

GLICERÓLISE DE ÓLEO DE PEIXE CATALISADA POR LIPASE COMERCIAL DE *Rhizomucor miehei* EM MEIO COM SURFACTANTE DE GRAU ALIMENTÍCIO

Joanna Silva Santos, Gisanara Dors, Débora de Oliveira, Soeli Francisca Mazzini Monte Blanco, José Vladimir de Oliveira, Agenor Furigo Júnior e Jorge Luiz Ninow

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil

Maria Manuela Camino Feltes\*

Departamento de Engenharia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, 89700-000 Concórdia – SC, Brasil

Recebido em 1/3/12; aceito em 18/7/12; publicado na web em 27/11/12

GLYCEROLYSIS OF FISH OIL CATALYZED BY A COMMERCIAL LIPASE FROM *Rhizomucor miehei* IN REACTION MEDIA CONTAINING FOOD GRADE SURFACTANT. Omega-3 enriched partial acylglycerols are beneficial for human health. The aim of this study was to obtain monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) by means of glycerolysis of fish oil catalyzed by a lipase from *Rhizomucor miehei* in the presence of food grade surfactants (Tween 65, 80 or 85). Glycerolysis was successful in the reaction media for all the tested surfactants, showing their potential for use as additives in such a system. The best results, however, were obtained for the reaction medium in the absence of surfactant whose peroxide value was the lowest after glycerolysis.

Keywords: glycerolysis; lipase; surfactants.

## INTRODUÇÃO

Recentemente, há um grande interesse por pesquisas relacionadas ao uso de biocatalisadores em reações de modificação de lipídios, por questões ecológicas e por maior qualidade dos produtos obtidos, em especial quando destinados para consumo humano. Entre estes produtos, destacam-se os monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG).<sup>1</sup>

Atualmente, uma das formas industriais mais comuns de se obter estes acilgliceróis, que apresentam propriedades emulsificantes, é por glicerólise química.<sup>1</sup> Este mecanismo, entretanto, é agressivo para o meio ambiente e para os produtos formados, por utilizar catalisadores inorgânicos (metóxidos e hidróxidos de sódio e potássio) a altas temperaturas (acima de 240 °C). Nestas condições, ocorrem reações de polimerização, bem como a formação de produtos com coloração escura e sabor desagradável.<sup>2</sup>

Em busca de alternativas à glicerólise química, várias pesquisas vêm utilizando lipases (E.C. 3.1.1.3 – glicerol éster hidrolases) como biocatalisadores. A aplicação destes biocatalisadores permite que as condições da reação sejam brandas (pH entre 4 a 9 e temperaturas desde ambiente até 70 °C). Logo, o uso de enzimas possibilita baixo custo energético, maior seletividade e menos resíduos ao final do processo, obtendo-se, assim, produtos de qualidade superior.<sup>3</sup>

Atualmente, tem sido dada muita ênfase à necessidade de agregar propriedades funcionais aos alimentos ingeridos pelo homem. Com o consumo demasiado de alimentos industrializados, observou-se, em diversos países ocidentais, uma desproporção na ingestão média recomendada de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3.<sup>4</sup> Sabe-se que, quando a razão de ácidos graxos ômega-6/ômega-3 da dieta é de cerca de 5:1, há diminuição de 70% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares, redução das doenças inflamatórias como artrite reumatoide e dos sintomas decorrentes da asma.<sup>5-7</sup>

O óleo de peixe possui os ácidos graxos essenciais ômega-3

eicosapentaenoico (EPA, C20:5) e docosa-hexaenoico (DHA, C22:6), precursores dos hormônios tipo eicosanoides. É notável a importância de adicioná-los à dieta dos consumidores pela ingestão, por exemplo, por meio de emulsificantes (MAG e DAG). Alguns estudos indicam a utilização do óleo de peixe como substrato em reações de glicerólise enzimática para a obtenção de MAG e DAG ricos em EPA e DHA.<sup>8-10</sup>

Concomitantemente, para uma condição de tecnologia mais limpa por meio da glicerólise enzimática, sugere-se utilizar surfactantes de grau alimentício no meio reacional, substituindo os solventes orgânicos, homogeneizadores comumente utilizados nesta reação. Os surfactantes são moléculas anfífilas, as quais apresentam propriedades químicas que permitem o aumento da área interfacial. Promovem, assim, altas velocidades de reação, aumentando assim a eficiência do biocatalisador, principalmente das lipases, caracterizadas como enzimas de interface.

Em processos biocatalíticos, é mais interessante a condução da reação na ausência de solventes orgânicos, já que podem afetar as enzimas e exigem uma etapa de purificação rigorosa ao final do processo. Para a aplicação de um surfactante biodegradável e a obtenção de aditivos mais adequados para consumo humano, outros estudos apontam a possibilidade de se utilizar surfactantes de grau alimentício, como os Tween (ésteres de polioxietileno) nas reações de glicerólise, como, por exemplo, de óleo de oliva e de óleo de peixe, catalisadas pela lipase Novozym<sup>®</sup> 435.<sup>9,11,12</sup>

Devido à reação de glicerólise enzimática, para a produção de surfactantes, possuir em maior volume a porção de óleo (apolar) em relação à porção de glicerol (polar), é necessário, teoricamente, o uso de um surfactante com baixo valor de balanço hidrofílico/lipofílico (BHL). Os valores teóricos referentes ao BHL dos surfactantes de grau alimentício Tween podem estar entre 8 e 15.<sup>13</sup> Um estudo sobre glicerólise de azeite de oliva, na presença de Tween 85 (polioxietileno trioleato de sorbitana), indicou que bons rendimentos em MAG e DAG foram obtidos em apenas 2 h de reação na presença da lipase Novozym<sup>®</sup> 435 de *Candida antarctica*.<sup>12</sup>

\*e-mail: mmanuelafeltes@hotmail.com

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi selecionar um surfactante de grau alimentício (Tween 65, Tween 80, Tween 85, lecitina de soja) para ser utilizado em reações de glicerólise de óleo de peixe comercial, obtido de savelha, catalisadas por lipase comercial obtida de *Rhizomucor miehei*, visando a obtenção de MAG e DAG de interesse nutricional. Reações na ausência destes surfactantes também foram conduzidas, para efeitos de comparação.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

O glicerol P.A. (pureza 99,5%, Nuclear) e o óleo de peixe OmegaPure® (Omega Protein, EUA) foram utilizados como substratos nas reações de glicerólise enzimática. Este óleo comercial foi obtido de savelha, refinado e estabilizado com tocoferóis e *tert*-butil-hidroquinona pelo fabricante. Conforme determinado por Feltes *et al.*,<sup>9</sup> este substrato contém 29,15% dos ácidos graxos ômega-3 EPA, docosapentaenoico (DPA) e DHA, índice de peróxido de  $0,659 \pm 0,377$  mEq O<sub>2</sub> ativo kg<sup>-1</sup> óleo e índice de acidez de  $0,078 \pm 0,003$  g de ácido oleico 100 g<sup>-1</sup> óleo.

Foram utilizados os surfactantes de grau alimentício poli-(óxido de etileno) triestearato de sorbitana (nome comercial Tween 65, marca Sigma), poli-(óxido de etileno) mono-oleato de sorbitana (Tween 80, Vetec), poli-(óxido de etileno) trioleato de sorbitana (Tween 85, Sigma) e lecitina de soja (Alfa Aesar).

A lipase comercial utilizada foi a Lipozyme® RM IM (Novozymes, Brasil), obtida de *Rhizomucor miehei*. Segundo o fabricante, a atividade desta enzima em interesterificação e acidólise é de 15 IUN g<sup>-1</sup> (Unidade de Interesterificação) ou 5-6 BAUN g<sup>-1</sup> (Unidade de Acidólise), respectivamente.<sup>14</sup>

### Atividade de água da lipase

A atividade de água ( $a_w$ ) da lipase foi determinada no higrômetro eletrônico AquaLab Série 3TE (Decagon Devices Inc., EUA). O ajuste da curva padrão do medidor foi feito através de soluções saturadas de cloreto de lítio ( $a_w = 0,113$ ) e de cloreto de sódio ( $a_w = 0,753$ ). Após a calibração do equipamento, 5 g de amostra foram colocadas no aparelho e a leitura feita automaticamente, à temperatura de 25 °C.

### Estudo da atividade enzimática

A atividade enzimática (A.E.) foi determinada com base no consumo de ácido láurico na reação de esterificação com propanol (proporção molar de 1:1), segundo metodologia descrita na literatura.<sup>15</sup> As reações foram conduzidas a diferentes temperaturas (50, 55, 60 e 70 °C), sob agitação magnética por 120 min. A enzima foi utilizada na proporção de 5% (m/m, em relação ao total de substratos). Alíquotas de 150 µL foram retiradas do meio reacional no tempo zero e ao longo da reação, sendo diluídas em acetona:etanol (1:1, v/v). A quantidade de ácido láurico não esterificado foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup> até pH 11. Definiu-se uma unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de lipase que conduz ao consumo médio (esterificação) de 1 µmol de ácido láurico por minuto, nas condições experimentais descritas, até atingir o equilíbrio da reação.

Após a seleção da temperatura a ser utilizada nas reações de esterificação, objetivando a determinação da A.E., avaliou-se o condicionamento prévio da lipase, em estufa (Fanem, modelo 502) a  $40 \pm 2$  °C durante 1 h.<sup>16</sup> Este tratamento teve como objetivo reduzir a atividade de água da enzima, suprimindo a hidrólise dos substratos, o que é de interesse para a aplicação posterior do catalisador nas

reações de glicerólise. A influência deste tratamento sobre a enzima foi avaliada através da determinação, em triplicata, da atividade de esterificação da lipase antes e depois do condicionamento térmico.

Após as reações de glicerólise, avaliou-se a atividade residual da Lipozyme® RM IM no equilíbrio da reação de esterificação à temperatura de 60 °C, conforme Oliveira *et al.*,<sup>15</sup> para fins de comparação com outros resultados da literatura.<sup>9</sup>

### Determinação da constante de equilíbrio na reação de esterificação

A constante de equilíbrio média ( $K_x$ ) foi determinada para todas as reações de esterificação do ácido láurico com propanol, descritas acima, na fase estacionária da reação. Nesta fase, a proporção entre os reagentes e os produtos é descrita por meio da Equação 1.

$$K_x = \frac{[EA] \cdot [H_2O]}{[Ac] \cdot [Al]} \quad (1)$$

Na Equação 1, o numerador representa a multiplicação das concentrações dos produtos (éster propílico de ácido láurico, EA, e água, H<sub>2</sub>O) presentes durante o equilíbrio da reação. Já o denominador representa a multiplicação das concentrações dos reagentes (ácido láurico, Ac, e propanol, Al) presentes no meio, durante o equilíbrio.

### Estudo da ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício

Para esta avaliação, simulou-se a reação de glicerólise enzimática, sem a presença de triacilgliceróis (TAG) do óleo de peixe no meio, segundo metodologia descrita por Feltes.<sup>17</sup> Os substratos utilizados foram glicerol (previamente tratado com sulfato de sódio anidro) e cada um dos surfactantes listados no item “Material”, adicionados na proporção de 10% (m/m) em relação ao glicerol. A lipase foi adicionada na proporção de 10% (m/m) em relação a este poliálcool. Algumas reações foram conduzidas na ausência de enzima (branco). Em seguida, o reator foi fechado e mantido a 55 °C por 24 h sob agitação magnética constante. Após a reação, foi feita a lavagem e a filtração a vácuo da enzima, utilizando-se uma solução de hexano e álcool etílico 1:1 (v/v). Os solventes presentes no filtrado foram eliminados em um evaporador rotativo a vácuo, à temperatura de 70 °C.

As amostras foram avaliadas qualitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD), segundo Feltes *et al.*,<sup>9</sup> Feltes<sup>17</sup> e Christie.<sup>18</sup> As amostras foram diluídas utilizando solventes apropriados (clorofórmio para as amostras contendo Tween 80 e hexano para as demais). Em seguida, um volume de 10 µL destas soluções foi aplicado em placas de alumínio com sílica gel 60G contendo indicador de fluorescência (Macherey Nagel). Foram utilizados os solventes de eluição hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, v/v/v) e clorofórmio/álcool metílico/água (95:20:2,5, v/v/v) para as amostras contendo os Tween e a lecitina de soja, respectivamente. As manchas foram reveladas com vapor de iodo.

### Reações de glicerólise enzimática

Nesta etapa, foi avaliada a cinética das reações de glicerólise enzimática, para a seleção do surfactante de grau alimentício. As reações de glicerólise enzimática foram conduzidas em reator de vidro encamisado, com volume útil de 40 mL, acoplado a um agitador mecânico e a um banho termostatizado. Tomou-se como base literatura disponível,<sup>19</sup> com as modificações propostas por Feltes *et al.*<sup>9</sup>

O reator foi alimentado com aproximadamente 24,8 g de óleo de

peixe e 5,2 g de glicerol (proporção molar de 2:1, respectivamente), totalizando 30 g de substratos no meio reacional. O surfactante e a enzima foram adicionados na proporção de 10% (em massa), cada, em relação ao total de substratos. Em paralelo, foram conduzidas reações sem surfactante (controle). As reações foram feitas a 55 °C sob agitação constante de 600 rpm durante 48 h, com a retirada de alíquotas (300 µL) ao longo da reação. Estas amostras foram lavadas com hexano/etanol (1:1, v/v) e centrifugadas (3000 rpm por 5 min). Esta operação foi repetida três vezes. Os solventes presentes no meio reacional foram eliminados em banho-maria, sob corrente de nitrogênio.

Ao final da reação, o meio foi filtrado a vácuo para a separação da enzima imobilizada e dos produtos da glicerólise. Após três procedimentos de lavagem com hexano e etanol (1:1, vol), a enzima foi submetida à determinação da A.E. residual (a 60 °C), conforme metodologia descrita no item "Estudo da atividade enzimática". Os solventes presentes no meio reacional foram eliminados em evaporador rotativo a vácuo, seguido de aquecimento em banho-maria, sob corrente de nitrogênio. Amostras do meio, sem a enzima, foram transferidas para frascos e armazenadas em freezer, em atmosfera inerte, para análise posterior (índice de peróxido, segundo Método Cd 8-53 da AOCS,<sup>20</sup> e análises descritas a seguir).

### Monitoramento das reações de glicerólise

As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG) Shimadzu com injetor automático, no modo *on-column*, e com detector de ionização de chama (DIC). A análise foi feita segundo a Norma DIN EN n° 14105 do Comitê Europeu para Padronizações (2003) e as modificações propostas por Krüger.<sup>21</sup> As amostras foram previamente derivatizadas com *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (Fluka Analytica). O volume de injeção foi de 1 µL. Foi utilizada coluna capilar DB-5HT (W Scientific – n° de série US7162944H) de 30 m

x 0,25 mm x 0,1 µm. A programação da temperatura da coluna foi de 50 °C durante 1 min, 15 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, 7 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> até 370 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 min. A temperatura do detector foi 380 °C. Utilizou-se hélio como gás de arraste (pressão 143,5 kPa e fluxo total de 5 mL min<sup>-1</sup>). As áreas dos picos nos cromatogramas, separadas manualmente, foram integradas pelo software GC Solution (Shimadzu). Os resultados para TAG foram expressos em termos de conversão (%), após a normalização da área dos picos destas substâncias.

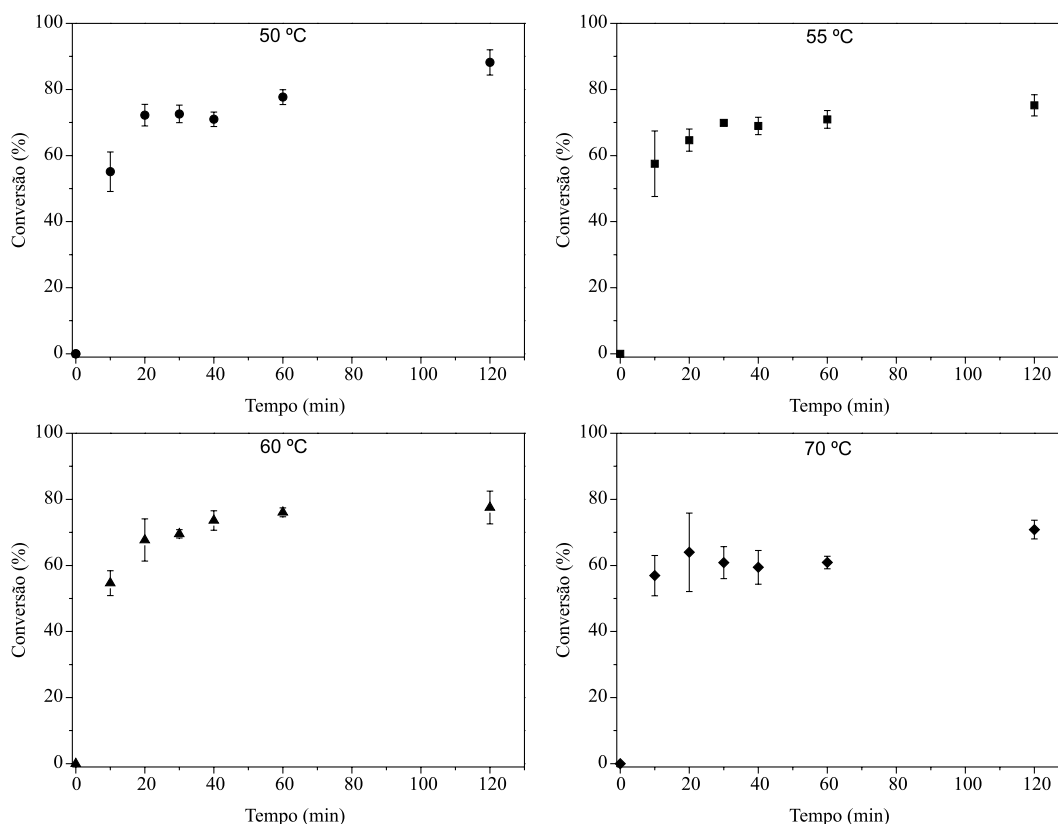
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo da atividade enzimática

A metodologia para A.E. segundo Oliveira *et al.*,<sup>15</sup> sugerida para aplicação neste trabalho, está consolidada para a lipase Novozym® 435. Houve, portanto, a necessidade de verificar a aplicação desta metodologia para a lipase testada (Lipozyme® RM IM), através de um estudo cinético. De forma complementar, foram avaliadas temperaturas diferentes daquela indicada na metodologia original (60 °C), com o objetivo de determinar a faixa de temperatura mais favorável para a ação da Lipozyme® RM IM, dentro de uma região de interesse (50 a 70 °C).

Segundo a ficha técnica da Novo Nordisk,<sup>22</sup> a Lipozyme® IM de *Rhizomucor miehei* atinge a sua atividade ótima de esterificação a 40 °C. Esta temperatura, entretanto, não foi investigada, pois trabalho anterior<sup>9</sup> indicou que esta condição não é interessante para reações de glicerólise.

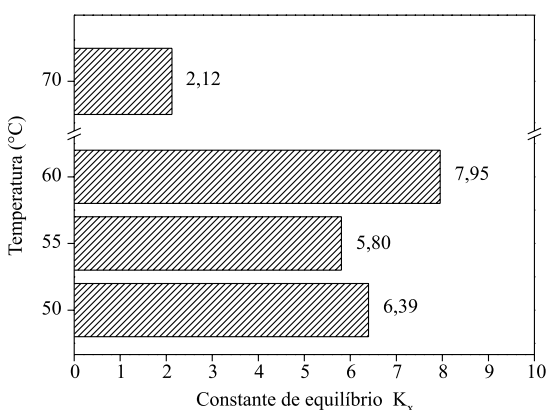
Observou-se que houve uma rápida conversão dos substratos na reação catalisada pela Lipozyme® RM IM para todas as temperaturas avaliadas (Figura 1). O equilíbrio da reação foi atingido em 20 min para todas as reações.



**Figura 1.** Conversão de ácido láurico (%) na reação de esterificação com propanol (1:1, mol/mol) às temperaturas de (a) 50 °C, (b) 55 °C, (c) 60 °C e (d) 70 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m)

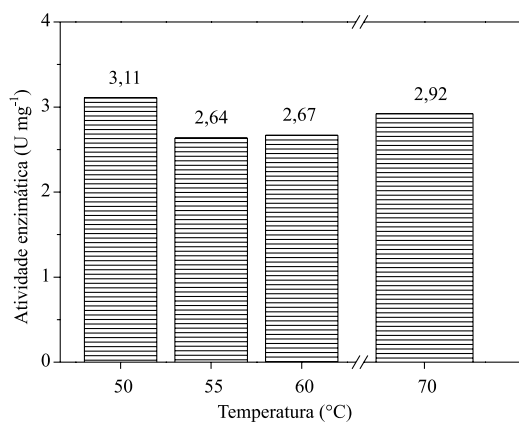
As possíveis razões para que o consumo do ácido láurico tenha sido rapidamente interrompido nestas reações seriam: perda do propanol por evaporação; perda da A.E. por termodesnaturação e termodesativação da enzima; perda de atividade da enzima sob ação do propanol; e, por fim, o equilíbrio da reação. Nas condições de reação utilizadas, a hipótese de que o equilíbrio é rapidamente alcançado é a mais viável e foi admitida no trabalho.

A Figura 2 destaca a influência da temperatura sobre a enzima Lipozyme® RM IM em relação ao  $K_x$ . Observa-se que a temperatura de 60 °C favoreceu a formação do éster, por ter apresentado o maior valor para a constante de equilíbrio ( $K_x = 7,95$ ). As temperaturas de 50 e 55 °C também favoreceram a obtenção do éster. A 70 °C obteve-se o menor valor para a constante de equilíbrio ( $K_x = 2,13$ ), indicando que houve menor conversão nesta condição.



**Figura 2.** Constante de equilíbrio média ( $K_x$ ) a diferentes temperaturas, na fase estacionária da reação de esterificação entre ácido láurico e propanol (1:1, mol/mol), catalisada pela Lipozyme® RM IM (5%, m/m)

Na Figura 3 está apresentada a atividade de esterificação da lipase testada, definida como a velocidade média de consumo de ácido durante a fase exponencial da reação. Percebe-se que a A.E. apresentou um valor superior a 50 °C (3,11 U mg<sup>-1</sup>), quando comparada às outras temperaturas avaliadas.



**Figura 3.** Atividade de esterificação (U mg<sup>-1</sup>) da Lipozyme® RM IM (5%, m/m) a diferentes temperaturas, na reação de esterificação entre ácido láurico e propanol (1:1, mol/mol). Valores definidos com base no coeficiente angular da curva de consumo de ácido láurico, na fase exponencial da reação

Observa-se que a lipase de *Rhizomucor miehei* tem sido empregada em reações sucessivas de esterificação.<sup>23</sup> Sua estabilidade e atividade, sob atividade de água muito baixa, torna esta enzima umas das mais indicadas para reações deste tipo.<sup>24,25</sup> Condições semelhantes também se apresentaram favoráveis para reação de transesterificação

visando a síntese de geranyl acetato<sup>26</sup> e para alcoólise.<sup>27</sup>

Estudos com lipases homólogas, *R. niveus* e *R. humicola*, sugerem que mudanças nos resíduos destas enzimas, na região “tampa e dobradiça” da estrutura, podem desempenhar um papel importante na tolerância à baixa atividade de água destes catalisadores.<sup>28</sup> Sendo assim, no presente trabalho, fez-se uma avaliação do condicionamento da Lipozyme® RM IM, mediante redução prévia da  $a_w$  desta lipase antes de aplicá-la em reações de esterificação a 60 °C. Este procedimento provocou uma redução na  $a_w$  da lipase de 0,471 para 0,212. Esta alteração, entretanto, não afetou a atividade da enzima na reação de esterificação (resultado não apresentado). Portanto, nos ensaios posteriores, optou-se por utilizar a lipase não condicionada termicamente.

### Estudo da ação da lipase sobre os surfactantes de grau alimentício

Neste estudo, deseja-se que o surfactante de grau alimentício tenha a função apenas de promover a dispersão entre os substratos, favorecendo a ação catalítica da lipase.<sup>29</sup> Todavia, os surfactantes Tween 65, Tween 80, Tween 85 e lecitina de soja apresentam ligações éster. Desta forma, decidiu-se avaliar, qualitativamente, se estes aditivos de grau alimentício podem se comportar como substratos nas reações enzimáticas estudadas.

Nesta etapa, aplicou-se a temperatura de 55 °C, para fins de comparação com outro estudo realizado por Feltes *et al.*,<sup>9</sup> nas mesmas condições reacionais, exceto pela diferença no biocatalisador empregado.

Por meio da análise qualitativa por CCD, observou-se que a estrutura da lecitina de soja foi modificada pela lipase após 24 h de reação a 55 °C, o que não ocorreu para a reação sem enzima (branco). Supõe-se que, na reação contendo 10% (m/m, em relação ao glicerol) de lecitina de soja, a Lipozyme® RM IM tenha agido na molécula deste fosfolípido, provavelmente hidrolisando os ácidos graxos esterificados em sua cadeia central.

Um estudo indicou o enriquecimento enzimático de lecitina obtida de gema de ovo com ácido alfa-linoleico e outros ácidos graxos.<sup>30</sup> Hossen e Hernandez<sup>31</sup> verificaram que a Lipozyme® RM IM incorpora de forma efetiva o ácido linoleico conjugado a fosfolípidios de lecitina de soja.

Por outro lado, para os Tween 65, 80 e 85, adicionados na proporção de 10% (m/m, em relação ao glicerol) ao meio reacional, observou-se, na análise qualitativa por CCD, o mesmo perfil lipídico antes e após 24 h na presença da lipase. Observou-se, ainda, que os padrões dos Tween 80 e 85 apresentaram manchas com fatores de retenção ( $R_f$ ) de 0,23 e 0,27, respectivamente, correspondentes à mancha do padrão de ácido oleico (C18:1). Isto é, há uma indicação da presença de ácidos graxos livres nos Tween testados.

O fato de a lipase não ter agido sobre os Tween 65, 80 e 85 (surfactantes não iônicos) corrobora o estudo de Skagerlind *et al.*,<sup>32</sup> os quais verificaram que, abaixo da concentração micelar crítica de surfactante, a lipase de *R. miehei* não complexou com surfactantes aniônicos e não iônicos. Segundo estudos anteriores de Skagerlind *et al.*,<sup>33</sup> as reações baseadas em microemulsões podem evitar ainda mais que a lipase de *R. miehei* interaja com os surfactantes aniônicos e não iônicos com caudas hidrofóbicas volumosas. Por outro lado, Bendikienė *et al.*<sup>34</sup> observaram que houve hidrólise de diferentes Tween (20, 40, 60, 80 e 85) pela lipase 3121-1 *Pseudomonas mendocina*. O Tween 85, em especial, apresentou maior suscetibilidade à hidrólise, supostamente devido a sua estrutura. Todavia, este Tween, em concentrações bem baixas (0,4-0,8%), atuou apenas como surfactante. Feltes<sup>17</sup> também observou que, embora o Tween 85 tenha sido modificado pela Novozym® 435, este surfactante

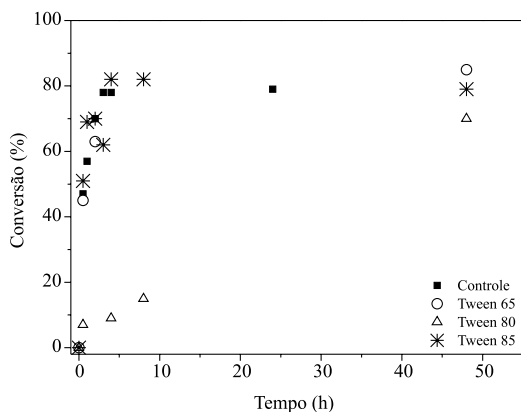
propiciou a obtenção de MAG e DAG em reações de glicerólise de óleo de peixe a 55 °C.

Diante do exposto, supõe-se que os Tween 65, 80 e 85 podem atuar apenas como agentes tensoativos do meio trifásico, glicerol (hidrofílico)/óleo (lipofílico)/enzima (sólido) e não como substratos nas reações de glicerólise enzimática. Estes aditivos podem, portanto, contribuir para a cinética das reações entre estes substratos imiscíveis, contornando os problemas de difusão molecular observados em meio contendo somente glicerol e óleo.<sup>35</sup>

### Seleção do surfactante de grau alimentício

Nesta etapa, o surfactante lecitina de soja não foi utilizado, levando-se em consideração os resultados discutidos na sessão anterior.

Em todas as reações de glicerólise testadas, houve conversão de TAG (aproximadamente 80% da quantidade inicial) no tempo avaliado (48 h), embora a conversão tenha sido parcial (Figura 4). A conversão foi mais lenta na presença de Tween 80, apesar de que, ao final do tempo de reação, este meio tenha proporcionado conversão similar à obtida nos demais ensaios, informação confirmada por CCD (resultado não apresentado). Ressalta-se, ainda, que, na ausência de surfactante (reação controle), houve uma conversão de TAG comparável àquela obtida nos meios contendo Tween 65 e Tween 85. Isto provavelmente ocorreu devido ao fato de que os MAG e DAG formados ao longo da glicerólise favorecem a homogeneidade do sistema. Para a reação controle e os meios contendo Tween 65 e Tween 85, o equilíbrio foi alcançado cerca de 4 h após o início da reação.



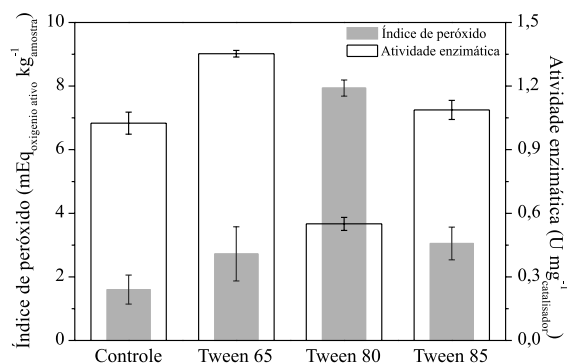
**Figura 4.** Conversão de triacilgliceróis (%) ao longo do tempo na reação de glicerólise de óleo de peixe catalisada pela Lipozyme® RM IM na ausência (controle) e na presença de surfactantes

Comportamento similar em relação à ação da lipase Novozym® 435 sobre estes Tween foi observado por Feltes *et al.*,<sup>9</sup> empregando condições experimentais iguais às do presente estudo. Esses autores concluíram que o meio contendo o Tween 65 foi o mais favorável à obtenção de DAG.

Na Figura 5 é possível visualizar, através do valor do índice de peróxido, o nível de oxidação apresentado por cada meio reacional, como também a A.E. após cada reação.

A reação controle apresentou o menor índice de peróxido ( $1,60 \pm 0,46$  mEq O<sub>2</sub> ativo kg<sup>-1</sup> óleo) entre os meios avaliados e uma baixa A.E. residual ( $1,03 \pm 0,05$  U mg<sup>-1</sup> catalisador).

Dentre os Tween avaliados, o meio contendo o Tween 65 foi o que proporcionou o menor índice de peróxido ( $2,72 \pm 0,85$  mEq O<sub>2</sub> ativo kg<sup>-1</sup> amostra) e a maior atividade da lipase ( $1,35 \pm 0,02$  U mg<sup>-1</sup> catalisador) após a reação. O meio reacional que apresentou maior nível de oxidação ( $7,94 \pm 0,25$  mEq O<sub>2</sub> ativo kg<sup>-1</sup> amostra) foi o



**Figura 5.** Índice de peróxido do meio e atividade enzimática (reação de esterificação a 60 °C) após 48 h de reação de glicerólise de óleo de peixe a 55 °C, catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m) na ausência de surfactante (controle), e na presença dos surfactantes (10%, m/m) Tween 65, Tween 80 e Tween 85. (Atividade enzimática original: 1,68 U mg<sup>-1</sup>; I.P. original do óleo: 0,66 mEq O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> óleo)

que continha Tween 80. Esta reação foi a que mais afetou a atividade da lipase, a qual foi substancialmente reduzida após a reação ( $0,55 \pm 0,03$  U mg<sup>-1</sup> catalisador). Estes resultados sugerem que houve influência do índice de peróxido do meio sobre a atividade da enzima para a maioria dos meios testados.

Holm e Cowan<sup>36</sup> verificaram que as substâncias produzidas nas reações de oxidação, representadas pelo índice de peróxido, podem afetar negativamente a estabilidade de enzimas. Além disso, observou-se que altos índices de peróxido estão associados com a redução do tempo médio de vida do catalisador. Aliado a isto está o pH do meio, que provavelmente esteja ácido quando o nível de oxidação do meio já está elevado, devido à formação de ácidos graxos livres, dentre outros compostos. Portanto, assume-se que a melhor forma de assegurar uma atividade apreciável da enzima, em uma reação envolvendo óleo, é mediante a utilização de uma matéria-prima com qualidade apropriada, isto é, com baixo nível de oxidação (< 2 mEq O<sub>2</sub> ativo kg<sup>-1</sup> óleo) e ácidos graxos livres.

Para a reação com o Tween 65, a A.E. residual foi superior à atividade verificada nas demais reações. É provável que as moléculas de ácido esteárico (C18:0), de cadeia saturada, esterificadas à cadeia de polioxietileno de sorbitana do Tween 65, não o tornem um substrato muito atrativo para a enzima testada.<sup>37</sup> Por conseguinte, ocorre menor formação de ácidos graxos livres. Isto pode ser uma provável justificativa a uma das conclusões de Feltes *et al.*<sup>9</sup> em relação a este surfactante, o qual foi o mais favorável à obtenção de DAG em condições reacionais semelhantes às empregadas no presente estudo, em reação catalisada pela lipase Novozym® 435.

No presente trabalho, observou-se uma influência negativa do Tween 80 sobre a atividade da Lipozyme® RM IM. Gaoa *et al.*<sup>38</sup> também verificaram que a atividade de uma lipase isolada de cepa de *Pseudomonas* sp. foi totalmente perdida, quando a enzima foi diluída em 0,1% (m/v) de Tween 80 em solução tampão de glicina 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0) a 30 °C por 90 min.

A reação na presença de Tween 85 provocou a segunda maior perda da atividade de esterificação da lipase. Supõe-se que isto seja decorrente da presença de três moléculas de ácido oleico (C18:1), esterificadas aos polioxietilenos de sorbitana. Sabe-se que a lipase testada atua preferencialmente sobre elementos contendo ácidos graxos monoinsaturados, liberando-os, o que pode justificar o comportamento observado. A mesma constatação foi feita por Feltes *et al.*<sup>9</sup> ao adicionar Tween 85 ao meio reacional de glicerólise de óleo de peixe em condições iguais às investigadas no presente estudo, porém, utilizando a Novozym® 435 como catalisador.

## CONCLUSÕES

Este trabalho indicou que a glicerólise enzimática do óleo de peixe comercial OmegaPure, obtido de savelha, a 55 °C, utilizando meio com diferentes surfactantes de grau alimentício, em especial Tween 65 e Tween 85 (10%, m/m, em relação ao total de substratos), catalisada pela Lipozyme® RM IM (10%, m/m, em relação ao total de substratos), pode favorecer a conversão de TAG a outras espécies lipídicas. Observou-se, ainda, que houve produção de MAG e DAG, constituídos, provavelmente, de EPA e DHA, após 48 h de reação, nas condições estudadas.

Conclui-se, igualmente, que a Lipozyme® RM IM, em reações de glicerólise, favorece o consumo e a formação de acilgliceróis parciais em poucas horas de reação, mesmo em meio livre de solvente e de surfactante, ou seja, contendo somente glicerol e óleo.

Observou-se, também, que o nível de oxidação do meio reacional, bem como a composição dos surfactantes adicionados, pode afetar a atividade da lipase, influenciando, posteriormente, a conversão nas reações de glicerólise.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES (Brasil) e ao CNPq (Brasil) pelas bolsas concedidas, à FAPESC (SC, Brasil) pelo auxílio financeiro, à Novozymes (PR, Brasil) e à OmegaProtein (EUA) pelas amostras de lipase e óleo de peixe, respectivamente, bem como ao Laboratório de Termodinâmica Aplicada da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim (RS, Brasil) pela realização das análises cromatográficas.

## REFERÊNCIAS

- Bornscheuer, U. T.; *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 578.
- Boyle, E.; *Food Technol.* **1997**, *51*, 52; He, X-L.; Chen, B-Q.; Tan, T-W.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 333.
- Koblitz, M. G. B.; Pastore, G. M.; *Ciênc. Tecnol. Alim.* **2004**, *24*, 267.
- Shahidi, F.; Wanasundara, U. N.; *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9*, 230.
- Lorgeril, M.; Renaud, S.; Mamelle, N.; Salen, P.; Martin, J. L.; Monjaud, I.; *The Lancet* **1994**, *343*, 1454.
- James, M. L.; Cleland, L.G.; *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **1997**, *27*, 85.
- Broughton, K. S.; Johnson, C. S.; Pace, B. K.; Liebman, M.; Kleppinger, K. M.; *Am. Soc. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, 1011.
- Pawongrat, R.; Xu, X.; H-Kittikun, A.; *Food Chem.* **2007**, *104*, 251.
- Feltes, M. M. C.; Oliveira, J. V.; Treichel, H.; Block, J. M.; Oliveira, D.; Ninow, J. L.; *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 701.
- Eom, T. K.; Kong, C. S.; Byun, H. G.; Jung, W. K.; Kim, S. K.; *Process Biochem. (Amsterdam, Neth.)* **2010**, *45*, 738.
- Valério, A.; Fiametti, K. G.; Rovani, S.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *160*, 1789.
- Valério, A.; Rovani, S.; Treichel, H.; Oliveira, D.; Oliveira, J. V.; *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *33*, 805.
- Ohba, N.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, *35*, 1016.
- Novozymes; *Product Sheet: Lipozyme® RM IM. Oils & Fats* 2000-10503-01.pdf.
- Oliveira, D.; Feihmann, A. C.; Rubira, A. F.; Kunita, M. H.; Dariva, C.; Oliveira, J. V.; *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 373.
- Valério, A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2009.
- Feltes, M. M. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2011.
- Christie, W. W.; *Lipid analysis*, Pergamon Press: Scotland, 1982.
- Fiametti, K. G.; Rovani, S.; Oliveira, D.; Corazza, M. L.; Treichel, H.; Oliveira, J. V.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 708.
- AOCS; *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, AOCS Press: Champaign, 2003.
- Krüger, R. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2010.
- Novo Nordisk; *Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions*, Technical Report A-05948, 1992.
- Rodrigues, R. C.; Fernandez-Lafuente, R.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *66*, 15.
- Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Macrae, A.R.; *FEBS Lett.* **1992**, *301*, 258.
- Mestri, S. D.; Pai, J. S.; *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 459.
- Chulalaksananukul, W.; Condoret, J.-S.; Combes, D.; *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 691.
- Quirós, M.; Parker, M. C.; Turner, N. J.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5074.
- Dellamora-Ortiz, G. M.; Martins, R. C.; Rocha, W. L.; Dias, A. R.; *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1997**, *26*, 31.
- Rosen, M. J.; *Surfactants and interfacial phenomena*, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-Interscience: New York, 2004.
- Chojnacka, A.; Gładkowski, W.; Kielbowicz, G.; Wawrzen zyk, C.; *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 705.
- Hossen, M.; Hernandez, E.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 730.
- Skagerlind, P.; Folmer, B.; Jha, B. K.; Svensson, M.; Holmberg, K.; *Progr. Colloid Polym. Sci.* **1998**, *108*, 47.
- Skagerlind, P.; Jansson, M.; Bergenståhl, B.; Hult, K.; *Colloids Surf., B* **1995**, *4*, 129.
- Bendikienė, V.; Surinėnaitė, B.; Bachmatova, I.; Marcinkevičienė, L.; Juodka, B.; *Hydrolysis Biologija* **2005**, *1*, 27.
- Feltes, M. M. C.; Villeneuve, P.; Baréa, B.; Barouh, N.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D.; Ninow, J. L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 1057.
- Holm, H. C.; Cowan, D.; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 679.
- [http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate\\_report.pdf](http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate_report.pdf), acessada em Novembro 2012.
- Gaoa, X. G.; Caob, S. G.; Zhanga, K. C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *27*, 74.