rendimentos são baixos. Altos rendimentos podem ser obtidos em sistemas com solventes orgânicos, como a piridina, álcoois terciários ou quaternários ou usando sistema bifásico, sendo uma com água e açúcar e a outra com ácido graxo ou etilglicosídeo dissolvido em ácido graxo liqüefeito, com lipases imobilizadas. Para obter altos rendimentos, a escolha do sistema de reação é importante. O rendimento da reação foi significativo, com conversão de ácidos graxos e etilglicosídeo alcançando 77% e 96%, respectivamente.

COSTA & PASTORE 1997, caracterizaram uma lipase fúngica de uma linhagem de *Rhizopus sp* ainda não relatada na literatura. A lipase bruta teve sua atividade hidrolítica testada contra os substratos de gordura de côco, óleo de oliva, óleo de mamona, gordura do leite de cabra e substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato. A enzima mostrou maior atividade para hidrolisar gordura de côco, frente aos outros substratos.

O extrato enzimático bruto foi parcialmente purificado em coluna de DEAE-Sephadex A-50, sendo obtidas duas frações, as quais foram submetidas a testes bioquímicos para caracterização de suas propriedades. As frações apresentaram atividade em temperatura na faixa de 40 a 55°C e temperatura de estabilidade na faixa de 24 a 40°C, e, pH ótimo de 6,0 a 6,5 e estáveis no pH entre 5,6 a 7,5, semelhante a enzima bruta.

SHAHIDI et alii 1997, pesquisaram a síntese enzimática de acilgliceróis a partir de glicerol e concentrados de ácidos graxos ω -3 de óleos marinhos, em solvente orgânico. Sete lipases foram usadas para a biocatálise de esterificação. A lipase LP-401-AS de *Chromobacterium viscosum* mostrou alto rendimento para esta reação. Efeitos dos parâmetros reacionais desta lipase foram estudados, a saber: temperatura, curso da reação, concentração da enzima, e volume de solvente. O grau de síntese de acilglicerol foi de 94,3%. A concentração de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis foi 13,8, 43,1 e 37,4%, respectivamente.

GANDHI 1997, fez uma revisão de aplicações de lipases. Segundo o autor, lipases podem ser empregadas na produção de produtos farmacêuticos, cosméticos, detergentes, alimentos e perfumarias, diagnósticos médicos e síntese de materiais orgânicos. O autor também relata as vantagens da utilização de lipases nas reações de hidrólise de óleos e gorduras em relação à hidrólise química, devido as condições brandas de temperatura e baixo custo, tornam este grupo de enzimas muito atrativo sob o ponto de vista industrial. A habilidade de lipases catalisarem a reação de síntese como a esterificação é discutido. Lipases podem catalisar a síntese de ésteres em sistemas de reação contendo ou não solventes orgânicos. Ésteres de ácidos graxos de baixo peso molecular como acetato de geranil, isoamil butirato e benzil propionato, são exemplos de ésteres produzidos por ação de lipases e que são largamente utilizados devido as suas qualidades aromáticas e de "flavor".

Ésteres de butil laurato são um dos componentes na composição de “flavors”, especialmente para os pêssego, o que aumenta o interesse industrial, devido a sua potencial aplicação na área de alimentos.

TSITSIMPIKOU *et alii* 1998, estudaram a acilação de glicose catalisada por lipases em dióxido de carbono supercrítico. A acilação de glicose e ácido láurico em sistema de reação catalisada por lipases de *Candida antarctica* e *Candida rugosa* e *Mucor miehei*, foi investigada. Foram realizados estudos do efeito da temperatura na atividade enzimática, efeito da atividade de água inicial e proporção molar entre glicose e ácido láurico. Foi verificado que, a lipase de *Candida antarctica* manteve-se estável em temperaturas acima de 70°C, enquanto que a lipase não imobilizada de *Candida antarctica*, teve a temperatura ótima de reação à 60°C. A reação de acilação foi dependente da atividade de água (aw) inicial para os dois substratos e enzimas; foi encontrado um valor de 0,75 de aw inicial para a lipase de *Candida antarctica*, 0,53 para a lipase de *Candida rugosa* e entre 0,3 a 0,5 para a lipase de *Mucor miehei*. Em relação a proporção molar açúcar/ ácido graxo, a lipase de *Candida rugosa* foi mais ativa na proporção molar 1:3, enquanto que a proporção ótima encontrada para as lipases de *Mucor miehei* e *Candida antarctica* foi de 1:6.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 MATERIAL.

4.1.1 Reagentes e Materiais Específicos.

Reagentes químicos: ácidos, álcalis, sais minerais, solventes (MERCK, CARLO ERBA, RIEDEL ou equivalente).

Reagente específico: Ryoto Sugar Ester (MITSUBISHI CHEMICAL INDUSTRIES LTDA).

Ácidos Graxos: ácido láurico, ácido caprílico, ácido oléico (RIEDEL e SIGMA).

Glicerídeos: 1 (3)- monoleína, 1.2 (1.3) dioleína, trioleína, óleo de oliva comercial.

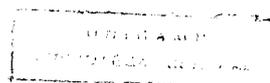
Meios de Cultura: PDA (Potato Dextrose Ágar), BHI (Brain Heart Infusion).

Meio de fermentação semi-sólido: farelo de trigo comercial e água destilada.

- Placas de vidro 24x24 cm, Sílica Gel G-60 (MERCK).
- Coluna de fase reversa ODS-RP-18 de diâmetro interno de 4,6 mm, DP 5 μ , 25 cm de comprimento.

4.1.2 EQUIPAMENTOS.

- Estufas de cultura, mod. 002 CB, FANEN.
- Estufas bacteriológicas, FANEN.
- Autoclave vertical, PHOENIX.
- Banho termostático, GILSON.
- Banhos térmicos de temperatura controlada, FANEN.
- Agitadores magnéticos com aquecimento, QUIMIS.
- Potenciômetro, DIGIMED TE-902.
- Espectrofotômetro, BECKMAN DU-70.
- Agitador de tubos mod. AT-56, PHOENIX.



- Centrífuga refrigerada mod. J2-21, BECKMAN.
- Balança semi-analítica OHAUS^(R) Precision plus, TECNAL.
- Balança analítica mod. H-10, METTLER.
- Cromatógrafo WATERS 600-E Power Line com detector WATERS 484 de índice de refração e integrador ao processador Data Módulo WATERS, mod. 746.

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 PRODUÇÃO DA ENZIMA.

4.2.1.1 Preparo do Inóculo.

Para produção da enzima foi utilizada cultura de *Rhizopus sp* LB- FEA-14 (linhagem pré selecionada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos- FEA- UNICAMP) cultivada em meio de PDA (Potato Dextrose Agar). Foi preparada uma suspensão de esporos, adicionando-se 10 mL de água estéril em tubo contendo a cultura selecionada, a superfície do tubo foi raspada com alça de níquel-cromo para remoção dos esporos.

4.2.1.2 Fermentação Semi-sólida.

Foi preparado meio de fermentação semi-sólida constituído de farelo de trigo e água na proporção de 60:40 (p/v) e colocados em erlenmeyer de 500 mL. Este meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos à 120°C. Ao meio foi adicionado 1mL de inóculo descrito no item acima e incubados à 30°C por 120 horas, em estufa termostaticada para a produção da enzima.

4.2.1.3 Extração da Enzima.

Após o período de incubação, os frascos erlenmeyer foram retirados da estufa, adicionados 100 mL de água destilada, e em seguida, deixados em repouso por cerca de uma hora. Após este período, o meio foi homogeneizado com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro, para obtenção do extrato aquoso contendo a enzima bruta.

4.2.1.4 Fracionamento com Sulfato de Amônio.

Ao extrato aquoso foi adicionado sulfato de amônio até 70% de saturação. Esta etapa foi realizada em banho de gelo para manutenção da atividade da enzima. A mistura permaneceu sob refrigeração por 12 horas. Após este período, o extrato foi centrifugado a 7000 rpm / 4°C, por 15 minutos. O precipitado, contendo a enzima bruta, foi dialisado contra água deionizada em membrana de acetato de celulose à temperatura de 10°C, por 48 horas. Posteriormente, a enzima bruta foi liofilizada e mantida em freezer.

4.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA DA ENZIMA BRUTA.

4.2.2.1 Determinação da Atividade Lipolítica no Substrato de Óleo de Oliva.

A um sistema contendo 1 g de óleo de oliva e 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M pH 6,0, foi adicionado 1mL do extrato bruto enzimático na concentração de 10 mg/mL e 5 pérolas de vidro de 0,3 mm de diâmetro cada, mantidos em erlenmeyer. A mistura foi incubada em banho termostaticado à 40°C por 60 minutos, e agitado com 130 oscilações por minuto. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de etanol/acetona (1:1, v/v). A atividade da lipase foi estimada pela titulação dos ácidos graxos livres da hidrólise do óleo de oliva, com uma solução de KOH 0,05N e indicador fenolftaleína. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de lipase que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto, à 40°C por uma hora.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oléico x KOH 0,05N.

4.2.3 ESTUDO DE ESTERIFICAÇÃO DE GLICEROL E ÁCIDOS GRAXOS PELA LIPASE BRUTA DE *Rhizopus sp.*

4.2.3.1 Preparo da Mistura de Reação.

A mistura de reação para síntese de ésteres de ácidos graxos, foi composta de 8g de glicerol e 1g dos diferentes ácidos graxos (ácido oléico, láurico e caprílico) e 25mg de extrato bruto liofilizado dissolvido em 1mL de água destilada.

Cada mistura de reação foi colocada em erlenmeyer de 125 mL, com cinco pérolas de vidro de 3mm de diâmetro cada para melhor homogeneização, e foram incubados à 40°C em banho termostatizado, com agitação de 130 oscilações por minuto, por tempo de reação variável, a saber: 0h, 6h, 24h, 72h, 96h.

A reação foi paralisada com 15 mL de etanol/ acetona 1:1 (v/v) e os ácidos graxos remanescentes foram titulados com KOH 0,05N, utilizando fenolftaleína como indicador, conforme descrito no item 4.2.2.1. Este ensaio foi realizado pelo menos em triplicata.

4.2.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos Produtos de Esterificação de Ácidos Graxos e Glicerol pela Lipase Bruta de *Rhizopus sp.*

A cromatografia, em camada delgada (CCD), foi realizada preparando-se uma mistura de 45 g de Sílica Gel G-60, com 90 mL de ácido bórico 0,3M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 24x24 cm de dimensão, por 2 mm de espessura, com aplicador Desaga* e colocada para ativação em estufa a 100°C por 40 minutos.

Foi utilizado um sistema solvente constituído de éter etílico, éter de petróleo e ácido fórmico 210: 90:0,4 (v/v/v), respectivamente.

O cromatograma desenvolveu-se em aproximadamente 40 minutos, à temperatura de 25°C. A revelação foi feita através da exposição da placa em câmara de iodo sublimado, e foi incubada à 110°C por, 60 minutos.

Foram utilizados como padrões trioleína, 1,3-dioleína, 1-monoleína e ácido oléico (SIGMA), na concentração de 1% em solução etanol/acetona 1:1 (v/v).

4.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Produtos de Esterificação de Ácido Graxo com Glicerol pela Lipase de *Rhizopus sp.*

Os ésteres de ácido graxo com glicerol, presentes nas amostras da reação de esterificação, foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Utilizou-se coluna de fase reversa ODS -RP-C18 de diâmetro interno de 4,6 mm, DP5 μ , 25 cm de comprimento, à temperatura de 30°C, com fase móvel de acetona: acetonitrila 1,6:1 (v/v), com taxa de fluxo de 1 mL /minuto.

4.2.4 ESTUDO DE ESTERIFICAÇÃO DE ÁLCOOIS E ÁCIDOS GRAXOS, EM HEXANO, POR AÇÃO DE LIPASE DE *Rhizopus sp.*

4.2.4.1 Preparo da Mistura de Reação de Esterificação de Ácidos Graxos e Álcoois em Hexano.

A mistura de reação para síntese de ésteres de ácidos graxos e álcoois, em hexano, foi 250mM ácido graxo, sendo ácido oléico, ácido láurico e caprílico e ácido acético; 500 mM de álcool, sendo etanol propanol e butanol dissolvidos em 1mL de hexano e contendo 2% de extrato bruto enzimático.

Cada mistura foi colocada em erlenmeyer de 50 mL e foram incubados à 40°C, em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto, por tempo variável de: 0h, 1/2h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h e 48h. Cabe salientar que estes ensaios foram realizados pelo menos em triplicata.

A reação foi paralisada com etanol/acetona na proporção 1:1 e os ácidos graxos remanescentes foram titulados com KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador de ponto de viragem, de acordo com 4.2.2.1.

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO SISTEMA DE REAÇÃO ÁCIDO LÁURICO E BUTANOL EM HEXANO POR AÇÃO DE LIPASE DE *Rhizopus sp.*

Com o sistema reativo que apresentou maior rendimento foi feito um estudo, também em triplicata, das condições ótimas de reação onde se avaliou o efeito da temperatura, relação molar entre ácido graxo/álcool, presença de hexano e concentração de enzima.

4.2.5.1 Efeito da Temperatura na Síntese de Ésteres pela Lipase.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi realizado utilizando-se um sistema de reação composto por 250 mM de ácido láurico, 500 mM de butanol, 2% de extrato enzimático e 6 mL de hexano, 05 pérolas de vidro de 0,3 mm de diâmetro colocados em erlenmeyer de 50 mL.

A mistura foi incubada nas temperaturas de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 75°C por 2 horas, em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto.

A estimativa de síntese dos ésteres foi medida conforme descrito em 4.2.2.1.

4.2.5.2 Efeito da Concentração de Enzima na Síntese dos Ésteres.

O efeito da concentração de enzima foi realizado utilizando-se um sistema de reação composto por 250 mM de ácido láurico, 500 mM de butanol, 6 mL de hexano, 5 pérolas de vidro de 0,3 mm de diâmetro em erlenmeyer de 50 mL, à temperatura de 50°C, em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto, por 2 horas.

As concentrações de extrato bruto enzimático usadas no sistema foram: 1%, 2%, 3% e 5%. A atividade lipolítica foi verificada de acordo com o item 4.2.2.1.

4.2.5.3 Efeito da Relação Molar.

O efeito da Relação Molar foi avaliado partindo-se de uma mistura que continha 6 mL de hexano, 2% de extrato bruto de enzima e obedecendo a relação molar de ácido láurico:butanol: 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1,2:3, 3:2.

A mistura foi incubada, por 2 horas, à temperatura de 50°C em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto. A atividade foi medida de acordo com o item 4.2.2.1.

4.2.5.4 Efeito da Presença de Hexano.

O efeito da presença de hexano foi realizado com o seguinte sistema de reação: 250 mM de ácido láurico, 500 mM de butanol, 2% de extrato enzimático, 05 pérolas de vidro de 0,3 mm de diâmetro colocados em erlenmeyer de 50 mL.

Foram acrescentados aos sistemas de reação quantidades de hexano: 1 mL, 3 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL e incubados por 2 horas à 50°C, em banho termostático com 130 oscilações por minuto. Verificou-se a atividade segundo o item 4.2.2.1.

4.2.6 ESTUDO DE ESTERIFICAÇÃO ENTRE CARBOIDRATOS E ÁCIDOS GRAXOS POR AÇÃO DA LIPASE DE *Rhizopus sp.*

4.2.6.1 Preparo do Sistema de Reação para Síntese de Ésteres de Carboidratos e Ácidos Graxos em Sistema Aquoso.

Enzima e substratos foram misturados em tampão acetato 0,05M pH 5,6 e incubados à 40°C. O sistema foi colocado em agitação magnética por 96 horas.

As condições da reação enzimática obedeceram a relação molar de 0,05 mol/L carboidrato e 0,2 mol/L ácido graxo e 4 g/L de extrato enzimático.

Os glicídeos testados foram glicose, sacarose, lactose e maltose e os ácidos graxos foram ácido oléico, ácido láurico e caprílico.

A reação foi paralisada com 15 mL de etanol/ acetona 1:1 e monitorada pela titulação do ácido graxo remanescente com KOH 0,05M, usando fenolftaleína como indicador, de acordo com 4.2.2.1.

Após o término da reação o sistema foi liofilizado.

4.2.6.2 Estudo da Relação Molar entre Sacarose e Ácido Oléico na Reação de Esterificação pela Lipase LB-FEA-14.

O efeito da relação molar na reação entre sacarose e ácido oléico foi verificado a partir de 4g/L de extrato bruto enzimático, dissolvidos em tampão acetato 0,05M pH 5,6, onde se adicionou diferentes relações molares de sacarose e ácido oléico, a saber: 0,05:0,05, 0,05:0,1, 0,05:0,2, 0,05:0,3, 0,1:0,2, 0,2:0,2, 0,3:0,2 e 0,2:0,1, respectivamente. Os experimentos foram incubados à 40°C, por 96 horas, em agitação magnética.

4.2.6.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Consumo de Ácido Oléico na Esterificação com Sacarose pela Lipase.

Os ésteres de sacarose e ácido oléico obtidos foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou-se coluna de fase reversa ODS -RP-C18 de diâmetro interno de 4,6 mm, DP5 μ , 25 cm de comprimento, à temperatura de 30°C, com fase móvel de acetona: acetonitrila 1,6:1 (v/v), com taxa de fluxo de 1 mL /minuto.

4.2.6.4 Determinação da Tensão Superficial.

A tensão superficial foi medida em água destilada à temperatura de 23°C, no tensiômetro de Krüss Processor Tensiometer K12 V3.11, pelo método de placa.

Foi feita a medida da tensão da curva ascendente de concentração de 0,05g/mL, 0,10g/mL, 0,20 g/mL, 0,40 g/mL, 0,60 g/mL e 0,80 g/mL, do produto de reação liofilizado e de sugar-éster comercial como padrão.

4.2.6.5 Verificação do Potencial Bacteriostático do Éster de Sacarose e o Ácido Oléico.

Inicialmente a cultura de *Staphylococcus aureus* foi repicada em meio líquido de BHI (Brain Heart Infusion), por 24h à 37°C.

Após ativação da cultura de *Staphylococcus aureus*, a mesma foi inoculada em meio líquido de BHI, contendo 0%, 0,5%, 1,0%, 2,0% e 5,0%, do sistema de reação liofilizado.

Após 24h de incubação à 37°C, a cultura foi inoculada em meio sólido de BHI, para visualizar o crescimento. Foi analisado o crescimento do microrganismo, após o período de incubação.

Os experimentos para demonstrarem a esterificação entre carboidratos e ácidos graxos, bem como a determinação da tensão superficial e do poder bacteriostático, foram realizados pelo menos em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 Produção da Lipase em Meio Semi-sólido.

Para a produção de lipase pela linhagem de *Rhizopus sp*, foi empregado o processo de fermentação semi-sólida, utilizando-se como meio de cultivo um subproduto da indústria de panificação (farelo de trigo) e água, sendo este, um processo de baixo custo para produção de enzima fúngica, e de grande rendimento. Foi obtido 1 grama de extrato bruto enzimático, para cada 72 gramas de farelo, nas condições descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

A figura 2 apresenta o fluxograma da produção da lipase.

FUKUMOTO et alii 1963, selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger*, que produziu 21 gramas de enzima bruta para cada 53 gramas de farelo de trigo (ProcessKoji), em um período de incubação de 72 horas a 30°C.

RIVERA MUÑOZ et alii 1991, na produção de lipases microbianas, utilizaram fermentação semi-sólida, incubando fungos como *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum* e *Mucor miehei* em farelo de trigo e solução de minerais, obtendo enzimas com grande atividade lipolítica.

OHNISHI *et alii* 1994, estudaram a produção de lipase de *Aspergillus oryzae* em cultura semi-sólida, e verificaram que o fungo cresceu em meio semi-sólido, mas produziu pouca quantidade de lipase. Os autores concluíram que isto pode ser resultado da degradação da lipase pela quantidade de protease, que também foi produzida.

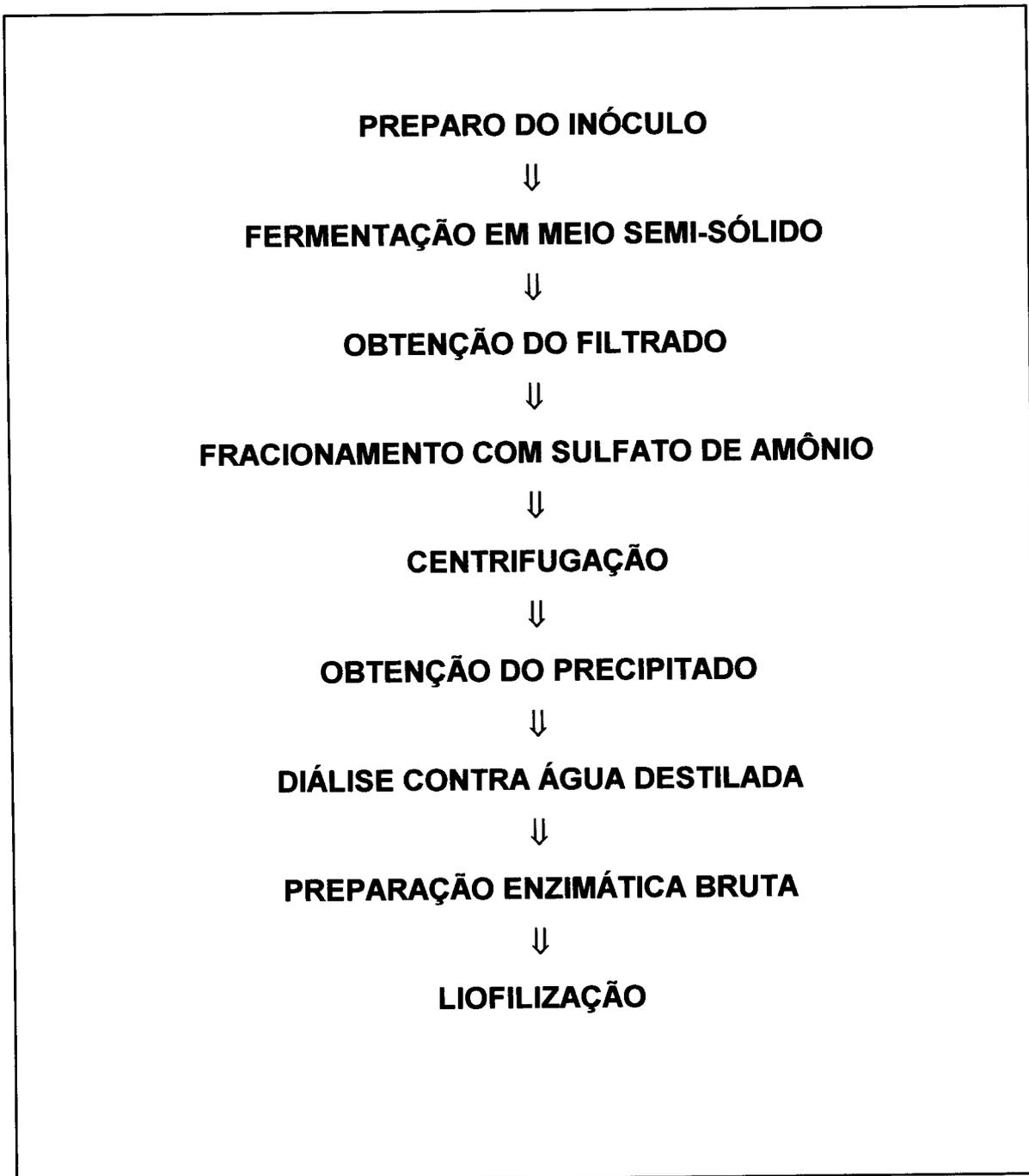


Figura 2- Fluxograma da Produção da Lipase Bruta de *Rhizopus sp.*

5.2 Estudo de Esterificação de Glicerol e Ácidos Graxos por Ação da Lipase de *Rhizopus sp.*

O estudo de esterificação de glicerol e ácidos graxos pela lipase de *Rhizopus sp* foi realizado de acordo com o item 4.2.3. A figura 3A ilustra as porcentagens de esterificação obtida em relação aos diversos sistemas de reação, devido a ação da lipase bruta de *Rhizopus sp* LB- FEA-14.

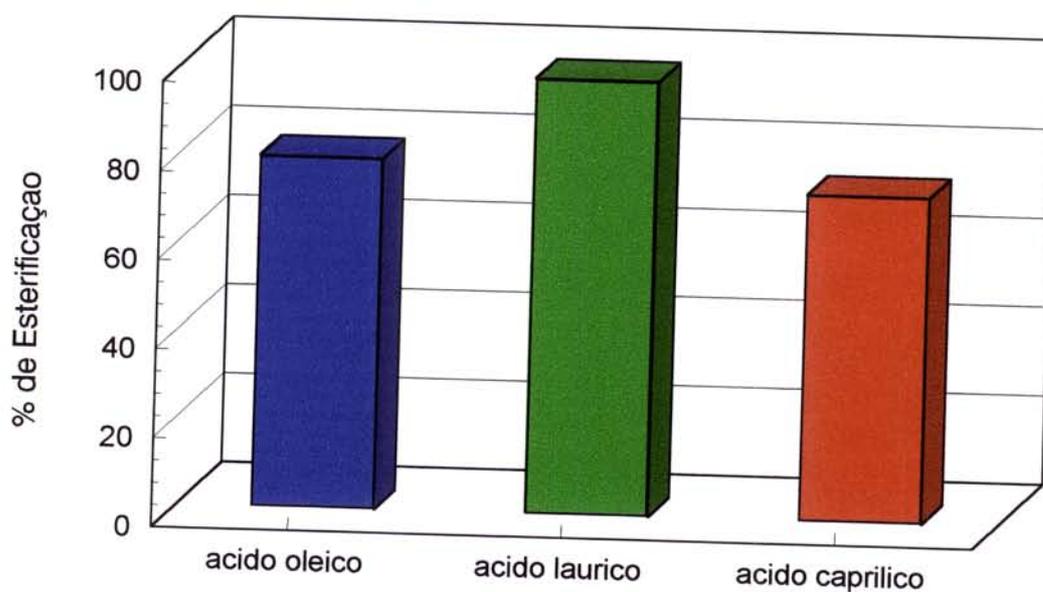


Figura 3A- Porcentagem de Esterificação Utilizando-se Diversos Ácidos Graxos.

Como pode ser observado, a maior porcentagem de esterificação foi entre glicerol e ácido láurico (C_{12}), com 93%, após 48h, na temperatura de 40°C.

O sistema glicerol e ácido caprílico (C_8) apresentou 73% de esterificação após 48h e com ácido oléico (C_{18}), nas mesmas condições de reação, 79% de esterificação.

A figura 3B apresenta a porcentagem de esterificação entre o glicerol e os ácidos oléico, láurico e caprílico em função do tempo. A figura 3C ilustra a cromatografia em camada delgada (CCD) dos produtos da reação de esterificação de ácido oléico e glicerol.

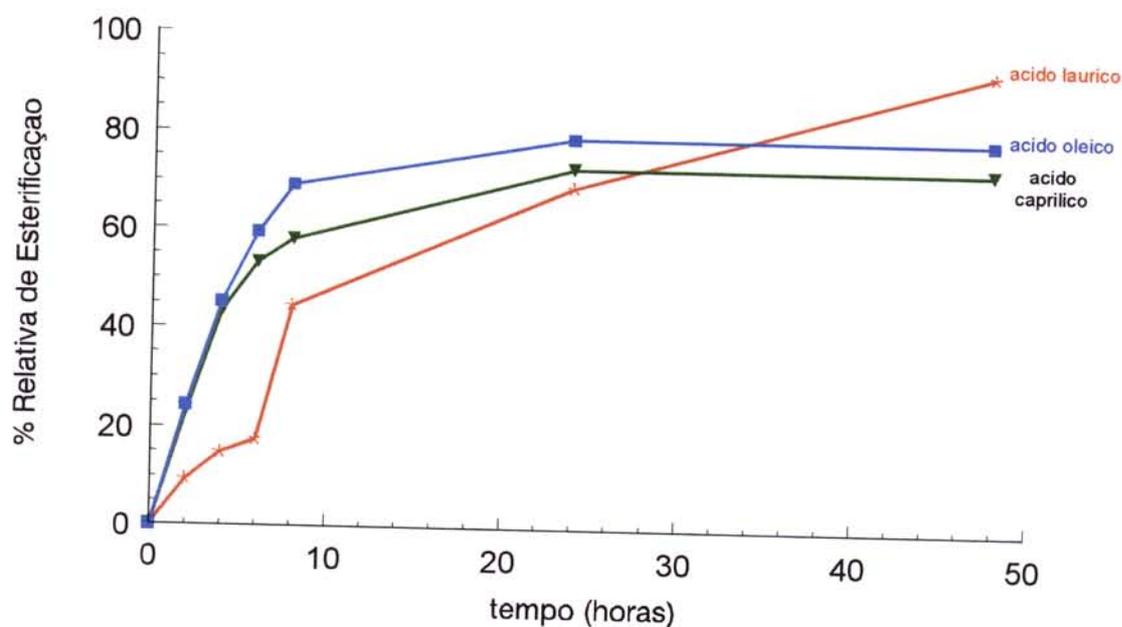


Figura 3B- Porcentagem de Esterificação em Função do Tempo de Reação.

Como pode ser observado, a atividade de esterificação, após 6 horas de reação, no sistema, contendo ácido láurico e glicerol, foi de baixo rendimento, na faixa de 25%. Porém, a esterificação com ácido oléico apresentou um rendimento em torno de 64%, sendo esta uma taxa de conversão maior que a do ácido caprílico (55%).

A figura 3D apresenta o cromatograma do consumo de ácido oléico na reação de esterificação com glicerol pela lipase LB-FEA-14.

IBRAIM et alii 1987, estudaram a síntese de glicerídeos por vários ácidos graxos de cadeias carbônicas C₂ a C₁₈, em sistema livre de solvente orgânico. Os autores verificaram que a ação de esterificação da lipase de *Humicola lanuginosa* foi mais efetiva para os ácidos graxos de cadeias C₁₂ a C₁₈, em relação aos ácidos graxos de cadeia curta.

A lipase de *Pseudomonas fragi* 22.39 B, estudada por **NISHIO et alii** 1988, catalisou a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia aberta (ácido butírico, láurico e linoléico). Foi verificado que o ganho da atividade enzimática foi proporcional ao aumento do número de carbonos da cadeia de ácidos graxos.

A esterificação de ácido oléico e glicerol através da ação das lipases de *Penicillium roquefort*, *Rhizopus delemar* e *Rhizopus niveus* foi estudada por **PARK & PASTORE**, 1989. Foi verificado que a lipase de *Penicillium roqueforti* formou como produtos de reação 1,2 (2,3) diglicerídeos, 1,3 diglicerídeos, não formando porém triglicerídeos. As lipases de *R. delemar* e *R. niveus*, formaram todos glicerídeos, inclusive triglicerídeos.

A síntese de ésteres por ação da lipase bruta de *Rhizopus oligosporus* em sistema aquoso, foi pesquisada por **ISHII et alii** 1990, apresentando altos rendimentos na produção de glicerídeos. Apesar de se obter bons rendimentos de esterificação na presença de solventes orgânicos, estudos em sistemas aquosos têm sido relatados, pois a vantagem é a ausência de toxicidade do solvente orgânico.

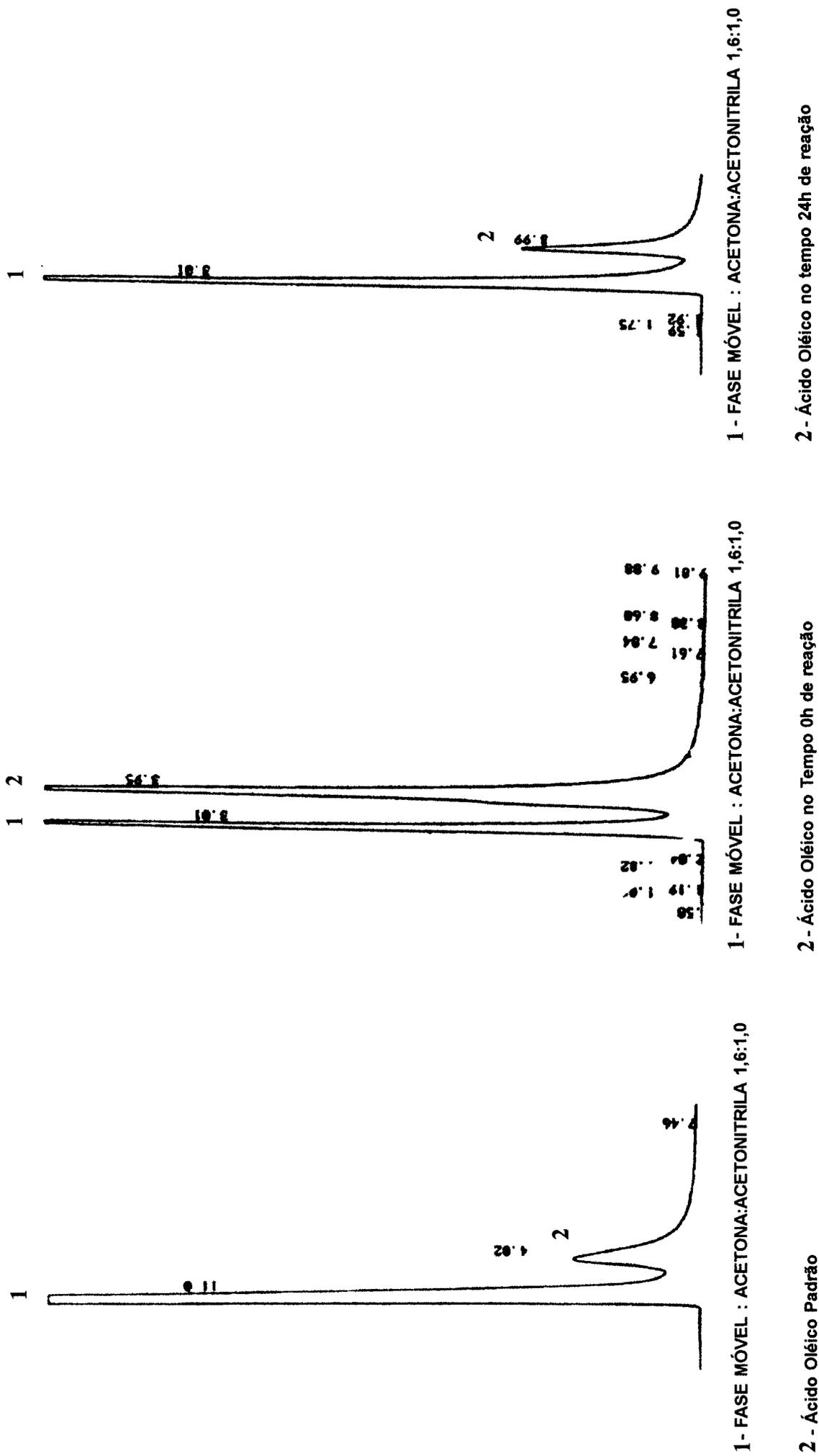
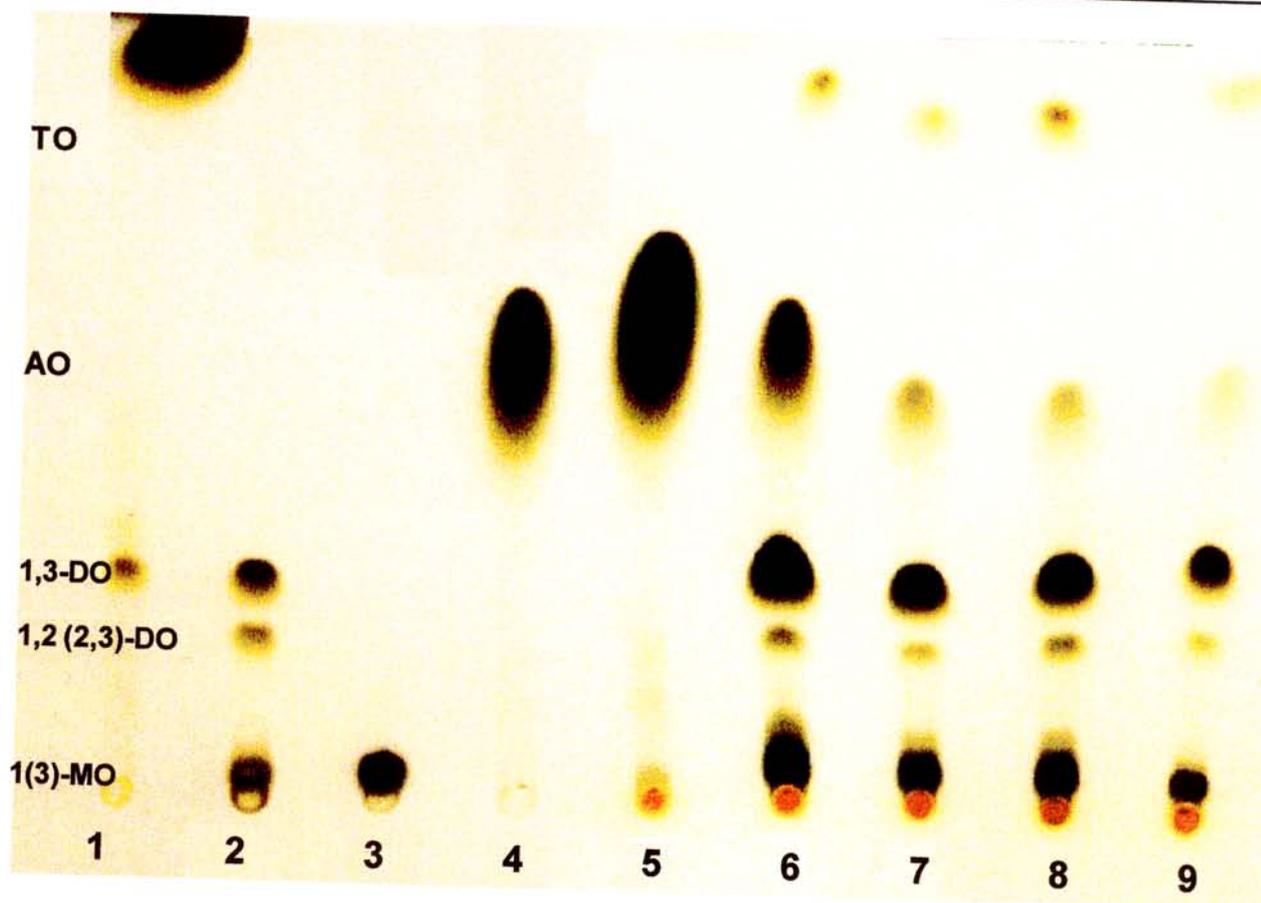


FIGURA 3D - Cromatografia Líquida da Alta Eficiência do consumo de Ácido Oléico na Reação de Esterificação com Glicerol pela Lipase de *Rhizopus sp* LB-FAA-14.



ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDO OLÉICO E GLICEROL POR LIPASE DE *RHIZOPUS sp*

- 1- Trioleína
- 2- 1,3-Dioleína
- 3- 1-Monoleína
- 4- Ácido Oléico

- 5- 0 hora de reação
- 6- 24 horas de reação
- 7- 48 horas de reação
- 8- 72 horas de reação
- 9- 96 horas de reação

Figura 3C - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Esterificação de Ácidos Graxos e Glicerol pela Lipase de *Rhizopus sp* LB-FEA-14.

5.3 Estudo de Esterificação entre Álcoois e Ácidos Graxos em Hexano por Ação de Lipase de *Rhizopus sp.*

Nos sistemas reativos de ácido oléico, ácido caprílico, ácido láurico e ácido acético, com álcoois de cadeia saturada: etanol, propanol e butanol, verificou-se o efeito do comprimento da cadeia carbônica na síntese de ésteres, conforme relatado anteriormente em 4.2.4.

A porcentagem de esterificação usando álcoois de $C_2 \approx C_4$, como substratos estão na figura 4.

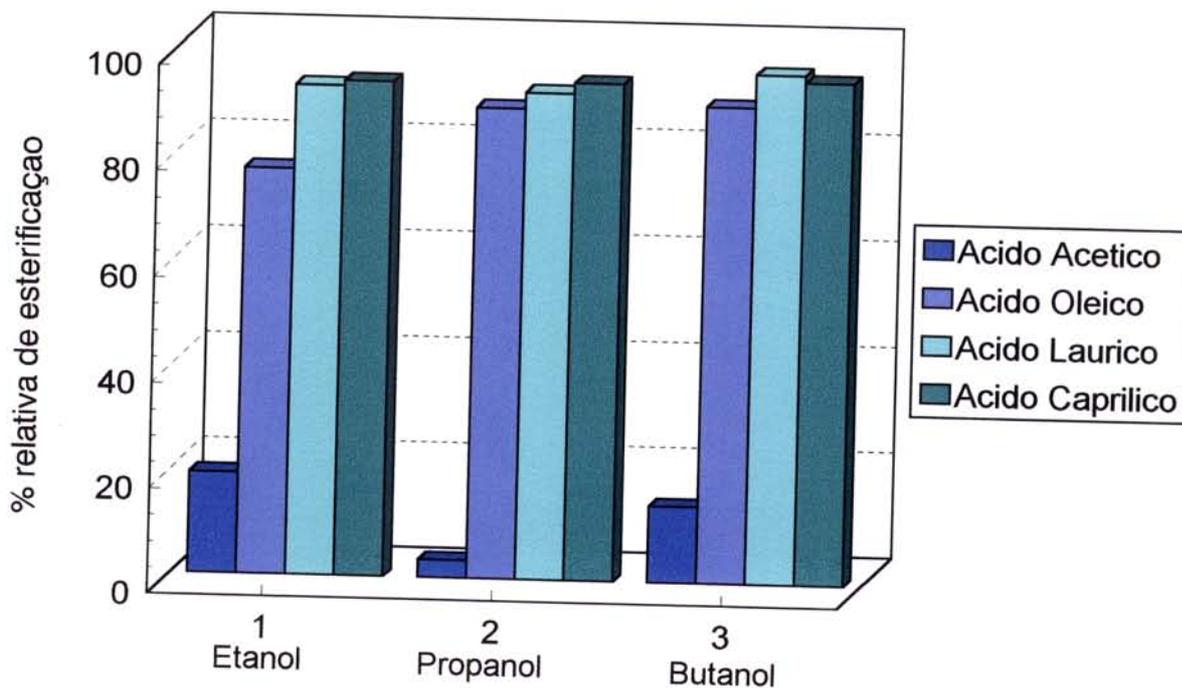


Figura 4- Porcentagem de Esterificação com Diferentes Álcoois.

Nesse experimento, pode-se verificar que a maior porcentagem de esterificação obtida, quando se utilizou etanol (C_2), foi com o ácido caprílico, no teor de 89%, após 24h de reação à $40^\circ C$. Em sistema contendo propanol e ácidos graxos, a conversão máxima foi com o ácido caprílico, no teor de 93%, após 12 horas de reação. Entretanto, quando se utilizou butanol no sistema de reação, a melhor taxa de conversão obtida (97%), foi com ácido láurico, nas mesmas condições de reação.

Nos sistemas de reação que continham etanol, propanol e butanol com o ácido acético, apresentaram baixos índices de esterificação, sendo que a máxima taxa de conversão encontrada foi em etanol com 19,3% seguida do butanol com 14,5% e propanol 3,4%. Este baixo rendimento deve-se ao baixo pH em que a enzima foi exposta, causando diminuição de sua atividade devido ao efeito desnaturante.

As figuras 4A e 4B apresentam as porcentagens de esterificação dos ácidos graxos, em hexano, com etanol.

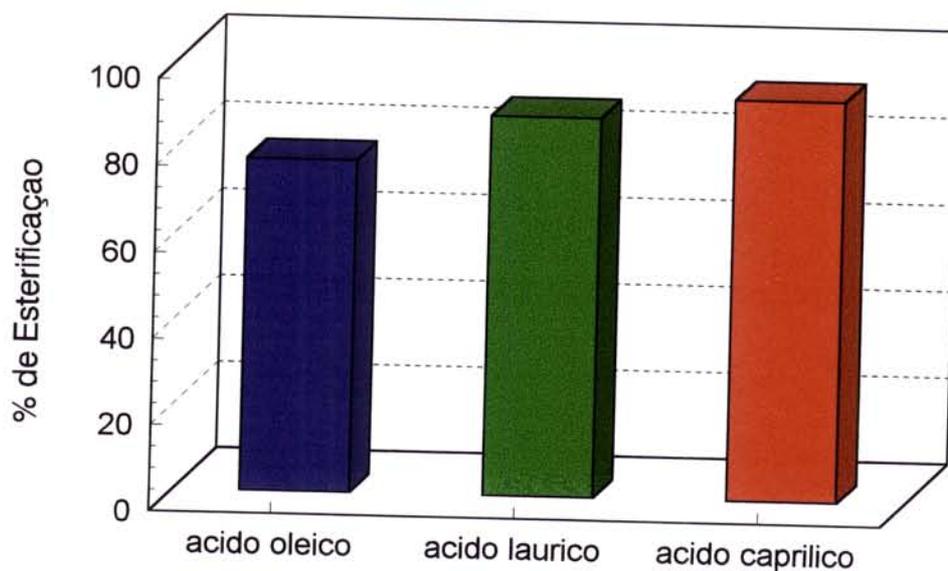


Figura 4A- Porcentagem de Esterificação com Etanol e Ácidos Graxos, em Hexano.

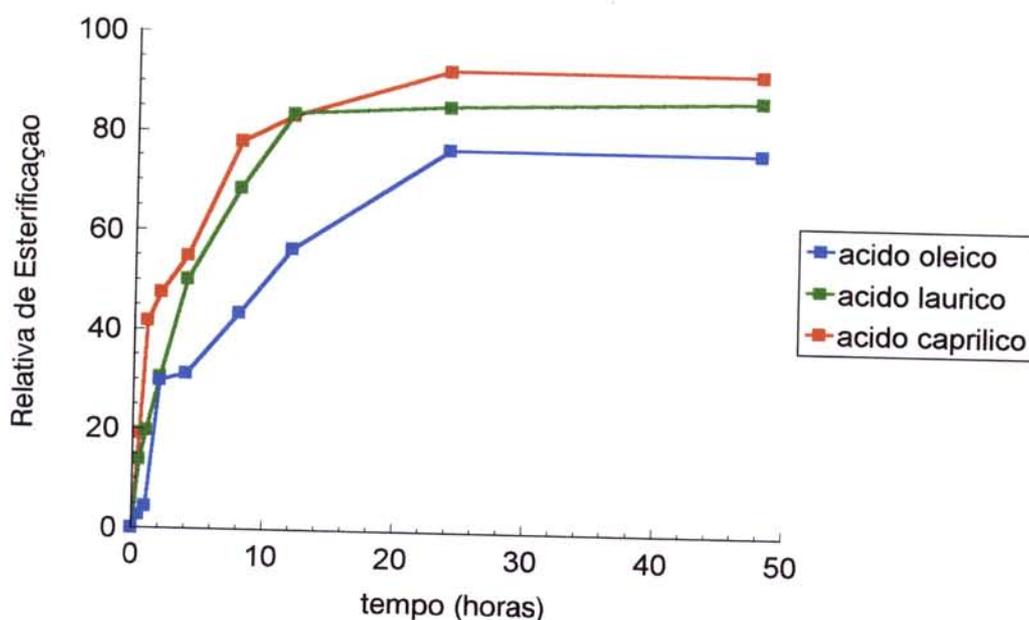


Figura 4B- Porcentagem de Esterificação de Etanol com Ácidos Graxos em Função do Tempo.

Pode-se verificar que na presença de etanol no sistema de reação, os ácidos caprílico e láurico apresentaram taxas de esterificação equivalentes, na faixa de 85%, após 12 horas à 40°C. Para o sistema contendo ácido oléico o rendimento foi de 75%, nas mesmas condições de reação descritas acima.

A figura 4C demonstra a porcentagem de esterificação dos ácidos graxos com propanol, em hexano. A figura 4D ilustra a porcentagem de esterificação de ácidos graxos com propanol em função do tempo.

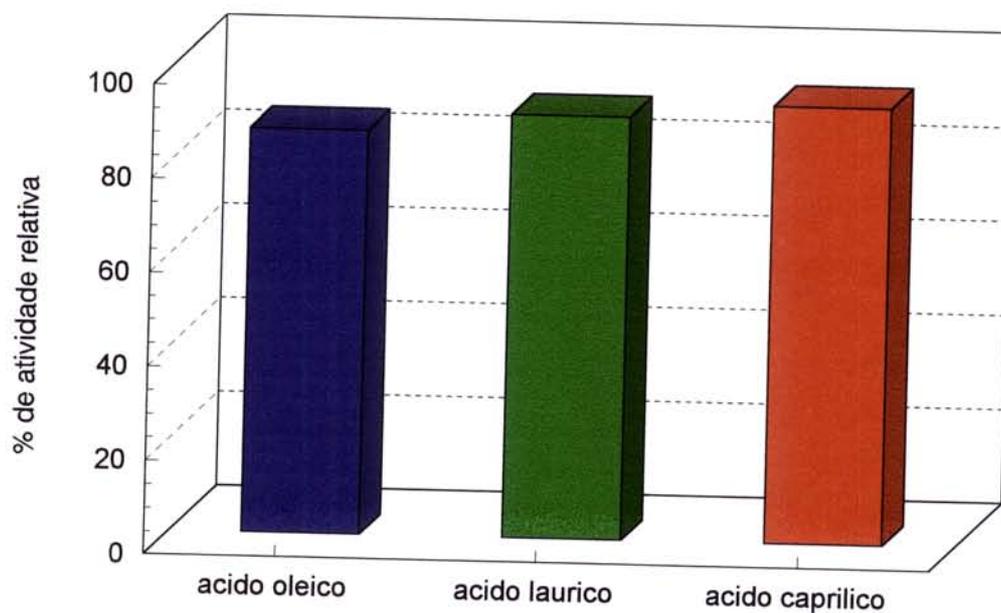


Figura 4C - Porcentagem de Esterificação com Propanol, em Hexano.

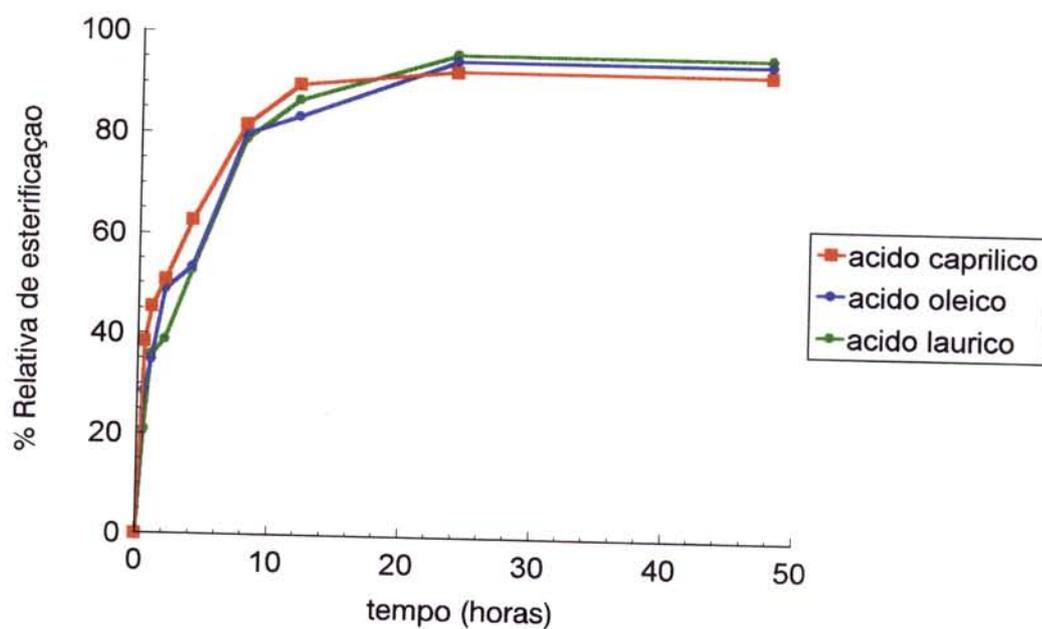


Figura 4D- Porcentagem de Esterificação de Ácidos Graxos com Propanol em Função do Tempo.

Podemos observar que, no sistema de reação contendo propanol, o ácido caprílico também apresentou maior porcentagem de esterificação que foi de 93%, após 12 horas de reação à 40°C.

Foi verificado que após 24 horas de reação, utilizando os diferentes ácidos graxos e propanol obteve-se taxas de conversão muito semelhantes no teor de 95% de esterificação.

No sistema de reação composto por ácidos graxos e o butanol, na presença de hexano, podemos verificar que o sistema de reação contendo ácido láurico, apresentou a maior porcentagem de esterificação, em torno de 97%, após 12h na temperatura de 40°C. Também foram encontrados índices de 95 e 85% de esterificação para os ácidos caprílico e oléico, respectivamente.

A figura 4E ilustra os resultados obtidos no sistema contendo butanol. A figura 4 F demonstra a porcentagem de esterificação de ácidos graxos com butanol em função do tempo.

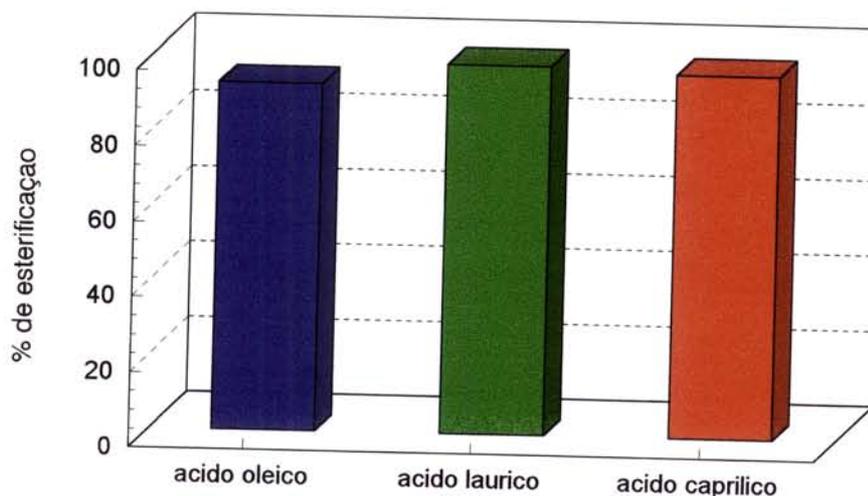


Figura 4E- Porcentagem de Esterificação com Butanol, em Hexano.

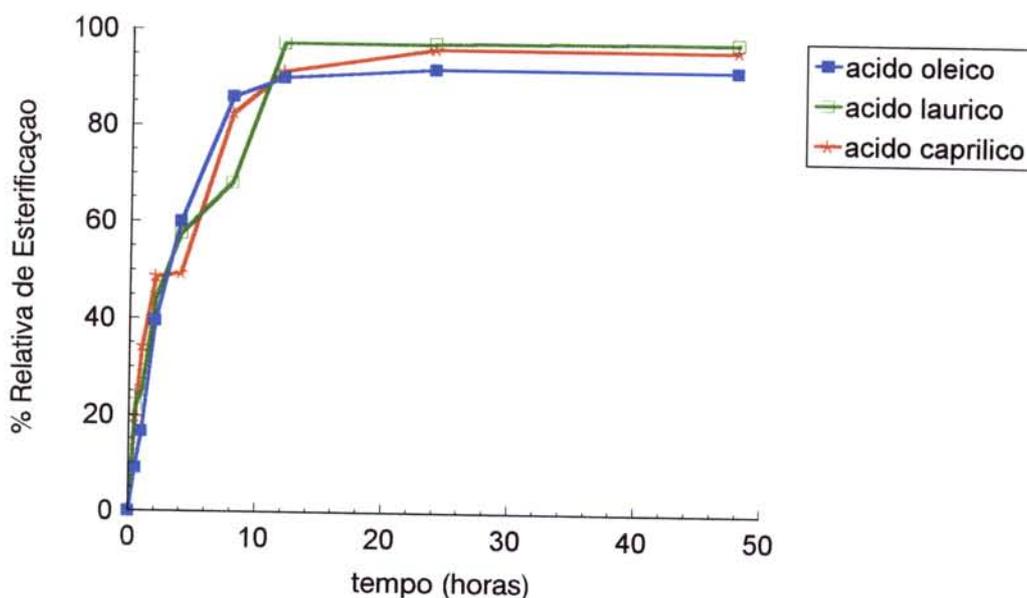


Figura 4F- Porcentagem de Esterificação de Ácidos Graxos e Butanol em Função do Tempo.

LANGRAND et alii 1990, relataram a influência do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos (C_2 a C_6) e dos álcoois primários, e a influência da natureza do álcool na síntese de ésteres de aroma. Foram utilizadas as lipases de *Mucor miehei*, *Aspergillus sp*, *Candida rugosa* e *Rhizopus arrizus* em sistema de reação contendo solvente orgânico. Cada preparação de lipase testada apresentou seletividade de reação, de acordo com o álcool e ácido graxo utilizado. Foi verificado que a lipase de *Aspergillus sp*, foi seletiva para os ácidos graxos e álcoois de cadeia curta.

BLOOMER et alii 1992, estudaram a síntese de ésteres de ácido graxo e etanol por lipase de *Rhizomucor miehei*, com o objetivo de aumentar o rendimento da reação pela evaporação de água produzida

pelo sistema de reação. Segundo os autores, este método permitiu uma produção mais rápida de ésteres, tendo refluxo dos solventes pentano ou hexano utilizados no sistema reacional.

Estudos de especificidade de ácidos graxos, pela lipase de *Mucor miehei* contra os ácidos graxos poliinsaturados: 20:1n-9, 20:5n-3, 22:n-9 e 22:6n-3, foram realizados por **PEDERSEN et alii** 1995. Neste estudo, foi feita a alcoólise em propanol de várias misturas de ácidos graxos com cadeias carbônicas entre C₂₀ e C₂₂ ou seus etil-ésteres correspondentes em n- heptano. A lipase apresentou alta especificidade contra o substrato 20:1n-9.

Ésteres de baixo peso molecular como acetato de geranyl, isoamil butirato e benzil propionato, são muito utilizados devido às suas características aromáticas e de "flavor". O éster butil laurato é um dos componentes presente em aromas de pêssego, o que aumenta a sua aplicação na área de alimentos (**GANDHI**, 1997).

5.4 Caracterização Bioquímica do Sistema de Reação Composto por Ácido Láurico e Butanol na Presença de Hexano.

Como foram obtidos melhores resultados na produção de ésteres de butil laurato, em hexano, procurou-se estudar as melhores condições de otimização do sistema, descrito no item 4.2.5, como: temperatura ótima, porcentagem de enzima, relação molar ácido graxo/butanol e presença de hexano.

5.4.1 Estudo do Efeito da Temperatura na Síntese de Éster Butil Laurato.

O estudo do efeito da temperatura na síntese de éster de butil laurato foi realizado conforme descrito no item 4.2.5.1. A figura 5 ilustra os resultados obtidos.

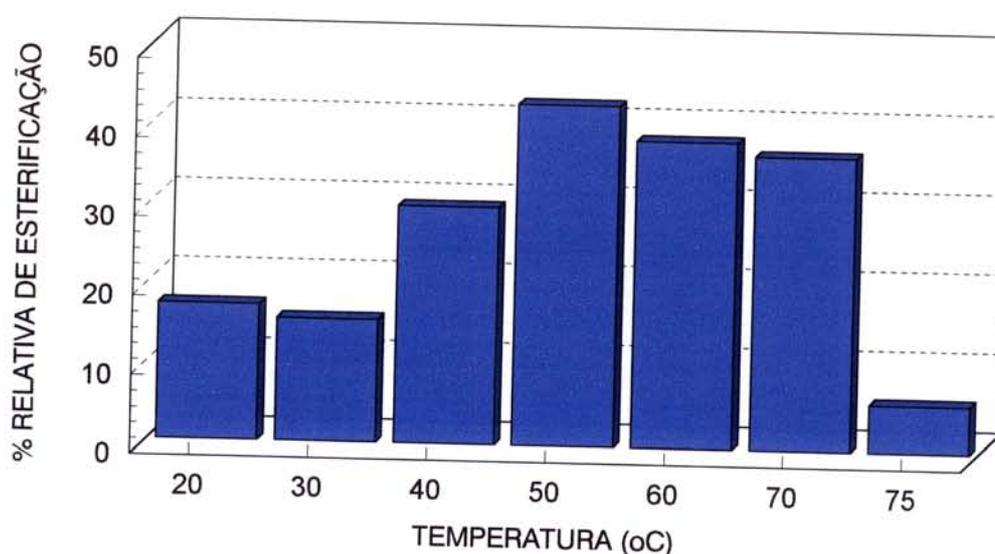


Figura 5- Efeito da Temperatura na Produção do Éster Butil Laurato.

Como podemos observar, a temperatura de produção máxima do éster de butil laurato foi à 50°C, com uma porcentagem de esterificação de 50%. Nas temperaturas de 60 e 70°C, houve um decréscimo na taxa de conversão do ácido láurico em cerca de 10 e 15%, respectivamente. No entanto, quando o sistema de reação foi incubado à temperatura de 75°C, observou-se um decréscimo na taxa de conversão do ácido láurico em torno de 45%, provavelmente devido a perda de atividade catalítica da lipase.

Resultados semelhantes foram obtidos por **JANSSEN *et alii*** 1993, que estudaram o efeito de alguns parâmetros como temperatura, atividade de água e solventes na síntese de ésteres de ácidos graxos e glicerol. A temperatura ótima encontrada para a síntese de ésteres de ácido láurico e glicerol foi acima de 55°C. Por outro lado, a lipase de *Aspergillus sp*, que também catalisou a síntese de ésteres de ácido láurico com glicerol, apresentou temperatura ótima de ação à 30°C (**TSUJISAKA *et alii***, 1974).

5.4.2 Estudo do Efeito da Concentração de Enzima na Síntese do Éster.

O efeito da concentração enzimática na produção do éster butil laurato foi verificado de acordo com o item 4.2.5.2. A figura 6 ilustra os resultados obtidos.

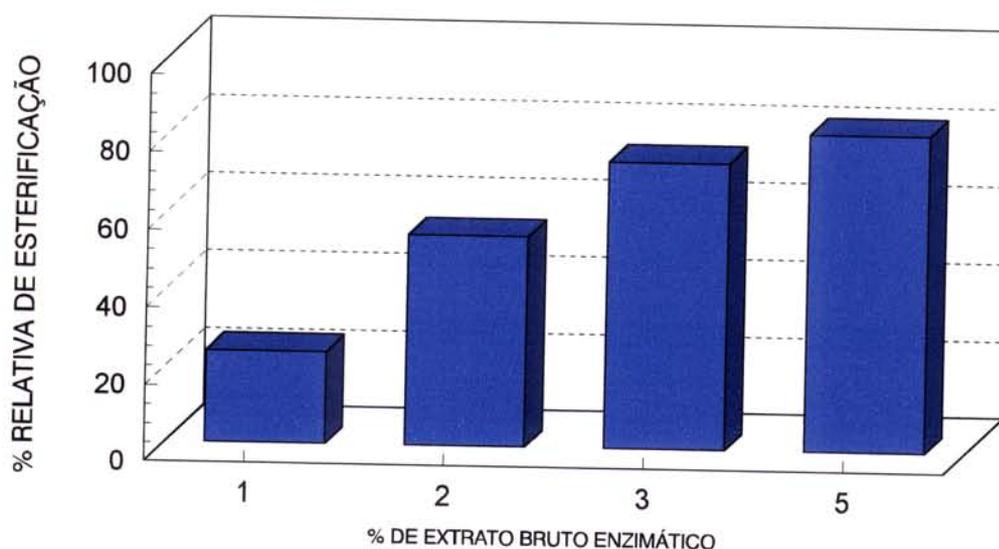


Figura 6- Efeito da Porcentagem de Extrato Bruto Enzimático na Reação.

As concentrações de extrato bruto utilizadas no sistema de reação foram: 1%, 2%, 3% e 5%. A produção máxima do éster, cerca de 80%, foi obtida quando se utilizou 5% de extrato bruto no sistema de reação à 50°C.

Resultados semelhantes foram encontrados por **LINKO et alii** 1995, que realizaram estudos de esterificação por lipases de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizomucor miehei*. Os autores verificaram o efeito do aumento da quantidade de enzima no sistema de reação utilizando diferentes concentrações enzimáticas, a saber: 0,3%, 0,6%, 1,5% e 3,2%. Quando a lipase de *Rhizomucor miehei* foi usada na concentração de 3,2%, obteve-se um aumento na síntese de butil oleato para 100% de conversão, após 12 horas de reação

5.4.3 Efeito da Relação Molar Ácido Graxo/ Butanol.

Com o objetivo de se avaliar o efeito da relação molar de ácido graxo/ butanol na produção de éster butil laurato, foram utilizadas as seguintes relações molares: 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 2:3, 3:2. A influência da relação molar de ácido láurico/butanol na reação, foi realizada de acordo com o item 4.2.5.3. Os resultados estão demonstrados na figura 7.

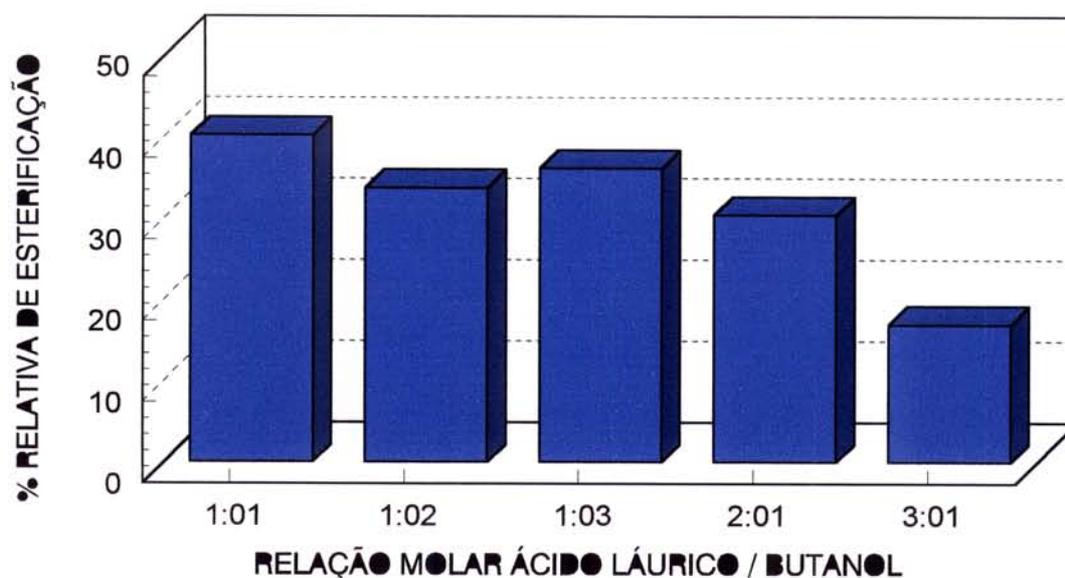


Figura 7- Efeito da Relação Molar de Ácido Láurico/Butanol na Reação.

De acordo com os resultados apresentados na figura acima, podemos verificar que, a melhor proporção molar ácido láurico/butanol, que resultou na produção máxima do éster butil laurato foi 1:1 em temperatura de 50°C, após 2 horas de reação.

O efeito da variação molar dos substratos 1-butanol e ácido oléico na síntese de éster butil oleato por ação das lipases de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas fluorescens*, foi investigada por **LINKO et alii**, 1995. Os autores verificaram que a máxima taxa de produção (80%) de butil oleato, foi obtida quando se utilizou a variação molar de 0,5:1.0 para 1-butanol e ácido oléico respectivamente e a lipase de *Candida rugosa*, após 24 horas de reação. As lipases de *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas fluorescens* produziram a síntese de butil oleato em cerca de 90% , quando se utilizou a proporção

molar butanol/ ácido graxo de 2:1. No entanto, a produção máxima do éster por ação da lipase de *Rhizomucor miehei* foi de 40% na proporção molar 3:1.

5.4.4 Estudo do Efeito da Presença de Hexano na Produção do Éster.

O estudo do efeito da quantidade do solvente orgânico hexano na produção de éster butil laurato foi verificado de acordo com o item 4.2.5.4. No sistema de reação composto por 250 mM de ácido láurico, 500 mM de butanol e 2% de extrato enzimático, foram adicionadas as seguintes quantidades do solvente hexano no sistema de reação: 1 mL, 3 mL, 6 mL, 8 mL e 10 mL. A figura 8 demonstra os resultados obtidos.

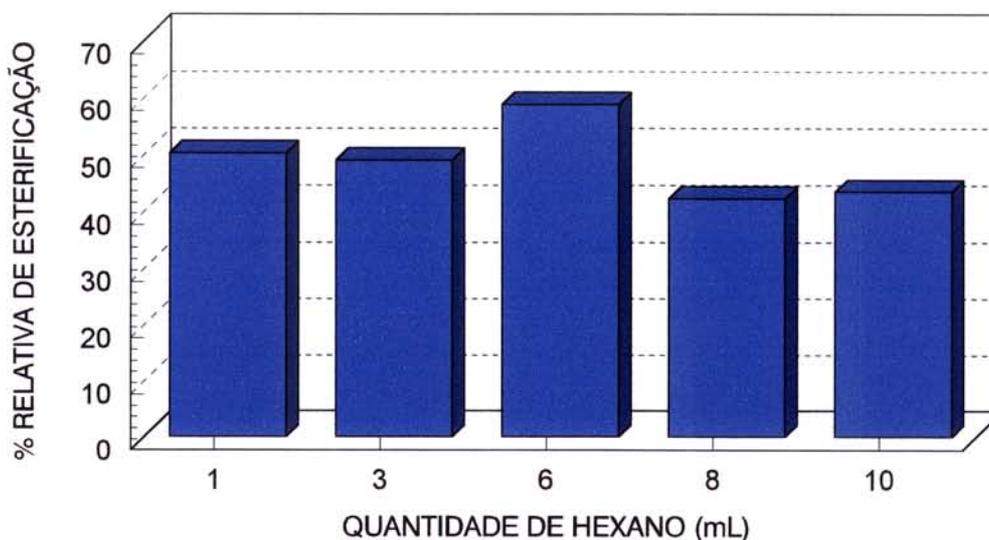


Figura 8- Efeito da Quantidade (mL) de Hexano na Reação.

A máxima produção do éster butil laurato foi obtida, quando se utilizou 6mL do solvente orgânico hexano no sistema de reação, na temperatura de 50°C, após 2 horas de incubação.

HOLMBERG et alii 1981, utilizando a lipase de *Rhizopus delemar*, realizaram a síntese de monoglicerídeos com 80% de rendimento, através de sistema de reação contendo solvente orgânico. Dos solventes orgânicos testados como n-hexano, n-octano, e isoctano, a lipase apresentou melhor atividade catalítica em isoctano.

LIU & SHAW 1997, estudaram a síntese de monoésteres de propilenoglicol dos ácidos graxos docosa-hexanóico e eicosapentanóico por ação da lipase de *Mucor miehei* em sistema de reação contendo solvente orgânico. Foi verificado que no sistema de reação contendo o solvente orgânico n-hexano, a taxa de produção de diésteres e monoésteres foi de 13 e 76 % respectivamente, após 48 horas de reação.

5.5 Estudo de Esterificação entre Carboidratos e Ácidos Graxos por Ação de Lipase de *Rhizopus sp.*

No estudo realizado para verificar a porcentagem de esterificação de carboidratos e ácido oléico, na produção de ésteres de carboidratos, foram utilizados os carboidratos: glicose, sacarose, lactose e maltose em diferentes proporções molares, conforme descrito em 4.2.6.1. Dos carboidratos testados, o dissacarídeo sacarose, mostrou-se o mais efetivo na produção de ésteres com uma porcentagem de esterificação máxima de 46,5%, após 96 horas de reação à 40°C; para os carboidratos lactose e maltose as porcentagens de esterificação foram de 43 e 38%, respectivamente. Por outro lado, quando se utilizou glicose no sistema de

reação, nenhum produto de esterificação foi produzido. A figura 9, apresenta as porcentagens de esterificação dos carboidratos sacarose, lactose e maltose, com o ácido oléico. A figura 9A apresenta as porcentagens de esterificação dos carboidratos maltose, lactose e sacarose, em função do tempo.

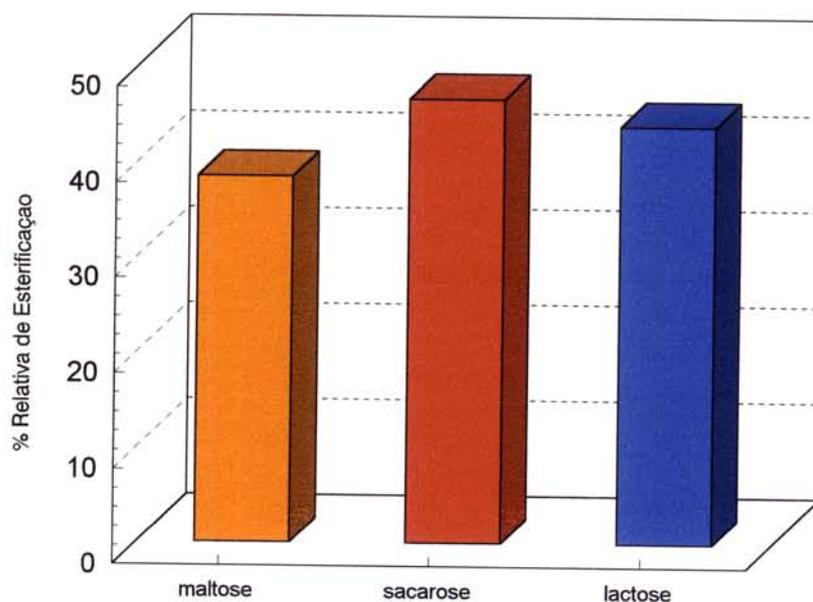


Figura 9- Porcentagem de Esterificação dos Carboidratos com Ácido Oléico.

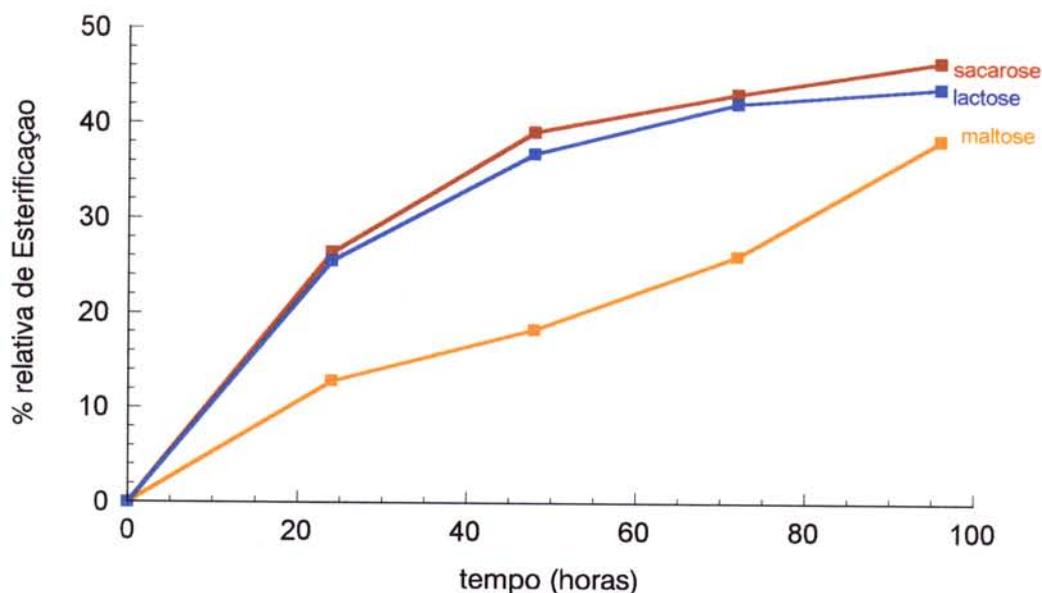


Figura 9A- Porcentagem de Esterificação de Carboidratos com Ácido Oléico em Função do Tempo.

A literatura relata a produção de 'sugar-ester', por via química, com a utilização de catalisadores inorgânicos muitas vezes impróprios para produtos alimentícios. Existe ainda variada literatura relatando tentativas de utilização de sistemas enzimáticos para a síntese de 'sugar-ester' com solventes orgânicos, muitas vezes de alta toxidez.

BJÖRKLING *et alii* 1989, verificaram a alta seletividade de enzimas que catalisam a esterificação de glicosídeos simples. A seletividade 6-0, na esterificação de alquilglicosídeos com ácidos graxos de cadeia longa, apresentou altos rendimentos, em torno de 95%, de 6-0 monoésteres, usando lipases em sistemas de reação isentos de solvente orgânico.

A síntese enzimática de ésteres de carboidratos e ácidos graxos tem sido realizada com muito sucesso em sistemas contendo solvente orgânico anidro, no entanto, a baixa estabilidade das enzimas em solventes orgânicos, como piridina e dimetilsufóxido e as dificuldades associadas com o uso desses solventes em larga escala, são fatores que dificultam a comercialização dos produtos. Um método alternativo é a esterificação de carboidratos e ácidos graxos catalisada por enzimas em sistema livre de solventes orgânicos, sendo um método atrativo do ponto de vista industrial, possivelmente devido ao baixo custo do processo e a ausência de toxidez, causada pela utilização de solventes orgânicos (SARNEY *et alii*, 1994).

ADELHORST *et alii* 1995, estudaram a esterificação de alquil glicosídeos, utilizando ácidos graxos e a lipase imobilizada de *Candida antartica*. A reação foi realizada em temperaturas de 60 e 80°C com excelente regioseletividade.

Com o objetivo de otimizar o rendimento da reação de esterificação e produção de ésteres de carboidratos, foi realizado o estudo de esterificação em diferentes proporções molares de ácido oléico/sacarose, de acordo com o item 4.2.6.2. A figura 10 ilustra os resultados obtidos.

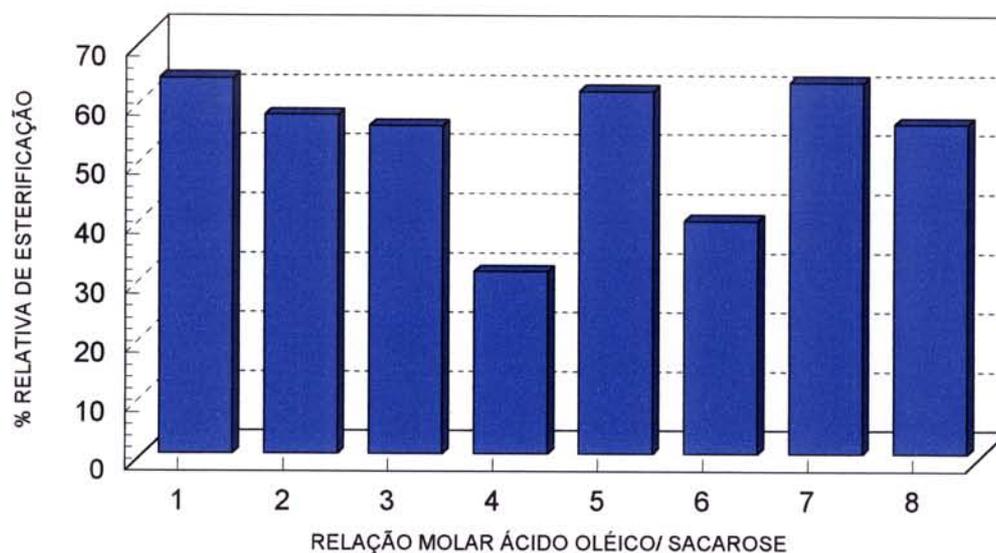


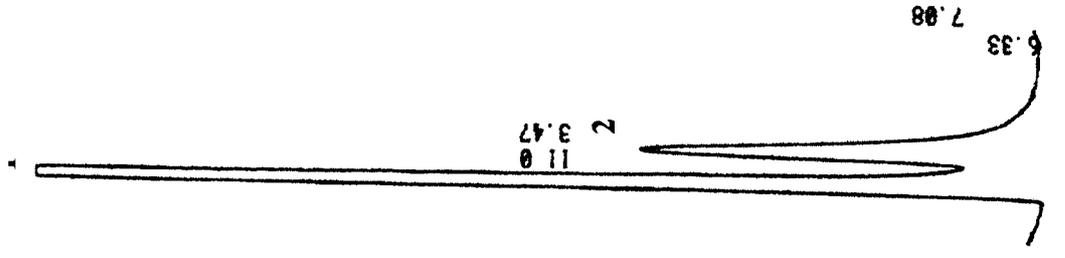
FIGURA 10- Porcentagem de Esterificação das Diferentes Proporções Molares de Sacarose e Ácido Oléico.

Legenda: Relação Molar: 1- 0,05/0,05 2- 0,05/0,1 3- 0,05/0,2 4- 0,05/0,3
5- 0,1/0,2 6- 0,2/0,2 7- 0,3/0,2 8- 0,2/0,1

Podemos verificar que a proporção molar de ácido graxo/sacarose, na qual se obteve a produção máxima de éster, de 63%, foi no sistema de reação contendo 0,05 M: 0,05 M de ácido oléico e sacarose. Em análises feitas na proporção molar de 0,05M de sacarose e 0,2M do ácidos graxos láurico e caprílico, foram obtidos baixos índices de esterificação. O mesmo ocorreu com ensaios realizados a partir de glicose e ácido oléico, láurico e caprílico. A figura 11 apresenta o cromatograma de consumo de ácido oléico na reação de esterificação com sacarose pela ação da lipase.

SEINO et alii 1984, relataram a utilização de ésteres de sacarose como emulsificantes potencialmente importantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Utilizando as lipases de *Rhizopus sp*, *Enterobacterium*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Chromobacterium*, *Candida*, *Mucor* e *Penicillium*, realizaram a síntese de ácidos graxos como oléico, esteárico e linoléico com os carboidratos: sacarose, glicose, frutose e sorbitol. As condições ideais para a atividade enzimática foram: taxa molar de carboidrato/ ácido graxo 0,05Mol/L : 0,2Mol/L, respectivamente, quantidade de lipase 4g/L e em tampão fosfato pH 5,4 com período de reação de 72 horas à 40°C. A formação de ésteres de ácido oléico e sacarose pela lipase de *Candida cylindracea* foi de 60% e para glicose e ácido oléico 28%.

Em 1987 **JASPERS et alii** concluíram que a síntese de ésteres de ácidos graxos e sacarose sempre resulta em misturas complexas. Foram descritos dois procedimentos para análise quantitativa de monoésteres e diésteres de sacarose, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e coluna de fase reversa. A completa separação dos diésteres não foi possível devido à presença de estruturas isômeras complexas.



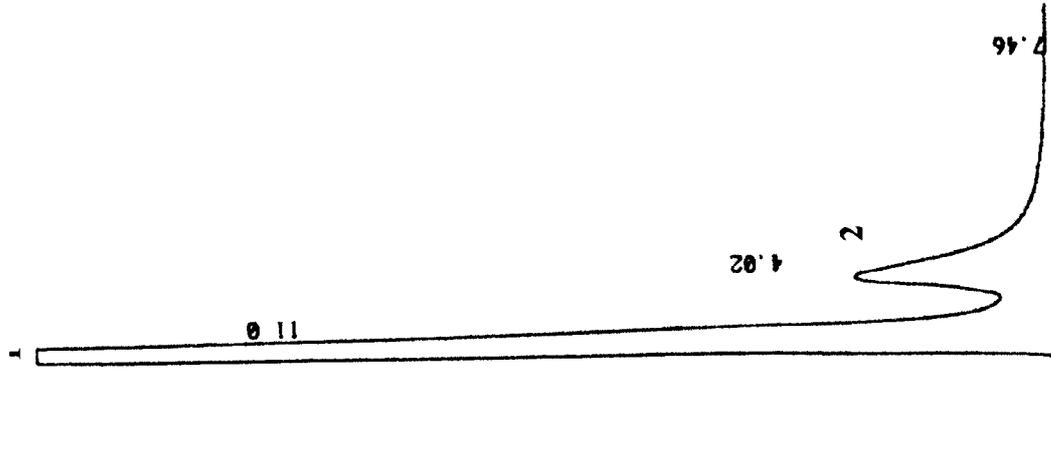
1 - FASE MÓVEL : ACETONA:ACETONITRILA 1,6:1,0

2 - Ácido Oléico no tempo 48h de reação



1 - FASE MÓVEL : ACETONA:ACETONITRILA 1,6:1,0

2 - Ácido Oléico no Tempo 0h de reação



1 - FASE MÓVEL : ACETONA:ACETONITRILA 1,6:1,0

2 - Ácido Oléico Padrão

FIGURA 11 - Cromatograma do Consumo de Ácido Oléico na Reação de Esterificação com Sacarose pela Ação da Lipase *Rhizopus* sp LB-FAA-14

5.6 Determinação da Tensão Superficial do Éster de Sacarose Produzido.

Com o objetivo de verificar as propriedades tensoativas do éster de sacarose (sugar ester) produzido em comparação com éster de carboidrato comercial (Ryoto Sugar Ester), foi realizada a determinação da tensão superficial em água destilada em temperatura de 23°C, conforme descrito no item 4.2.6.4.

A tabela 1 apresenta o estudo comparativo entre os valores obtidos das análises de tensão superficial do produto de reação e de sugar- éster comercial.

Tabela 1- Estudo Comparativo dos Valores de Tensão Superficial entre o Produto de Reação e Sugar-Éster Comercial, em Diferentes Concentrações.

Tensão Superficial (mN/m)		
Concentração (g/mL)	Sugar-Éster Comercial	Produto de Reação
0,05	39,00	38,34
0,10	30,43	38,55
0,20	36,66	38,84
0,40	33,00	38,27
0,60	36,58	36,01
0,80	32,65	33,38

*A tensão superficial da água destilada esteve em 72mN/m.

Em relação ao produto de esterificação de sacarose e ácido oléico, verificou-se decréscimos significativos dos valores de tensão superficial em relação à água e ao padrão.

DONNELLY et alii 1988, verificaram que os compostos surfactantes produzidos por fermentação, apresentaram desvantagens como o baixo rendimento e dificuldade de recuperação do produto formado. A tensão superficial foi verificada através do método de placa de vidro, com a concentração de ésteres de sacarose entre 0,0001 a 2%.

AKOH 1992, estudou as propriedades de emulsificação dos poliésteres e misturas de ésteres de sacarose, poliésteres de carboidratos e ácidos graxos. Emulsificantes comerciais de ésteres de sacarose ou poliésteres de carboidratos e suas propriedades de surfactantes foram investigadas. Foi constatado que, quando usados sozinhos, os poliésteres de carboidratos foram excelentes estabilizadores de emulsão.

5.7 Estudo do Efeito Bacteriostático do Éster de Sacarose Produzido.

O estudo do efeito bacteriostático do éster de sacarose foi verificado de acordo com o item 4.2.6.5.

A Figura 12 apresenta o efeito de ésteres de sacarose no crescimento de *Staphylococcus aureus* em placa de BHI (Brain Heart Infusion), comprovando o efeito bacteriostático.

Verificou-se que ao utilizar porcentagens de produto superiores a 2%, não foi encontrado crescimento deste microrganismo.

**EFEITO DA PRESENÇA DE ÉSTER-SACAROSE
NO CRESCIMENTO DE *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* CULTIVADO EM BHI**

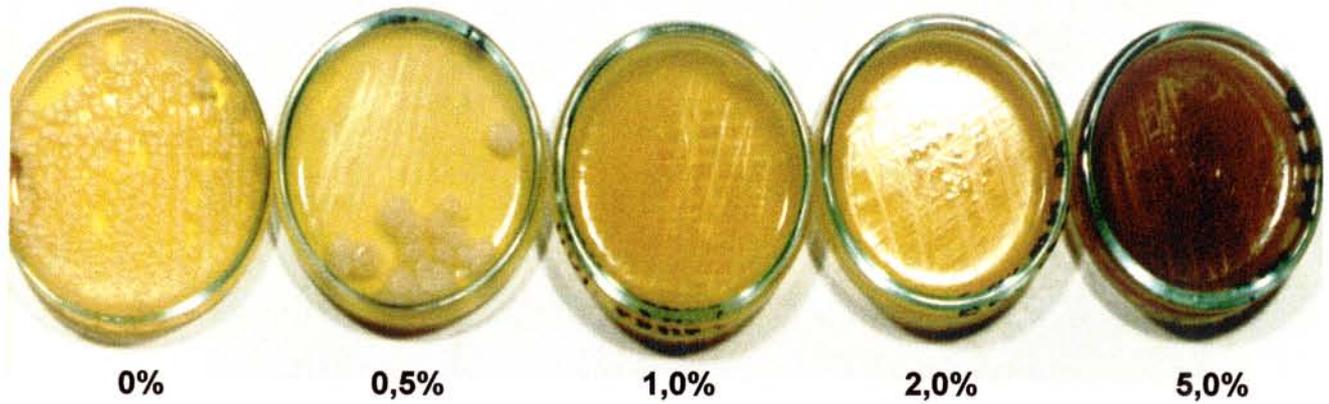


Figura 12 - Efeito Bacteriostático do Éster de Sacarose com Ácido Oléico Produzido.

6. CONCLUSÃO.

1. A lipase de *Rhizopus sp* apresentou intensa atividade de esterificação apresentada em meio reacional isento de água.
2. A maior ou menor porcentagem de esterificação depende da relação molar entre o ácido graxo e o glicerol bem como da especificidade da ação enzimática quanto ao tipo de ácido graxo utilizado.
3. Foi verificado que a lipase obtida da linhagem selecionada de *Rhizopus sp* esterificou em maior proporção (93%) a mistura de glicerol e ácido láurico, quando incubada à 40°C com agitação orbital.
4. A melhor porcentagem de esterificação em hexano ocorreu na produção de butil laurato, que foi de 97%. Dentre os ácidos graxos pesquisados, o ácido caprílico apresentou maior rendimento com etanol (95%) e propanol (93%).
5. Como pôde ser verificado, a mistura de reação butanol, ácido láurico apresenta grande potencial como sistema reacional para produção enzimática de ésteres.
6. Foi observado que a melhor relação molar encontrada para a produção de ésteres de sacarose, foi 0,05M de sacarose e 0,05M de ácido oléico, com porcentagens de esterificação de 61,30%.

7. Foi relatado um potencial tensoativo, que merece maior estudo para qualificar suas aplicações.

8. O efeito bacteriostático do éster de sacarose foi demonstrado e deve ser profundamente estudado quanto às suas propriedades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ADELHORST,K.; BJÖRKLING,F.; GODTFREDSSEN,O. K. Enzyme Catalysed Preparation of 6 -O - Acilglucopyranosides. **Synthesis**, p. 112-115, 1995.

AKOH, C.C. Emulsification Properties of Polyesters and Sucrose Ester Blends I: Carbohydrate Fatty Acid Polyesters. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 69, n.1, p. 9-13, 1992.

BAILLARGEON,M. W.; SONNET, P. E. Polyethylene Glycol Modification of *Candida rugosa* Lipase. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 11, p.1812-1815, 1988.

BASHEER, S.; NAKAJIMA, M.; COGAN, U.. Sugar Ester- Modification of Lipase for the Esterification of Fatty Acids and Long-Chain Alcohols. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p.1475-1479, 1996.

BENNETT, C.; DORDICK, J.S.; HACKING, A .J.; CHEETHAM, P.S.J. Biocatalytic Synthesis of Disaccharide High Intensity Sweetener Sucralose via Tetrechlororaffinose Intermediate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 39, n. 2, p. 211- 216,1992.

- BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, S.E.; KIRK, O . A Highly Selective Enzyme - catalysed Esterification of Simple Glucosides, **J. Chem. Soc.; Chem. Commun.**, p. 934 - 935, 1989.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Facile synthesis of fatty acid esters in high yields. **Enzyme Microbial Technology**, v.14, n. 7, p.546-552, 1992.
- BONE, D. H.; NAIR, C. S.. Production of Lipase *Aspergillus foetidus* in a Batch Stirred Reactor. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 8, p.601-604, 1987.
- COULON, D.; GIRARDIN, M.; ROVEL, B.; GHOUL, M. Comparison of Direct Esterification and Transesterification for Fructose by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 183 - 186, 1995.
- CHOPINEAU, J.; MACCAFFERTY, F.D.; THERISOD, M; KIBANOV, A . M. Production of Biosurfactants from Sugar Alcohols and Vegetable Oils Catalysed by Lipases in Nonaqueous Medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 208 - 214, 1988.
- COSTA, M.C.; PASTORE, G.M. Produção, Purificação e Caracterização de Lipase de *Aspergillus sp.* Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) 107 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP. 1996.

- COSTA, V.S.R.; PASTORE, G.M.. Produção, Purificação e Caracterização Bioquímica de uma Nova Linhagem de *Rhizopus sp.* Dissertação (Mestre em Ciências de Alimentos), 98 p. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, 1997.
- DONNELLY, M.J.; BU'LOCK, J.D.. Sucrose Esters as Model Compunds for Synthetic Glycolipid Surfactants. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 2, p.284-287, 1988.
- EIGTVED, P.; HANSEN, T.T.. A New Immobilized Lipase for Interesterification and Ester Synthesis. IN: Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oil Industry. **American Oil Chemists' Society**, p. 365- 369, 1986.
- FUKUMOTO, J.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y.. Studies on Lipase I. Purification and Crystalization of a Lipase Secreted by *Aspergillus niger*. **Journal Genetic Applied Microbiology**, v.9, n. 3, 1963.
- GANDHI, N. N. Applications of Lipase: Review. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p.621-634, 1997.
- GHOSHARAY, S.; BHATTACHARYA, D.K. Enzymatic Preparation of Ricinoleic Acid esters of Long - Chain Monohydric Alcohols and Properties of the Esters, **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 1, p. 85-88, 1992.

- GUNNER, F.S.; SIRKECIOGLU, A.; YILMAR,S.; ERCIYES, A.T.;
ERDEN-SENATALAR,A.. Esterification of Oleic Acid with Glycerol
in the Presence of Sulfated Iron oxide Catalyst. **Journal American
Oil Chemists' Society**, v.73, n. 3, p.347-351, 1996.
- GUPTA, R.K.; JAMES, K.; SMITH,F.J.. Analysis of Sucrose Mono- and
Diesters Prepared from Triglycerides Containing C₁₂-C₁₈ Fatty Acids.
Journal American Oil Chemists' Society, v. 60, n.11, p.1908-1913,
1983.
- HAYES, D. G.. The Catalytic Activity of Lipases Toward Hydroxy Fatty
Acids - A review. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 73, n.
5, p.543-549, 1996.
- HIRUTA, O.; NAKAHARA, T. ; YOKOCHI,T. KAMISAKA, Y. ; SUZUKI, O.
Production of 9- hidroperoxy - γ linolenic Acid by Soybean
Lipoxigenase in a Two - Phase System. **Journal American Oil
Chemists' Society**, v. 65, n. 12, p. 1911-14, 1988.
- HOLMBERG, K.; OSTERBERG, E. Enzymatic Preparation of
Monoglicerides in Microemulsion. In *Surfactantes & Detergents
Technical*, **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 9,
p.1544 - 1548,1988.

HOQ, M.M.; TAGAMI,H.; YAMANE,T.; SHIMIZU. Some Characteristics of Continuous Glyceride Synthesis by Lipase in a Microporus Hydrophobic membrane Bioreactor. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 335 - 342, 1985.

IBRAHIM.C. O; NISHIO,N.; NAGAI, S. Fat Hydrolysis and esterification by Lipase from *Humivola lanuginosa*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 1253-1259, 1987.

ISHII, T.; MORI, T.; CHEN, J.; ITOH, Y.; SHIMURA, S.; KIRIMURA, K.; USAMI, S..Ester Synthesis by a Crude Lipase of *Rhizopus oligosporus* in an Aqueous System. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n.3, p.1888-1889, 1990.

IWAI, M.; TOMINAGA, Y.; TSUJISAKA, Y.. A comparative study on some proprieties of fungal lipase. **Proceeding of Internacional Fermentation Symposium**: p.315-320, 1972.

JANSSEN,A . E. M., KLABBERS, C; FRANSSEN, M.C.R.; RIET, K. Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Esters in 2- Pyrrolidone. **Enzyme Microbiol Technology**, v. 13, p. 565- 572, 1991.

JASPERS, M.E.A.P.; VAN LEEUWEN, F.F.; NIEUWENHUIS, H.J.W.;
VIANEN, G.M.. High Performance Liquid Chromatographic Separation
of Sucrose Fatty Acid Esters. **Journal American Oil Chemists'
Society**, v. 64, n. 7, p.1020-1025, 1987.

JENSEN, R. G.. Detection and Determination of Lipase (Acylglycerol
Hydrolase) Activity from Various Sources. **Lipids**, v.18,n. 18,
p.650-657, 1983.

JONES, J.D.; HACKING, A . J.; CHEETHAM, P. S. J. Biological Method
for Protection 6 _ Position of Sucrose and Its Use in Synthesis of
Dissaccharide High - Intensity Sweetener. **Biotechnology and
Bioengineering**, v. 39, p. 203 - 210, 1992.

LANGRAND, G.; RONDOT; N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J..
Short Chain Flavors Esters Synthesis by Microbial Lipases.
Biotechnology Letters, v. 12, n. 8, p.581-586, 1990.

LEITGEB, M.; KNEZ, Z. The Influence of Water on the Synthesis of n-
Butyl Oleate by Immobilized *Mucor miehei* Lipase. **Journal American
Oil Chemists' Society**, v. 67, n.11,p. 725- 728, 1990.

LINFIELD, W.M.; BARAUSKAS, R. A ; SIVIERI, L.; SEROTA, S.; Sr. STEVENSON, R.W. Enzymatic Fat Hydrolysis and Synthesis. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p.191 - 195, 1984.

LINKO, Y.Y.; LÄMSÄ, M.; HUHTALA, A .; RANTANEN, O . Lipases Biocatalysis in Production of Esters. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p.1293-1299, 1995.

MAAG, H.. Fatty Acid Derivatives: Important Surfactants for Household, Cosmetic and Industrial Purposes. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p.259-267, 1984.

MELFFERT, A. Technical Uses of Fatty Acid Esters. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 255-258, 1984.

MERCADE, E., ROBERT, M.; ESPUNY, M.J.; BOSCH, M.P.; MANRESA, M.A.; PARRA, J.L.; GUINEA, J.. New Surfactant Isolated from *Pseudomonas* 42A2. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 65, n. 12, p.1915-1916, 1988.

MUKHERJEE, K., KIEWITT, I.. Enrichment of γ -linolenic acid from fungal oil by lipase-catalysed reactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n.5, p.579-584, 1991.

- MUTUA, L. D.; AKOH, C. Synthesis of Alkil Glycoside Fatty Acid Esters in Non Aqueous Media by *Candida sp.* Lipase. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 1, p. 43 - 45, 1993.
- NISHIO, T.; CHIKANO, T.; KAMIMURA, M.. Ester Synthesis by the Lipase from *Pseudomonas fragi* 22.39 B. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 52, n. 5, p.1203-1208, 1988.
- OGUNTIMAIN, G. B.; ERDMANN, H.; SCHIMID, R. D. Lipases Catalysed of Sugar Ester In Organic Solventes. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 2, p. 175 - 180, 1993.
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J.. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p.490-495, 1994.
- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The comparasion of the properties of two lipases de *Penicillium cyclopium* Westring. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063- 1070, 1975
- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Synthesis of Various Kinds of Esters by Four Microbial Lipases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 575, p.156-165, 1979.

OSIPOW, L.; SNELL, F.D.; YORK, W.C.; FINCHLER, A. Fatty Acid Esters of Sucrose. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 48, n. 9, p.1459-1464, 1956.

PARK, Y. K.; PASTORE, G. M.. Esterificação de ácido Graxo com Glicerol por Lipases Microbianas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 9, n. 2, p.148-162, 1989.

PECNIK, S.; KNEZ, Z.. Enzymatic Fatty Ester Synthesis. **Journal Oil Chemists Society**, v. 69, n.3, p.261-265, 1992.

PEDERSEN, S.B.; HOLMER, G. Studies of the Fatty Acid Specificity of the Lipase from *Rhizomucor miehei* Toward 20 : 1n-9, 20; 5n-3, 22: 1n-9 and 22:6n-3. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 2, p. 239-243, 1995.

PHERONI, G.; FOURNERON, J. D. Lipases Catalyse Hydrolysis of fatty Acid Anhydrides. **Synthesis**, p. 269-253, 1990.

RIVERA MUÑOZ, G.; VAVENCIA, T.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. **Biotechnology Letters**, v.13, n.4, p.277-280,1991.

SARNEY, D. B.; VULFSON, E. N. Application of enzymes to the synthesis of surfactantes. **Tibtech**, v.13, p. 164- 172, 1995.

SCHOLNICK, F.; SUCHARSKI, M.K.; LINFIELD, W.M. Lactose - Deived Surfactantes(l) Fatty Esters of lactose. **Journal American Oil Chemists' Society**, n.2, p. 8-11, 1973.

SEINO, H.; UCHIBORI, T.; NISHITANI, T.; INAMASU, S. Enzymatic Synthesis of Carboydrate Esters of Fatty Acid. **Journal Oil Chemists' Society**, v. 61, n.11, p.161-1765, 1984.

SHAHIDI, F.; HE, Y.. Enzymatic Esterification of ω -3 Fatty Acid Concentrates from Seal Blubber Oil with Glycerol. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 9, p.1133-1136, 1997.

SKAGERLIND, P.; LARSON, K.; BARFOED, M.; HULT, K.. Glucoside Ester Synthesis in Microemulsions Catalysed by Lipase de *Candida antarctica*. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 1, p.39-42, 1997.

TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M.. Glyceride Synthesis by Four Kinds of Microbial Lipase. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 489, p.415-422, 1977.

TSITSIMPIKOU,C.; STAMATIS,H.; SERETI,V.; DAFLOS,H.;
KOLISIS,F.N. Acylation of Glicose Catalysed by Lipase in Supercritical
Carbano Dioxide. **Journal of Chemical Technology &
Biotechnology**, v. 71, p. 309 - 313, 1998.

ZAKS, A.; GROSS, A. T. Production of Monoglycerides by Enzymatic
Transesterificcation. **United States Patent**, n. 5.316.927, May 31, 1994.