

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – *CAMPUS* POÇOS DE CALDAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

JULIA BATISTA BOTELHO LASCHI

OBTENÇÃO DE LIPÍDEOS ESTRUTURADOS POR ACIDÓLISE ENZIMÁTICA EM
REATORES DE TANQUE AGITADO E LEITO FIXO

POÇOS DE CALDAS/MG

2020

JULIA BATISTA BOTELHO LASCHI

**OBTENÇÃO DE LIPÍDEOS ESTRUTURADOS POR ACIDÓLISE
ENZIMÁTICA EM REATORES DE TANQUE AGITADO E LEITO FIXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ariela Veloso de Paula

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Grazielle Santos Silva Andrade

Poços de Caldas/MG

2020

Dados internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

- L333o Laschi, Julia Batista Botelho.
Obtenção de lipídeos estruturados por acidólise enzimática em reatores de tanque agitado e leito fixo. / Julia Batista Botelho Laschi. Poços de Caldas /MG, 2020.
78 f.-
- Orientador: Ariela Veloso de Paula.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –
Universidade Federal de Alfenas– Campus de Poços de Caldas, 2020.
Bibliografia
1. Imobilização enzimática. 2. Triglicérides estruturados. 3. Sabugo de milho.
I. Paula, Ariela Veloso de (orient.). II. Título.

CDD - 660

AGRADECIMENTOS

Terminada essa jornada, é hora de olhar para trás e tentar agradecer, em poucas palavras, àqueles que me acompanharam e foram fundamentais para que eu conquistasse esse título. Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade e por me dar forças em todos os momentos. Agradeço aos meus pais, Ana e Alfredo, e minha avó Georgina por sempre priorizarem minha educação e serem meu porto seguro. Agradeço ao meu irmão Bruno por todo apoio e também por me inspirar a correr atrás dos meus objetivos. Agradeço ao meu namorado Renato por todos os desabafos e por me dar forças quando tudo parecia impossível. Agradeço aos amigos de laboratório Beatriz Marques, Estela Mesquita, Marina Rodrigues e Vinícius Guerso não só pelos conhecimentos técnicos compartilhados, mas principalmente pelo dia a dia e por tudo que fizeram por mim, vocês foram essenciais. Agradeço as minhas orientadoras Ariela Veloso de Paula e Grazielle Santos Silva Andrade pelo apoio, oportunidade e trocas de conhecimentos. Agradeço a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) por todas as oportunidades desde a graduação e por formar o que sou hoje. Agradeço ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) de Araraquara pela acolhida e pela oportunidade de realizar a parte experimental em seus laboratórios. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo – FAPESP (Processo 2017/11482-7), as quais agradeço imensamente pelos apoios financeiros. Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a síntese enzimática de lipídeos estruturados, a partir da acidólise de ácido cáprico (C₁₀) e óleo de semente de uva, previamente caracterizado quanto aos índices de peróxido e acidez, bem como perfil composicional em ácidos graxos. Optou-se pela rota enzimática, utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae* (rROL) imobilizada covalentemente em pó de sabugo de milho. O pó de sabugo de milho *in natura*, amostras de todas as etapas de ativação do suporte, bem como o derivado imobilizado foram submetidos a análises de FTIR, MEV e elementar por EDS, a fim de conhecer a estrutura do suporte. Utilizaram-se planejamentos experimentais para avaliação da influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada. Os biocatalisadores na forma livre e imobilizada também foram caracterizados quanto à estabilidade térmica, verificando-se aumento de cerca de 30 vezes a estabilidade térmica do biocatalisador imobilizado. As reações de acidólise foram realizadas em reatores de tanque agitado e leito fixo. Os produtos foram analisados quanto ao grau de incorporação (GI) e índice de peróxido (IP). Para os reatores de tanque agitado, as reações foram efetuadas por 24 horas, obtendo-se GI médio de $55 \pm 0,3\%$. A reação em reator de leito fixo, com reciclo total, foi conduzida por 120 horas obtendo-se GI máximo de 54,5% em 120 horas. Dessa forma, verificou-se que a enzima de *Rhizopus oryzae* foi satisfatoriamente imobilizada em pó de sabugo de milho. Além disso, esta enzima apresentou potencial para aplicação nas reações de acidólise, visando à obtenção de triglicerídeos estruturados, uma vez que os graus de incorporação obtidos foram satisfatórios.

Palavras-chave: Imobilização enzimática. Triglicerídeos estruturados. Leito fixo. Sabugo de milho.

ABSTRACT

The present work aimed at the enzymatic synthesis of structured lipids, based on acidolysis of capric acid (C10) and grape seed oil, previously characterized in terms of peroxide and acidity indices, as well as compositional profile in fatty acids. The enzymatic route was chosen, using *Rhizopus oryzae* lipase (rROL) immobilized covalently in corncob powder. The corn cob powder in natura, samples from all stages of activation of the support, as well as the immobilized derivative were subjected to FTIR, SEM and elemental analyzes by EDS, in order to know the structure of the support. Experimental designs were used to evaluate the influence of temperature and pH on the hydrolytic activity of the free and immobilized enzyme. Biocatalysts in free and immobilized form were also characterized in terms of thermal stability, with an increase of about 30 times the thermal stability of the immobilized biocatalyst. The acidolysis reactions were carried out in agitated tank and fixed bed reactors. The products were analyzed for the degree of incorporation (GI) and peroxide index (IP). For stirred tank reactors, the reactions were carried out for 24 hours, with an average GI of $55 \pm 0.3\%$. The reaction in a fixed bed reactor, with total recycling, was carried out for 120 hours, obtaining a maximum GI of 54.5% in 120 hours. Thus, it was found that the enzyme of *Rhizopus oryzae* was satisfactorily immobilized in corn cob powder. In addition, this enzyme showed potential for application in acidolysis reactions, aiming at obtaining structured triglycerides, since the degrees of incorporation obtained were satisfactory.

Keywords: Enzymatic immobilization. Structured triglycerides. Fixed bed. Corn cob.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema genérico da reação de acidólise.	19
Figura 2 - Representação da lipase com os lids fechado (A) e aberto (B).	20
Figura 3 - Esquema dos métodos de imobilização mais utilizados.	22
Figura 4 - Representação da parede celular do pó de sabugo de milho.	24
Figura 5 - Representação de um reator enzimático de tanque agitado.	25
Figura 6 - Representação de um reator de leito fixo recheado com biocatalisador.	26
Figura 7 - Fluxograma representativo das etapas de ativação do pó de sabugo de milho para utilização como suporte de imobilização da lipase, bem como os grupamentos químicos inseridos em cada etapa.	29
Figura 8- Cromatograma obtido por cromatografia gasosa do óleo de semente uva puro utilizado para reações de acidólise enzimática com ácido cáprico e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.	40
Figura 9 - FTIR do pó de sabugo de milho puro, pós tratamento térmico e pós tratamento básico.	41
Figura 10 - FTIR do pó de sabugo de milho pós tratamento básico, bem como ativado com gliceril e glioxil.	42
Figura 11 - FTIR do pó de sabugo de milho pós tratamento básico, bem como funcionalizado com grupamento amino e com glutaraldeído.	43
Figura 12 - FTIR do pó de sabugo de milho tratamento básico, derivado imobilizado e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> livre.	44
Figura 13 - MEV do pó de sabugo de milho in natura, antes dos tratamentos físico-químicos. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	45
Figura 14 - MEV do pó de sabugo pós tratamento térmico. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	45
Figura 15 - MEV do pó de sabugo pós tratamento básico. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	46
Figura 16 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento gliceril. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	47
Figura 17 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento glioxil. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	47
Figura 18 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento amino. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	48
Figura 19 - MEV do pó de sabugo funcionalizado com glutaraldeído. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	48
Figura 20 - MEV do derivado imobilizado. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.	49
Figura 21 - Concentração traçador (mg/mL) em função do tempo (min) em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise de óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisado por lipase imobilizada em pó de sabugo de milho.	51
Figura 22 - t.E(t) em função do tempo para teste de traçador realizado em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise enzimática com óleo de semente de uva e ácido cáprico para a produção de lipídeos estruturados.	52
Figura 23 - Valores experimentais e valores previstos para o modelo de atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> na forma livre.	55

Figura 24 - Superfícies obtidas no planejamento experimental DCCR para a atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> como resposta da variação de pH e temperatura.	56
Figura 25 - Atividade residual da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> em função do tempo de incubação na temperatura de 45°C e pH = 7.	57
Figura 26 – Linearização dos dados de atividade hidrolítica para determinação da constante de desativação térmica da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> livre.	58
Figura 27 - Valores experimentais e valores previstos para o modelo de atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.	61
Figura 28 - Superfícies obtidas no planejamento experimental DCCR para a atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> em pó de sabugo de milho como resposta da variação de pH e temperatura.	62
Figura 29 - Atividade residual da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho em função do tempo decorrido de incubação na temperatura de 45°C e pH = 7.	64
Figura 30 - Linearização dos dados de atividade hidrolítica para determinação da constante de desativação térmica da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.	65
Figura 31 - Graus de incorporação (GI, %) médios em função do tempo para triplicata de reações de acidólise em reator de tanque agitado.	68
Figura 32 - Grau de incorporação (GI, %) em função do tempo para reação de acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisada por lipase de ROL imobilizada em pó de sabugo de milho, em reator de leito fixo, operando em modo batelada.	69
Figura 33 - Curva de calibração do corante lipossolúvel Rosa Mix® utilizado no teste de traçador em reator de leito fixo.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos essenciais (%) dos óleos de coco, girassol, azeite de oliva comparados ao óleo de semente de uva.....	17
Tabela 2 - Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em função das reações que catalisam.....	18
Tabela 3 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.....	28
Tabela 4 - Matriz do delineamento experimental da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> na forma livre para avaliação da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.....	32
Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho para avaliação da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.....	33
Tabela 6 - Índices de peróxido e acidez do óleo de semente de uva puro utilizado nas reações de acidólise com ácido cáprico e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.....	39
Tabela 7 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa do óleo de semente de uva puro utilizado para as reações de acidólise enzimática com ácido cáprico e lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.....	40
Tabela 8. Análise química do pó de sabugo de milho in natura, de cada etapa do processo de ativação, bem como do derivado imobilizado, realizadas por EDS.....	49
Tabela 9- Parâmetros de operação do teste de traçador em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise enzimática para produção de lipídeos estruturados e determinação do tempo espacial.....	53
Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental DCCR: variáveis independentes (pH e temperatura) e a variável resposta (atividade enzimática, U.g ⁻¹) para cada ensaio.....	54
Tabela 11- Matriz do planejamento experimental DCC: variáveis independentes (pH e temperatura) e a variável resposta (atividade enzimática, U.g ⁻¹) para cada ensaio.....	60
Tabela 12 - Comparação entre concentração de proteínas na enzima livre e no sobrenadante após a imobilização utilizando carregamento de 5 mg/mL e 25 mg/mL.....	66
Tabela 13 - Atividades hidrolíticas (U.g ⁻¹) dos derivados imobilizados antes e após a reação de acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisada por lipase de ROL, em reator de leito fixo operando em batelada.....	70
Tabela 14 - Concentrações do traçador (mg.mL ⁻¹) e respectivas absorbâncias das amostras coletadas durante a execução do teste de traçador em reator de leito fixo.....	78
Tabela 15 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor no estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da lipase livre de <i>Rhizopus oryzae</i>	79
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i>	79
Tabela 17 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor no estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.....	80
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho ...	80

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 ÓLEOS E GORDURAS	15
3.1.1 LIPÍDIOS ESTRUTURADOS	15
3.1.2 ÓLEO SEMENTE DE UVA	17
3.2 ENZIMAS	17
3.2.1 LIPASES E RROL.....	19
3.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	21
3.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO	22
3.4.1 PÓ DE SABUGO DE MILHO	23
3.5 REATORES ENZIMÁTICOS	24
3.5.1 REATORES DE TANQUE AGITADO (STR).....	25
3.5.2 REATORES DE LEITO FIXO (PBR).....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 SÍNTESE DO BIOCATALISADOR	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS LIVRE E IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO	31
4.2.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE HIDROLÍTICA	31
4.2.2 INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i>	32
4.2.3 ENSAIOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA	33
4.2.4 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DESATIVAÇÃO (K_D) E DO TEMPO DE MEIA VIDA ($T_{1/2}$).....	34
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO REATOR DE LEITO FIXO.....	34
4.3.1 TESTE DE TRAÇADOR	34
4.4 REAÇÕES DE ACIDÓLISE E ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS	36
4.4.1 REATOR DE TANQUE AGITADO OPERANDO EM BATELADA.....	36
4.4.2 REATOR DE LEITO FIXO COM RECICLO TOTAL	36

4.4.3 NEUTRALIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL APÓS REAÇÃO	36
4.4.4 METILAÇÃO DOS TAG APÓS SEPARAÇÃO	37
4.4.5 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS.....	37
4.4.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INCORPORAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	38
4.4.7 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE PERÓXIDO (IP) E ACIDEZ	38
5.1 PROPRIEDADES DAS MATÉRIAS PRIMAS	39
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA.....	39
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE SABUGO DE MILHO.....	41
5.2 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)	51
5.3 CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA DE <i>RHIZOPUS ORYZAE</i> NA FORMA LIVRE	53
5.3.1 INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA LIVRE	53
5.3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA.....	57
5.4 PROPRIEDADES DA ENZIMA IMOBILIZADA	59
5.4.1 INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA IMOBILIZADA.....	59
5.4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA.....	64
5.5 TESTE DE CARREGAMENTO	66
5.6. REAÇÕES DE ACIDÓLISE DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA E ÁCIDO CÁPRICO	67
5.6.1 REAÇÃO EM REATOR DE TANQUE AGITADO	67
5.6.2 REAÇÃO EM LEITO FIXO OPERANDO COM RECICLO TOTAL	69
6 CONCLUSÕES.....	72
Apêndice A – Curva de calibração do corante utilizado no teste de traçador	78
Apêndice B – Teste ANOVA, coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p valore do delineamento experimental da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> livre.....	79
Apêndice C - Teste ANOVA, coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p valore do delineamento experimental da enzima de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em pó de sabugo de milho.....	80

1 INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras são componentes fundamentais da dieta humana, pois além de fornecerem energia, transportam e proveem ácidos graxos essenciais ao organismo. Por outro lado, esses alimentos devem ser ingeridos de forma controlada devido aos elevados valores energéticos. Sendo assim, visando atender uma crescente demanda da população por hábitos alimentares mais saudáveis, os estudos para a produção de óleos com características como menor valor calórico e ácidos graxos de interesse em sua cadeia, vem ganhando destaque (MOREIRA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017).

Nesse contexto, surgiram os lipídeos estruturados, definidos como triglicerídeos (TAGs) modificados, química ou enzimaticamente, a fim de adquirirem propriedades físico químicas, nutraceuticas e funcionais. Esses triglicerídeos podem apresentar menores valores calóricos quando comparados aos óleos tradicionais. Além disso, sua ingestão reduz as taxas de colesterol e são indicados para pacientes com insuficiência pancreática e outras deficiências na absorção de gorduras (ABED *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2017).

Os triglicerídeos estruturados podem ser sintetizados por reações de acidólise utilizando lipases (EC 3.1.1.3). A rota enzimática é específica e seletiva, evitando assim a formação de produtos indesejados e, conseqüentemente, facilitando a separação do produto de interesse. Outra vantagem da utilização de enzimas ao invés da rota química convencional é a redução dos gastos energéticos, uma vez que as reações são conduzidas a temperaturas menores (ABED *et al.*, 2018; KIM, AKOH, 2015).

Em processos enzimáticos, as enzimas podem ser aplicadas em sua forma livre ou imobilizadas (COSTA *et al.*, 2017). O processo de imobilização pode aumentar a estabilidade da enzima, atividade e seletividade; porém, também podem ser observados efeitos de limitação da transferência de massa e alterações negativas na estrutura conformacional das enzimas podem ser observadas. Por essa razão, a escolha do suporte e do método de imobilização a serem utilizados é de extrema importância para a eficiência do biocatalisador (KIM, AKOH, 2015; ZHAO *et al.*, 2019).

A imobilização enzimática permite a aplicação de enzimas em processos industriais, uma vez que viabiliza sua utilização em reatores contínuos ou a reutilização em reatores operando em modo batelada (COSTA *et al.*, 2017). Nesse sentido, os reatores mais utilizados para a síntese de lipídeos estruturados são os reatores de tanque agitado (STR) operando em

batelada e os de leito fixo (PBR), operando com reciclo total e contínuo. A escolha do biorreator mais adequado para cada processo depende de variáveis como controle de temperatura, agitação, contato entre enzima e substrato e reutilização do catalisador (PINO *et al.*, 2018; SEN, NATH, BHATTACHARJEE, 2016).

Os STR são amplamente utilizados em bioprocessos devido a sua simples configuração, possibilidade de reações em escala piloto e intenso contato entre enzima e substrato (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012). Por outro lado, o potencial de reutilização dos biocatalisadores em PBR é maior que em STR, uma vez que a agitação desses reatores pode danificar a estrutura do suporte (KIM, AKOH, 2015). Os reatores de leito fixo apresentam maior facilidade de separação do biocatalisador, garantindo que o produto desejado seja livre de contaminantes. Além disso, os reatores PBR apresentam maior conversão por unidade de massa de catalisador quando comparado a outros reatores catalíticos como reator de leito fluidizado (FOGLER, 2012).

Com base nas informações anteriores e somada aos poucos trabalhos encontrados na literatura sobre a produção de triglicerídeos estruturados em reatores de leito fixo, o objetivo deste trabalho foi sintetizar triglicerídeos estruturados, utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico. As reações foram conduzidas em reatores de tanque agitado e leito fixo e catalisadas pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada covalentemente em pó de sabugo de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* (rROL), utilizando pó de sabugo de milho como suporte, bem como a aplicação do derivado imobilizado para a síntese de lipídeos estruturados por acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico em reatores de tanque agitado e de leito fixo operando com reciclo total.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a enzima de rROL livre quanto à estabilidade térmica, bem como avaliar a influência de pH e temperatura na sua atividade hidrolítica empregando-se delineamento experimental;
- Caracterizar o pó de sabugo de milho puro, bem como o derivado imobilizado por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho (FTIR);
- Imobilizar a lipase de rROL em pó de sabugo de milho e caracterizar o derivado quanto a estabilidade térmica, bem como estudar a influência de pH e temperatura na sua atividade hidrolítica empregando-se delineamento experimental;
- Síntese de lipídeos estruturados por acidólise enzimática em reator de tanque agitado operando em batelada;
- Síntese de lipídeos estruturados por acidólise enzimática em reator de leito fixo operando com reciclo total;
- Analisar o grau de incorporação e índice de peróxido dos produtos obtidos nas reações de acidólise;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEOS E GORDURAS

Lipídios são constituintes essenciais da dieta alimentar humana, principalmente devido aos seus elevados valores energéticos e por serem uma excelente fonte de vitaminas lipossolúveis e antioxidantes. Além disso, se destacam também por fornecer ao organismo os ácidos graxos essenciais, definidos como aqueles que o organismo humano não é capaz de sintetizar por suas vias metabólicas (COSTA *et al.*, 2017; MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005; LYU *et al.*, 2019).

Os óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas, podendo ter origem animal ou vegetal. Se diferenciam em função de seus pontos de fusão, uma vez que os óleos são líquidos a temperatura entre 18 e 22°C, enquanto as gorduras, sólidas (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005). São constituídos majoritariamente por triglicerídeos (TAGs), compostos por ácidos graxos e glicerol (VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos diferem entre si quanto ao número de hidrocarbonetos em sua cadeia, bem como pela quantidade e posição de suas insaturações presentes. Desta forma, são comumente classificados quanto ao comprimento de suas cadeias carbônicas. Os denominados de cadeia curta possuem até seis carbonos, os de cadeia média entre seis e doze e por fim, os de cadeia longa possuem mais que doze carbonos. Estudos mostram a relação positiva entre o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, bem como sua posição no triglicerídeo, e a saúde humana. (MOREIRA *et al.*, 2017). Por este motivo, a síntese de lipídeos com ácidos graxos específicos, em posições conhecidas do triglicerídeo tem ganhado destaque no meio científico.

3.1.1 LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

A Vigitel, pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde, anualmente nas capitais do país e no Distrito Federal, apontou que em 2018, 55,7% da população adulta apresentou excesso de peso e 19,8% são obesos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, atingindo crianças e adultos (VIGITEL, 2018). Nesse sentido, a demanda por alimentos mais saudáveis, que reduzam a obesidade e que atendam a parcela da população que necessita de dietas com baixos valores energéticos tem crescido consideravelmente nos últimos anos.

Visando atender esta necessidade, surgiram os lipídeos estruturados, definidos como óleos modificados a fim de alterar o tipo ou a posição dos ácidos graxos no esqueleto do

glicerol. Podem ser sintetizados com o intuito de modificar e/ou melhorar propriedades físico-químicas ou texturais, bem como para adquirirem propriedades nutracêuticas (CHOI, HAN, KIM, 2015; PANDE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2012). Como exemplos de características que esses óleos podem apresentar, pode-se citar os baixos valores calóricos quando comparados aos tradicionais, além de serem favoráveis no controle do colesterol, uma vez que reduzem os índices das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sem prejudicar os índices das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (ABED *et al.*, 2018). Além disso, estes óleos são indicados para pessoas com deficiência na absorção de gorduras e insuficiência pancreática, sendo assim uma área promissora de estudos (CABALLERO *et al.*, 2014).

Estes óleos podem ser modificados quimicamente ou enzimaticamente, sendo essa mais vantajosa. Esse fato se justifica uma vez que reações por essa via são conduzidas em condições amenas, além da facilidade de se recuperar o biocatalisador. Outro fator importante é seletividade ou especificidade da enzima, o que minimiza ou extingue a formação de subprodutos na reação, evitando assim custos de purificação e garantindo produtos mais seguros (ABED *et al.*, 2018; CHOI, HAN, KIM, 2015).

Estudos comprovam que as propriedades funcionais e nutricionais dos lipídeos estão fortemente relacionadas aos seus ácidos graxos e suas respectivas posições na cadeia do triglicerídeo (ABED *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2012). Nesse sentido, os lipídeos de baixa caloria podem apresentar três possíveis configurações: SLS, triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia curta, S, nas posições sn-1 e sn-3, e cadeia longa, L, na posição sn-2; MLM, com cadeias médias, M, nas posições sn-1 e sn-3, e de cadeia longa na posição central e por último, MMM, com todos os ácidos graxos de cadeia média (FERREIRA-DIAS *et al.*, 2013).

Durante a digestão destes triglicerídeos, a lipase pancreática atua nas posições sn-1 e sn-3, permitindo assim, que esses ácidos graxos de cadeias menores e mais solúveis sejam rapidamente absorvidos pelo intestino e metabolizados pelo fígado. Este fato favorece a absorção dos ácidos graxos de cadeia longa presentes na posição central do TAG (ANG, QUEK, CHEN, 2018; WANG *et al.*, 2012). Devido a este fato, esses TAG são menos propensos a se acumularem no organismo humano na forma de gordura (COSTA *et al.*, 2017; ABED *et al.*, 2018).

A síntese enzimática de lipídeos estruturados é geralmente catalisada por lipases 1,3 específicas, empregadas com o intuito de incorporar ácido caprílico (C₈) ou ácido cáprico (C₁₀) nas posições 1 e 3 de diversos óleos vegetais (FERREIRA-DIAS *et al.*, 2013). Neste trabalho, foram sintetizados triglicerídeos estruturados por via enzimática, utilizando-se uma lipase 1,3 específica para incorporação de ácido cáprico em óleo de semente de uva.

3.1.2 ÓLEO SEMENTE DE UVA

A demanda crescente por uma alimentação mais saudável e balanceada tem incentivado a produção de lipídeos estruturados a partir de óleos de origem vegetal. Por esse motivo, estudos buscam fontes alternativas desses óleos, especialmente de frutas e suas sementes, em substituição aos mais comumente utilizados como os óleos de soja, canola, milho, girassol e azeite de oliva (SHINAGAWA *et al.*, 2017).

Neste contexto, o óleo de semente de uva prensado a frio, utilizado na execução deste trabalho é uma excelente escolha. Segundo dados da EMBRAPA, em 2018 o Brasil teve sua produção de uva na ordem de 1,5 milhões de toneladas, sendo desse total cerca de 50% dedicado a produção de vinho e suco (EMBRAPA, 2018). Desse montante, a massa de semente de uva representa cerca de 12%, valor expressivo de resíduo que requer descarte adequado. Sendo assim, utilizar o óleo de semente de uva é uma oportunidade de agregar valor ao rejeito das vinícolas, além de ser um óleo ambientalmente sustentável (SHINAGAWA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2014). A Tabela 1 compara o óleo de semente de uva com demais óleos comerciais empregados na alimentação humana (GARAVAGLIA *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos essenciais (%) dos óleos de coco, girassol, azeite de oliva comparados ao óleo de semente de uva.

Ácido graxo	Óleo de semente de uva	Azeite de oliva	Óleo de girassol	Óleo de coco
C18:0	3,5	2,3	2,8	2,7
C18:1	14,3	66,4	28,0	6,2
C18:2	74,7	16,4	62,2	1,6

Fonte: o autor.

Analisando-se os dados da Tabela 1, verifica-se que o óleo de semente de uva é uma promissora matéria prima para a produção de triglicerídeos estruturados, utilizando-se a rota enzimática.

3.2 ENZIMAS

Enzimas são proteínas com propriedades catalíticas, podendo ser de origem vegetal, animal ou microbiana (RAMOS; MALCATA, 2017). Esses biocatalisadores possuem elevado potencial de aplicação em diversas áreas devido a sua seletividade, especificidade e atividade

em condições controladas de pH e temperatura (GALAN, 2011; COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

As reações enzimáticas apresentam diversas vantagens quando comparadas as rotas orgânicas convencionais, como por exemplo, a geração de menos resíduos, além da redução de gastos energéticos e com separação dos produtos formados. Todos esses fatores, somados à crescente demanda por processos mais sustentáveis e ambientalmente favoráveis, resultaram no crescimento expressivo na quantidade de estudos em biocatálise (SHELDON, PELT, VAN, 2013; SAID, S.; PIETRO, R., 2014).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), em 1971, estabeleceu normas de nomenclatura e classificação das enzimas, conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação das enzimas de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em função das reações que catalisam.

Classificação	Enzimas	Reações que catalisam
Oxido-redutases	Hidrogenases, oxidases, peroxidases, hidroxilases, oxigenases.	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
Transferases	Aminotransferases, acetiltransferases, cinases, fosforilases, frutossiltransferases.	Transferência de grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil entre duas moléculas.
Hidrolases	Lipases, proteases, amilases, pectinases.	Reações de hidrólise de ligação covalente.
Liases	Descarboxilases, aldolases.	Adição ou remoção de um grupo do substrato.
Isomerasas	Glicose-isomerase.	Reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos.
Ligases	Piruvato carboxilase.	Reações de síntese entre moléculas.

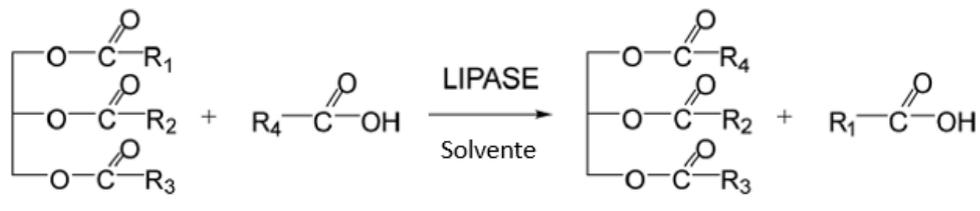
Fonte: adaptado de MONTEIRO; SILVA, 2009; SAID, S.; PIETRO, R., 2014.

Devido a sua grande versatilidade, as lipases se destacam e são empregadas em diversos processos industriais como na produção de papel e celulose, têxtil, couro e, na sua maioria, indústria alimentícia (SOUZA VANDENBERGHE, *et al.*, 2016).

3.2.1 LIPASES E RROL

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres. Atuam nas ligações ésteres das longas moléculas de triglicerídeos, liberando ácidos graxos e glicerol (MEHTA, BODH, GUPTA, 2017; RAMOS, MALCATA, 2017). As lipases atuam na interface óleo-água catalisando reações de transesterificação: alcoólise, quando o substrato empregado é um álcool, interesterificação, na qual um triacilglicerol está presente no meio reacional e acidólise, na qual o substrato é um ácido. Um esquema genérico da reação de acidólise está representada na Figura 1 (RAMOS, MALCATA, 2017).

Figura 1 - Esquema genérico da reação de acidólise.



Fonte: FERREIRA-DIAS *et al.* (2018).

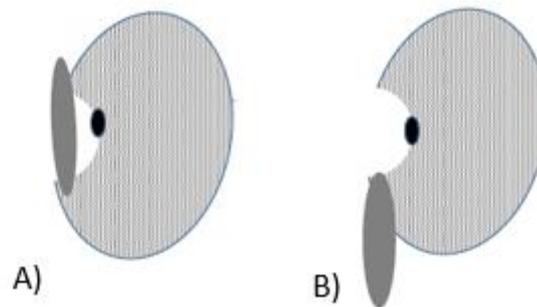
As lipases podem ser classificadas quanto a sua especificidade, em três grupos (KAPOOR, GUPTA, 2012; LAI *et al.*, 2019):

- *Lipases não específicas*: hidrolisam todos os ácidos graxos de forma randômica, independentemente das posições que se encontram na estrutura do glicerol;
- *Lipases 1,3 específicas*: são a maioria das lipases conhecidas atualmente, hidrolisam somente os ácidos graxos disponíveis nas posições sn-1 e sn-3;
- *Lipases de ácidos graxos específicos*: um seletivo grupo de lipases hidrolisam preferencialmente as duplas ligações entre os carbonos de número 9 e 10 das cadeias de ácidos graxos.

Esses biocatalisadores apresentam uma particularidade em sua estrutura chamada de *lid*, uma espécie de “tampa” móvel que pode estar em sua forma aberta ou fechada. Em meios aquosos, o *lid* se encontra fechado, ou seja, o sítio ativo da lipase torna-se inacessível, pois se

encontra fechado. Sendo assim, as lipases precisam estar em meios não aquosos, a fim de que seus *lids* se abram e sejam capazes de catalisar as reações (Figura 2) (ZHAO *et al.*, 2019; ZORN *et al.*, 2016). Nesse sentido, lipases necessitam ser ativadas a fim de que seus sítios ativos fiquem disponíveis para efetuar a catálise, sendo a imobilização enzimática uma das alternativas para essa ativação. Porém, caso esse processo não seja realizado de maneira eficiente, ao invés de abri-los o processo pode resultar em seu fechamento, tornando as enzimas inativas (KAPOOR, GUPTA, 2012; LAI *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2019; ZORN *et al.*, 2016).

Figura 2 - Representação da lipase com os *lids* fechado (A) e aberto (B).



Fonte: Adaptado de RODRIGUES (2019).

O controle cada vez mais eficiente dos processos fermentativos garantiu que as lipases de origem microbiana conquistassem seu espaço no mercado industrial. Este fato pode ser justificado uma vez que os micro-organismos são independentes de intempéries sazonais e geográficas, seu tempo de produção é menor quando comparado aos animais e vegetais, além de modificações genéticas, responsáveis pelo aprimoramento das linhagens, o que favorece o rendimento de produção. Por outro lado, uma vez que um único micro-organismo é capaz de produzir diversas enzimas, faz-se necessária uma etapa de purificação para separar os possíveis contaminantes (SAID; PIETRO, 2010).

Um dos microorganismos mais utilizados para produção de lipases é o *Rhizopus oryzae* (rROL), amplamente encontrado em regiões de climas tropical e sub-tropical. Podem ser isolados de diversas fontes, como frutas, vegetais, sementes e no solo e possuem rápido crescimento (LONDOÑO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017; VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

Sua utilização vai muito além da produção de enzimas, podendo também ser aplicado na produção de bebidas alcoólicas de ácidos orgânicos, como o lático e o fumárico, entre outras aplicações na indústria alimentícia. Estes fatores tornam o ROL um microorganismo atrativo

para a aplicação industrial e estudos em escala laboratorial, motivando assim sua utilização neste projeto. Para sua utilização na produção de lipídeos estruturados em reatores enzimáticos, faz-se necessária sua separação do meio reacional, utilizando para isso, sua imobilização em suportes heterogêneos (LONDOÑO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

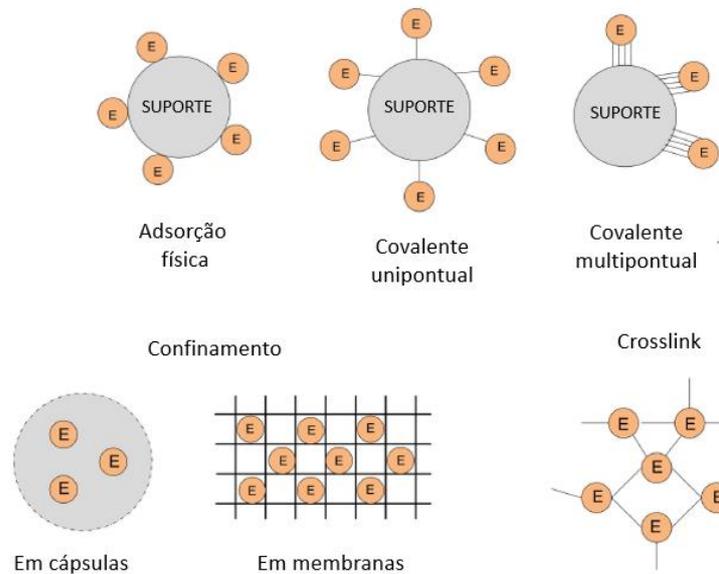
3.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas, em suas condições fisiológicas naturais, atuando sobre condições brandas no organismo possuem elevadas seletividade e especificidade. Industrialmente sua aplicação na forma livre torna-se inviável uma vez que essas aplicações exigem que o biocatalisador atue em condições distintas, como por exemplo elevadas temperaturas e pH (POPPE *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019). Este fato eleva os custos de produção, pois uma vez que as enzimas estão homogeneizadas no meio, novas cargas enzimáticas são requeridas constantemente e a purificação do produto, além de encarecer o processo, pode não ser eficiente. Esses fatores também dificultam a realização de processos contínuos, inviabilizando ainda mais a aplicação industrial desses processos (PINO *et al.*, 2018; SEN, NATH, BHATTACHARJEE, 2016).

Uma alternativa a este empecilho é a imobilização enzimática, que consiste no confinamento físico da enzima em suporte específico, como por exemplo, partículas magnéticas, zeólitas, polímeros e resíduos de outros processos (POPPE *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2019). Essa técnica confere ao biocatalisador aumento de sua estabilidade térmica, ao pH, possibilidade de aumento da atividade enzimática. Além disso, na presença do suporte a enzima se torna insolúvel no meio reacional, viabilizando assim sua separação e possível reutilização, tornando o processo mais viável no ponto de vista econômico (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Por outro lado, o processo de imobilização enzimática pode causar efeitos negativos como limitações de transferência de massa e diminuição da atividade catalítica da enzima (ADLERCREUTZ, 2013). O processo de imobilização também pode causar distorções na estrutura da enzima, como por exemplo em seu sítio ativo, tornando-a inativa (BARBOSA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013). Por estes motivos, a escolha adequada do método de imobilização e do suporte são de extrema importância para o bom desempenho do catalisador imobilizado. Os métodos mais utilizados atualmente para imobilização enzimática, ilustrados na Figura 3, são adsorção física, ligações covalentes (uni ou multipontual), confinamentos em cápsulas ou membranas e cross-link (POPPE *et al.*, 2015).

Figura 3 - Esquema dos métodos de imobilização mais utilizados.



Fonte: Adaptado de POPPE (2015).

A ligação covalente também pode ser realizada de forma multi pontual, fornecendo maior estabilidade ao derivado imobilizado. Para isso, o suporte deve possuir grupamentos amino disponíveis para se ligar de forma bastante próxima à enzima, conferindo maior rigidez ao derivado imobilizado (POPPE *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Por se tratar de uma ligação irreversível, esse método permite alta estabilidade entre enzima e suporte, evitando efeitos de dessorção e possível redução da carga enzimática durante o processo (POPPE *et al.*, 2015). A ligação covalente confere maior estabilidade ao biocatalisador, além de aumentar seu tempo de meia-vida. Uma das desvantagens dessa técnica é a possibilidade de alterações estruturais na enzima, causando a perda de sua atividade catalítica (GARMROODI *et al.*, 2016).

A técnica utilizada neste trabalho, consistiu na ligação do tipo covalente entre a enzima e grupos funcionais presentes no suporte. Caso o suporte não possua esses grupamentos funcionais disponíveis, etapas de ativação com reagentes, como glicidol e glutaraldeído, são necessárias antes de utilizá-lo para imobilização (RODRIGUES *et al.*, 2013). Por esse motivo, a escolha do suporte de imobilização adequado para cada aplicação é de extrema importância.

3.4 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

A escolha de um suporte adequado para a imobilização enzimática é uma variável crítica a ser considerada, uma vez que influencia fortemente no sucesso da imobilização, bem como na atuação do biocatalisador. Na etapa de seleção, características químicas e físicas, área

superficial, diâmetro de partícula, porosidade, densidade, toxicidade, custo, possibilidade de regeneração devem ser avaliados. Suportes porosos apresentam vantagens, pois possuem elevada área superficial e não apresentam limitações difusionais (RODRIGUES *et al.*, 2019; SHELDON, PELT, VAN, 2013). Deve-se também considerar em qual configuração de reator o biocatalisador será aplicado a fim de selecionar as características físicas relevantes. Além disso, a escolha do método de imobilização a ser utilizado está fortemente relacionada as propriedades físico-químicas do suporte (COSTA SILVA *et al.*, 2015; POPPE *et al.*, 2015).

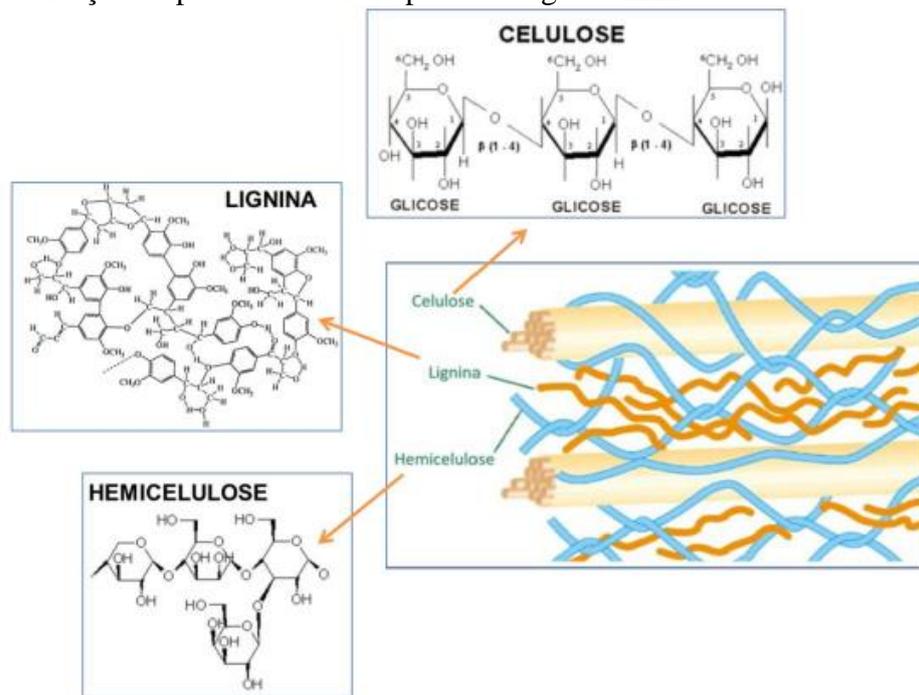
Nesse sentido, a busca por suportes alternativos aos comerciais tem incentivado estudos utilizando resíduos agroindustriais como bagaço da cana, palha de arroz, casca de coco e pó de sabugo de milho (SOUSA *et al.*, 2014). Esses suportes são uma alternativa promissora devido à expressiva agricultura no Brasil e seus consequentes resíduos, os quais, requerem descarte apropriado. Além disso, sua utilização reduz os custos, viabilizando assim o processo de imobilização enzimática, uma vez que suportes comerciais possuem elevado valor agregado (COSTA SILVA *et al.*, 2015).

3.4.1 PÓ DE SABUGO DE MILHO

Segundo dados da CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, a previsão de produção de milho no Brasil na safra 2018/2019 é de 95 milhões de toneladas, sendo a segunda cultura mais plantada no país, perdendo apenas para a soja (CONAB, 2019; IPEA, 2012). Desse montante, a literatura descreve que cerca de 20% da massa seca de milho é composta de sabugo, resultando assim em um volume elevado desse resíduo todos os anos (BASSAN *et al.*, 2016). Geralmente, essa matéria prima é subaproveitada na suplementação de rações animal, biomassa para geração de energia e alimentação de ruminantes (COSTA SILVA *et al.*, 2015).

A parede celular do sabugo de milho é composta majoritariamente por 32% de celulose, 35% de hemicelulose, 20% de lignina, como representado na Figura 4 (SILVA *et al.*, 2016).

Figura 4 - Representação da parede celular do pó de sabugo de milho.



Fonte: CRUZ (2017).

Por esse motivo, os resíduos liganocelulósicos, como o pó de sabugo de milho, apresentam elevado potencial para imobilização enzimática covalentemente graças aos grupos OH- disponíveis nas moléculas de celulose e hemicelulose, justificando assim o suporte selecionado neste trabalho para a produção de lipídeos estruturados em reatores enzimáticos.

3.5 REATORES ENZIMÁTICOS

As reações de acidólise enzimática encontradas na literatura são, em sua maioria, realizadas em reatores de tanque agitado (STR). Há alguns estudos em reatores de leito fixo (PBR), porém essa configuração ainda é pouco explorada (PINO *et al.*, 2018).

Além da escolha da configuração ideal de reator a ser utilizada, faz-se necessário decidir como será feita a alimentação do substrato no meio reacional. A primeira opção é alimentação descontínua ou batelada, a qual se caracteriza como um sistema fechado, ou seja, o substrato e o biocatalisador são carregados no início da reação e o volume se mantém constante durante todo o processo. É uma das configurações que apresenta maiores conversões, devido ao longo tempo de contato entre a enzima e o substrato; em contrapartida, podem haver diferenças nos produtos entre bateladas distintas, como por diferenças físicas, composicionais (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2006).

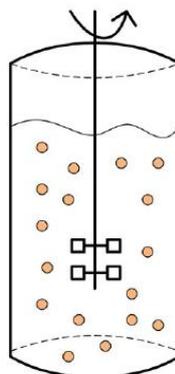
Outro modo de operação possível de ser utilizado é o semi-contínuo ou batelada alimentada. Nesse caso, alimentações intermitentes são realizadas durante a reação química, porém normalmente não há saída de produtos. Estudos reportam vantagens na utilização dessa configuração em processos enzimáticos que apresentam inibição pelo substrato maximizando assim o rendimento da reação (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2006).

Por fim, há também a operação em modo contínuo, na qual o substrato é continuamente alimentado no reator e os produtos continuamente removidos, ambos na mesma vazão, de forma a manter o volume reacional constante. Estudos verificaram que esta configuração é recomendada nos casos de inibição por produto, pois o produto é convertido e logo removido, reduzindo assim sua concentração no meio reacional (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012; LEVENSPIEL, 2006).

3.5.1 REATORES DE TANQUE AGITADO (STR)

Os reatores de tanque agitado (STR), Figura 5, são utilizados principalmente para reações em fase líquida e contam com uma força motriz externa responsável pela agitação. Em escala industrial, pode ser um grande impelidor e em escala laboratorial um agitador magnético. O STR é considerado perfeitamente misturado, ou seja, temperatura, concentração e velocidade de reação são idênticas em todos os pontos do reator, na saída ou em seu interior (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012). Reações enzimáticas que requerem controle rigoroso do pH são indicadas nessa configuração de reator, devido a facilidade de adição de soluções tampão (MARIA, CRISAN, 2011). Por outro lado, a intensa agitação pode promover o cisalhamento do suporte utilizado para a imobilização enzimática (VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

Figura 5 - Representação de um reator enzimático de tanque agitado.



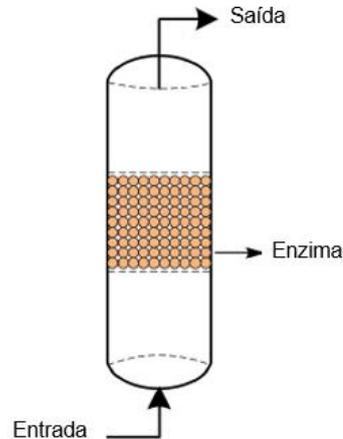
Fonte: Adaptado de POPPE (2015).

A fim de garantir o controle da temperatura do meio reacional, esses reatores podem ser equipados com jaquetas e camisas externas ou mesmo uma serpentina interna. Devido a sua intensa agitação, esses reatores podem conter chicanas, para evitar a formação de vórtex, fenômeno este responsável por prejuízos no contato entre enzima substrato, devido à agitação deficiente (PINO *et al.*, 2018; FOGLER, 2012).

3.5.2 REATORES DE LEITO FIXO (PBR)

Os reatores de leito fixo (PBR) (Figura 6), também chamados de reatores de recheio, geralmente apresentam configuração tubular e são considerados heterogêneos (FOGLER, 2012). São recheados de partículas de catalisador, fixas em seu interior enquanto o substrato flui pelo meio catalítico de modo ascendente ou descendente (TRAN, CHEN, CHANG, 2016). Podem ser utilizados tanto para reações em fase líquida, quanto em fase gasosa. Apesar de não haver agitação como ocorre nos STR, o substrato percorre todo o reator, permitindo assim o contato com o biocatalisador (FOGLER, 2012; VILAS BÔAS *et al.*, 2018).

Figura 6 - Representação de um reator de leito fixo recheado com biocatalisador.



Fonte: Adaptado de POPPE (2015).

Devido ao empacotamento do leito pode haver a formação de caminhos preferenciais e pontos mortos, resultando em partes do leito catalítico sem contato eficiente com o substrato. Além disso, é comum a formação de pontos quentes nessa configuração de reator e por isso em reações enzimáticas a temperatura deve ser severamente controlada a fim de evitar a desnaturação dos biocatalisadores e garantir que estejam nas suas condições ótimas de atuação (FOGLER, 2012; GRUBECKI, 2018).

Como vantagens, o PBR quando aplicado em reações envolvendo biocatalisadores imobilizados, permite a fácil separação do produto do meio reacional, elevando a pureza do

produto de interesse e evitando perda de enzima; permite maior facilidade na reutilização do catalisador em reações de reciclo, reduzindo os custos do processo, além de boa estabilidade operacional da enzima (GANGULY, NANDI, 2015; GRUBECKI, 2018). Finalmente, caracteriza-se como um reator de baixas forças de fricção quando comparado ao de tanque agitado, proporcionando assim menores riscos de cisalhamento do suporte (AL-QODAH *et al.*, 2017; MARIA, CRISAN, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013). Além disso, essa configuração apresenta a mais alta conversão por unidade de massa entre os reatores catalíticos existentes (FOGLER, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Tabela 3 apresenta os equipamentos utilizados para o desenvolvimento dos experimentos descritos.

Tabela 3 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/ fabricante
Medidas de pH	pHmetro	Modelo TEC 2 (TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil)
Teor de umidade	Balança determinadora de umidade	Modelo MOC-63U (Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, Barueri/SP, Brasil)
Separação compostos	Rotaevaporador	Modelo Büchi R-124 (Marshall Scientific, Hampton, EUA)
Agitação	Agitador magnético	Kasvi, Modelo K40-1810H (FISATON Equipamentos Científicos Ltda.)
Composição em TAGs	Cromatógrafo a gás	Modelo CG-2014 (Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, Barueri/SP, Brasil)
Espectroscopia	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	Modelo ALPHA (BRUKER, Alemanha)
Bomba	Bomba peristáltica	Modelo SL-64 (SOLAB Piracicaba/SP, Brasil)
Aquecimento	Agitador magnético com agitação	Kasvi, Modelo K40-1810H (Julabo Labortechnik, Germany)
Análises colorimétricas	Espectrofotômetro	GENESYS™ 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)

Fonte: o autor.

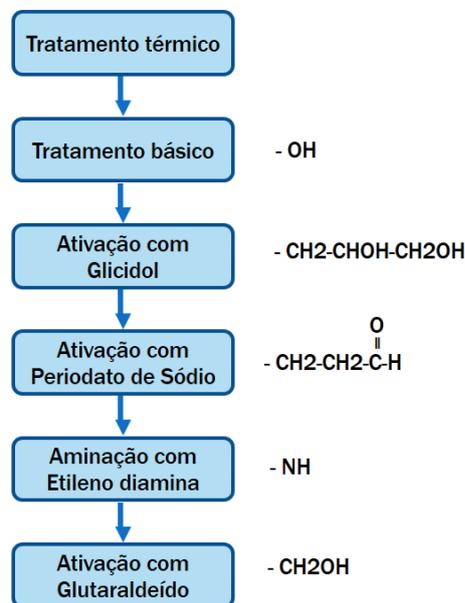
Os experimentos do presente trabalho foram efetuados utilizando lipase de *Rhizopus oryzae*, de grau alimentício, gentilmente cedida pela Prozyn, São Paulo-SP. Como suporte para imobilização, foi utilizado o pó de sabugo de milho, descarte adquirido da empresa Sagraan Indústria e Comércio de Ingredientes Rações Ltda, Andaraí-PR. Além disso, os reagentes óleo de semente de uva (Distriol, São Paulo), ácido cáprico - C10 (Sigma Aldrich, Alemanha), azeite de oliva comercial, álcool comercial, acetona, hexano, glicidol (Sigma Aldrich, Alemanha), borohidreto de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha), periodato de sódio (Sigma Aldrich, Alemanha), etilenodiamina (Sigma Aldrich, Alemanha) e glutaraldeído (Sigma Aldrich, Alemanha), foram utilizados nas reações e análise dos produtos. Os demais reagentes foram de grau analítico.

4.1 SÍNTESE DO BIOCATALISADOR

A metodologia de ativação do suporte utilizado neste trabalho foi adaptada do trabalho de Bassan e seus colaboradores (2016).

O pó de sabugo de milho foi previamente tamizado, sendo selecionada a granulometria entre 30 e 40 mesh. Posteriormente, seguiram as etapas de ativação do suporte, descritas na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma representativo das etapas de ativação do pó de sabugo de milho para utilização como suporte de imobilização da lipase, bem como os grupamentos químicos inseridos em cada etapa.



Fonte: o autor.

Para cada grama de suporte, adicionaram-se 10 mL de álcool 70% em um erlenmeyer e mantido em autoclave digital (120°C, 20 minutos) para expansão do material lignocelulósico presente no material e aumento da superfície de contato.

Pesou-se 0,1 grama de pó de sabugo de milho e sua umidade foi determinada com o auxílio de uma balança de umidade a fim de calcular a massa da amostra em base seca. Dessa forma, para cada grama de amostra em base seca, adicionaram-se 10 mL de solução de NaOH (2 mol/L) e manteve-se sob agitação (140 rpm, 24 horas) a fim de romper e remover a lignina presente no suporte. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo, lavada abundantemente com água destilada até que o filtrado se tornasse incolor e com pH 7, aferido com o auxílio de uma fita de pH.

O suporte foi mantido em estufa (40°C, 24 horas) e a massa em base seca recalculada com o auxílio da balança de umidade. Para a funcionalização com glicidol, para cada grama seca de suporte adicionaram-se 5,8 mL de água destilada, 9,52 mL de NaOH (1,7 M) e 0,068 g de borohidreto de sódio. O suporte foi homogeneizado com os reagentes descritos e em seguida submetido ao banho de gelo para adição gota a gota de 1,7 mL de glicidol. Após este processo, o meio permaneceu sob agitação (140 rpm, 24h) à temperatura ambiente.

Em seguida, o suporte ativado com glicidol foi oxidado com periodato de sódio para obtenção dos grupamentos glioxil. Para cada grama seca de sabugo-glicidol adicionaram-se 8 mL de periodato de sódio (0,1 M) e 32 mL de água destilada. O processo de oxidação foi conduzido à temperatura ambiente e sem iluminação, sob agitação com auxílio de agitador mecânico (2 horas, 140 rpm).

O suporte foi lavado abundantemente com água destilada e filtrado a vácuo para que os grupamentos amino fossem adicionados. Para cada grama de sabugo-glioxil adicionaram-se 22,84 mL de etilenodiamina (2 mol/L, pH 10) e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente (140 rpm, 2 horas). Em seguida, adicionaram-se 5,72 mg de borohidreto de sódio e manteve-se sob agitação por 15 horas. O pó sabugo-amino foi então lavado abundantemente com água destilada e tampão acetato (pH 4, 0,1 mol/L).

Por fim, o sabugo-amino foi ativado com glutaraldeído 2,5%. Para cada grama de suporte funcionalizado adicionaram-se 11,16 mL de glutaraldeído 2,5% (v/v) preparado em tampão fosfato (pH 7, 0,2 mol/L). Suporte e glutaraldeído foram mantidos sob agitação à temperatura ambiente (140 rpm, 15 horas). Após a ativação, o sabugo-glutaraldeído foi abundantemente lavado com água destilada e tampão fosfato (pH 7, 0,025 mol/L) e reservado para ser utilizado como suporte para imobilização enzimática.

Para cada grama seca de suporte ativado com glutaraldeído, adicionaram-se 20 mL de solução de lipase 25 mg/mL em tampão fosfato (pH 7, 0,1 mol/L). O processo de imobilização foi mantido sob agitação mecânica a temperatura ambiente (140 rpm, 24 horas). O rendimento de imobilização foi quantificado pela atividade hidrolítica do sobrenadante antes e depois da imobilização pelo método descrito no item 4.2.1.

O rendimento de imobilização (Eq. 1) do derivado imobilizado covalentemente (Y) foi realizado a partir da determinação das atividades hidrolíticas (Item 4.2.1), conforme descrito por COSTA *et al.* (2018).

$$Y = \left(\frac{A_0 - A}{A_0} \right) \quad (1)$$

Sendo: A_0 = atividade hidrolítica ($U \cdot g^{-1}$) da solução enzimática inicial, sem adição do suporte utilizada como controle e A ($U \cdot g^{-1}$) = atividade hidrolítica do sobrenadante do derivado imobilizado, após o processo de imobilização.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS LIVRE E IMOBILIZADA EM PÓ DE SABUGO DE MILHO

O pó de sabugo de milho *in natura* bem como o derivado imobilizado foram caracterizados utilizando-se Espectroscopia por Infravermelho (FTIR). Para isto, recobriu-se a superfície de leitura do equipamento, composta por diamante, com a amostra a ser analisada. Fez-se a leitura e os dados foram analisados com o auxílio do software Origin Pro 8®.

Amostras obtidas após cada uma das etapas de ativação, bem como o sabugo *in natura* e o derivado imobilizado foram caracterizados utilizando a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com EDS acoplado. Para execução desta análise, as amostras foram previamente recobertas com ouro, utilizando-se uma câmara de vácuo.

4.2.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE HIDROLÍTICA

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de retrotitulação, empregando-se emulsão de azeite de oliva, preparada com 50% (m/m) de azeite, 50% (m/m) de água destilada e 7% (m/m) em relação à massa de água de goma arábica (PAULA, 2012). A reação ocorreu em banho-maria com agitação ($37^\circ C$, 5 minutos) adicionando-se 2 mL da emulsão de azeite, 2,5 mL de tampão fosfato (pH 7, 0,1 mol/L), 1 mL de solução de lipase livre (0,5 mg/mL) ou 0,25 g de derivado imobilizado. A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de solução de etanol, acetona e água, na proporção 1:1:1 (v/v/v). Em seguida, adicionaram-se 3 gotas de fenolftaleína, KOH (0,05 mol/L) suficiente para que a solução se tornasse rosa e realizou-se a retrotitulação com HCl (0,05 M). O branco para essa análise consistiu na adição de todos os reagentes, exceto a enzima. A atividade hidrolítica (A) foi determinada de acordo com a Equação 2:

$$A = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) [HCl] 10^3}{tempo M_{enz}} \quad (2)$$

Na qual: A ($U \cdot g^{-1}$) atividade hidrolítica; V_{branco} = volume de HCl utilizado no branco da reação (mL), V_{amostra} = volume de HCl utilizado na amostra contendo enzima (mL), $[HCl]$ = concentração de HCl padronizado (mol/L), tempo = tempo de reação (min), M_{enz} = massa de enzima adicionada ou de derivado imobilizado (g).

4.2.2 INFLUÊNCIA DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE DE *RHIZOPUS ORYZAE*

Para avaliar a influência do pH e da temperatura da lipase de *Rhizopus oryzae* livre, bem como imobilizada em pó de sabugo de milho, utilizaram-se planejamentos experimentais. Para a enzima livre, utilizou-se a metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), sendo um planejamento fatorial 2^3 com 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios. A Tabela 4 exibe os valores das variáveis codificadas e reais para a enzima na forma livre.

Tabela 4 - Matriz do delineamento experimental da enzima de *Rhizopus oryzae* na forma livre para avaliação da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	pH	T(°C)	pH	T(°C)
1	-1	-1	6,0	35
2	1	-1	9,0	35
3	-1	1	6,0	45
4	1	1	9,0	45
5	-1,41	0	5,4	40
6	1,41	0	9,6	40
7	0	-1,41	7,5	33
8	0	1,41	7,5	47
9	0	0	7,5	40
10	0	0	7,5	40
11	0	0	7,5	40
12	0	0	7,5	40

Fonte: o autor.

Já para a enzima imobilizada em pó de sabugo de milho, utilizou-se a metodologia do Delineamento do Composto Central (DCC). Este estudo consistiu em 7 experimentos, sendo 3 repetições do ponto central. A Tabela 5 valores das variáveis codificadas e reais para a enzima imobilizada em pó de sabugo de milho.

Tabela 5 - Matriz do delineamento experimental da enzima de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho para avaliação da influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	pH	T(°C)	pH	T(°C)
1	-1	-1	6,0	35
2	1	-1	9,0	35
3	-1	1	6,0	45
4	1	1	9,0	45
5	0	0	7,5	40
6	0	0	7,5	40
7	0	0	7,5	40

Fonte: o autor.

Ambos os planejamentos foram realizados de maneira aleatória, e as influências do pH e da temperatura na atividade enzimática foram determinadas pela reação de hidrólise do azeite de oliva de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o auxílio do programa computacional Protimiza Experimental Design® (2014).

4.2.3 ENSAIOS DE ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da enzima de *Rhizopus oryzae* na forma livre e imobilizada em pó de sabugo de milho foram determinadas por incubação em banho termostático sem agitação durante 0h, 1h, 3h, 6h, 9h e 24h na temperatura da reação de acidólise (45 °C). Após cada período de incubação, quantificou-se a atividade hidrolítica residual de acordo com o item 4.2.1. A atividade relativa (%) foi calculada de acordo com a Eq. 3:

$$AR(\%) = \frac{U_n \cdot 100}{U_0} \quad (3)$$

Na qual, AR é a atividade relativa no tempo t (U.g⁻¹); Un. é a atividade obtida no tempo t (U.g⁻¹) e U₀ é a atividade obtida no tempo zero (U.g⁻¹).

4.2.4 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DESATIVAÇÃO (K_d) E DO TEMPO DE MEIA VIDA ($T_{1/2}$)

A determinação da constante de desativação (k_d) e do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da lipase de *Rhizopus oryzae* nas formas livre e imobilizada em pó de sabugo de milho, foram efetuadas empregando-se as Eqs. 4 e 5:

$$\ln \frac{A}{A_0} = K_d * t \quad (4)$$

Na qual: A_0 a atividade enzimática inicial ($U.g^{-1}$); A a atividade residual após o período de incubação ($U.g^{-1}$).

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_d} \quad (5)$$

Na qual: K_d = constante de desativação (h^{-1}) e $t_{1/2}$ = tempo de meia vida (h).

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO REATOR DE LEITO FIXO

Fez-se necessária a construção de uma calibração para a mistura (óleo e corante) lipossolúvel de Corante rosa MIX®. Foram preparadas soluções com concentrações distintas, e as leituras de suas respectivas absorbâncias foram realizadas em triplicata com auxílio de espectrofotômetro, no comprimento de 545 nm. As concentrações, em mg/mL, bem como seus respectivos valores médios de absorbância estão relacionadas na Tabela 5 (Apêndice A). Com o auxílio do programa Origin Pro 8®, construiu-se um gráfico (Figura 34, Apêndice A) da concentração de traçador em função do tempo, obtendo-se a curva de calibração do corante partir de regressão linear (Eq. 6).

$$y = 1,0099x \quad (6)$$

na qual x representa a absorbância (A) e y a concentração do traçador ($mg.mL^{-1}$).

4.3.1 TESTE DE TRAÇADOR

A determinação do tempo de residência do reator foi realizada a partir da determinação da dispersão axial, conforme descrita por Zanin (2004). O desvio do comportamento ideal do escoamento do fluido no reator foi determinado através da curva de distribuição de

concentração no fluxo de saída, usando-se teste de traçador tipo pulso. O traçador utilizado foi uma solução de corante lipossolúvel (corante rosa, grau alimentício da marca MIX®, São Bernardo do Campo, Brasil) em óleo de semente de algodão, o qual possui a mesma densidade do óleo de semente de uva, não causando assim prejuízos para a caracterização hidrodinâmica do reator.

O teste foi realizado em reator de acrílico encamisado de 20,5 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro. Com auxílio de um banho termostático conduziu-se o teste à temperatura de 45°C, mesma utilizada nas reações de acidólise enzimática.

O reator foi empacotado com 15 gramas de pó de sabugo de milho, previamente submetido aos tratamentos térmico e básico. O óleo foi alimentado em fluxo ascendente a vazão de 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica. Operou-se o reator até que as condições de temperatura, vazão e altura do leito fossem estabilizadas. Em seguida, aplicou-se o pulso de traçador na linha da corrente de alimentação do reator, com auxílio de uma seringa contendo 5 mL de solução concentrada de corante.

Após 30 minutos, coletaram-se alíquotas de óleo na saída do reator. Inicialmente as alíquotas foram coletadas a cada 5 minutos até completar 50 minutos de execução do ensaio e depois a cada 3 minutos até completar 180 minutos de teste. Em seguida a leitura da absorbância das amostras foram efetuadas em espectrofotômetro, a 545 nm. As absorbâncias obtidas foram convertidas em concentração de traçador com o auxílio da Eq. 6.

A fim de determinar o volume útil do reator, utilizou-se a Eq. 7:

$$V_{\text{útil}} = V_{\text{reator}} - V_{\text{enz}} \quad (7)$$

Na qual, V_{reator} é o volume total de reator e V_{enz} é o volume ocupado pela enzima.

O tempo espacial, τ , foi calculado com auxílio da Eq. 8:

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (8)$$

Sendo, $V_{\text{útil}}$ o volume útil de reator, Q a vazão da bomba ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) e τ o tempo espacial (min^{-1}).

A distribuição dos tempos de escoamento das partículas de fluido na saída do sistema, $E(t)$, foi calculada com o auxílio da Eq. 9 (FOGLER, 2002):

$$E(t) = \frac{C(t)}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (9)$$

Sendo $C(t)$ a concentração de saída do traçador no tempo t e a integral $\int_0^{\infty} C(t)dt$ corresponde numericamente à área abaixo da curva do gráfico $C(t) \times t$.

O tempo médio de residência (t_m) pode ser obtido com o auxílio da Eq. 10, a qual representa numericamente a área abaixo da curva do gráfico $tE(t) \times t$. (LEVENSPEAL, 1999):

$$t_m = \int_0^{\infty} tE(t)dt \quad (10)$$

Dessa forma, as equações 8 e 10 permitem comparar o valor teórico de tempo espacial com o valor obtido experimentalmente (tempo médio de residência) e assim caracterizar o reator quanto a sua hidrodinâmica.

4.4 REAÇÕES DE ACIDÓLISE E ANÁLISE DOS PRODUTOS OBTIDOS

4.4.1 REATOR DE TANQUE AGITADO OPERANDO EM BATELADA

O reator tanque agitado utilizado nas reações possuiu dimensões de 6 cm de altura e 3 cm de diâmetro. O meio reacional foi composto de óleo de semente de uva e ácido cáprico (C_{10}) na razão molar de 1:3. O derivado imobilizado foi adicionado na reação na proporção de 10% (m/m) em relação à massa do meio composto por óleo e ácido cáprico. A reação foi conduzida por 24 horas, a 45°C e agitação de 800 rpm.

4.4.2 REATOR DE LEITO FIXO COM RECICLO TOTAL

O reator de leito fixo encamisado utilizado para a reação de acidólise possuiu 20,5 cm de altura e 2,2 cm de diâmetro. O meio reacional foi composto por óleo de semente de uva, ácido cáprico (C_{10}) e o derivado imobilizado na proporção de 10% em relação à massa do meio. A vazão de alimentação foi de 1 mL/min, mesma condição do teste de traçador realizado e a reação foi mantida por 120 horas. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e

4.4.3 NEUTRALIZAÇÃO DO MEIO REACIONAL APÓS REAÇÃO

Após o término da reação, pesaram-se 1,5 g de meio e estes foram diluídos em 30 mL de n-hexano. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução de 0,8 mol/L de KOH hidroalcoólico (30% etanol). Agitou-se vigorosamente a mistura havendo a separação de fases: uma hidroalcoólica contendo os ácidos graxos livres e outra de hexano contendo os triglicerídeos (TAG). Recolheu-se a fase orgânica contendo os TAG, e realizou-se novamente

o processo de extração com o acréscimo de 10 mL de hexano. As fases recuperadas contendo hexano foram submetidas a rotaevaporador a 40°C pelo tempo necessário para que o solvente fosse evaporado (WANG *et al.*, 2012).

4.4.4 METILAÇÃO DOS TAG APÓS SEPARAÇÃO

A metilação foi realizada de acordo com a ISO 12966-2 (2011) com adaptações. Pesaram-se aproximadamente 50 mg do TAG previamente submetidos ao processo de neutralização do item 4.4.3 em um vial de 20 mL. Adicionaram-se 2 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0,2 M) e aqueceu-se a mistura em banho de glicerina (80°C, 15 minutos) sob agitação. Aguardou-se o resfriamento da amostra e, então, adicionaram-se 2 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1M). A amostra foi novamente submetida a esquecimento em banho de glicerina (80°C, 15 minutos), sob agitação, e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Por fim, adicionaram-se 1 mL de solução metanólica saturada de cloreto de sódio e 2 mL de hexano. A mistura foi agitada e em seguida mantida em repouso para separação de fases. Transferiu-se a fase superior (orgânica), para outro vial de 20 mL e repetiu-se a extração com hexano até que toda amostra fosse recuperada. O hexano foi evaporado com nitrogênio gasoso e o éster metílico obtido foi submetido à análise em cromatografia gasosa.

4.4.5 COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

A composição em ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa, segundo a ISO 12966 (2014) com adaptações, substituindo-se o gás hélio pelo gás nitrogênio. Para estabelecimento do método de determinação de perfil de ácidos graxos (C₄ à C₂₄) e alguns ésteres de ácidos graxos, injetaram-se os padrões separadamente dos ácidos graxos presentes no óleo de semente de uva, bem como o mix de padrões de ésteres de ácidos graxos (mix de FAMES, Supelco®). Os testes foram realizados em um cromatógrafo a gás (Shimatzu®, modelo GC-2014) utilizando injetor Split, detector de ionização por chama (DIC) e coluna SH-Stabilwax-DA (L x I.D. 30 m x 0,25 µm, df 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C, sendo o modo de injeção Split (1:10) e o nitrogênio utilizado como gás de arraste, na vazão de 0,55 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, atingindo 210°C (taxa de aquecimento de 20°C/min), permanecendo em 210°C por 7 minutos. Após, a temperatura foi elevada a 250 °C (20°C/min), sendo mantida por 14 minutos, resultando em 21 minutos de tempo total de análise. Em seguida, as áreas dos picos obtidos foram relacionadas determinando-se o grau de incorporação (GI).

4.4.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE INCORPORAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

O grau de incorporação (GI) foi calculado com o auxílio da Eq. 11 proposta por (Casas-Godoy *et al.*, 2013) com modificações:

$$X = \left(\frac{MFA}{MT} \right) * 100 \quad (11)$$

Na qual MFA é o número de mols de ácidos graxos de cadeia média (C_{10:0}) no triglicerídeo e MT é o número de mols totais de ácidos graxos no triglicerídeo.

Sabe-se que a lipase utilizada é 1,3 específica, ou seja, somente 2 das 3 cadeias de ácidos graxos podem ser substituídas, resultando em um grau de incorporação máximo de 66%. Dessa forma, os valores de GI (%) obtidos neste trabalho foram normalizados, de acordo com a Eq. 12:

$$GI (\%) = \frac{X \cdot 100}{66} \quad (12)$$

4.4.7 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE PERÓXIDO (IP) E ACIDEZ

O óleo puro de semente de uva utilizado nas reações de acidólise, bem como os produtos obtidos nas reações foram caracterizados quanto aos índices de acidez (método Ca 5a-40) e peróxido (método Cd 8b-90) de acordo com os métodos oficiais da American Oil Chemist's Society (AOCS, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROPRIEDADES DAS MATÉRIAS PRIMAS

5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA

O óleo de semente de uva utilizado para as reações de acidólise, foi previamente caracterizado quanto aos índices de peróxido e acidez, conforme descrito no item 4.4.7 Os ensaios foram realizados em triplicata, e as médias obtidas, bem como os respectivos desvios padrões estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Índices de peróxido e acidez do óleo de semente de uva puro utilizado nas reações de acidólise com ácido cáprico e lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.

Índice de peróxido (mEq/kg de óleo)	Acidez (mg KOH/g)
1,98 ± 0,20	0,22 ± 0,02

Fonte: o autor.

De acordo com a resolução-rdc nº 270, de 22 de setembro de 2005 da Anvisa, os valores máximos de índice de peróxido e acidez de óleos prensados a frio e não refinados, como o óleo de semente de uva, são 10 mEq/kg de óleo e 0,6 mg KOH/g de óleo, respectivamente. Desta forma, segundo os dados da Tabela 6, as matérias primas utilizadas neste trabalho estão em conformidade com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

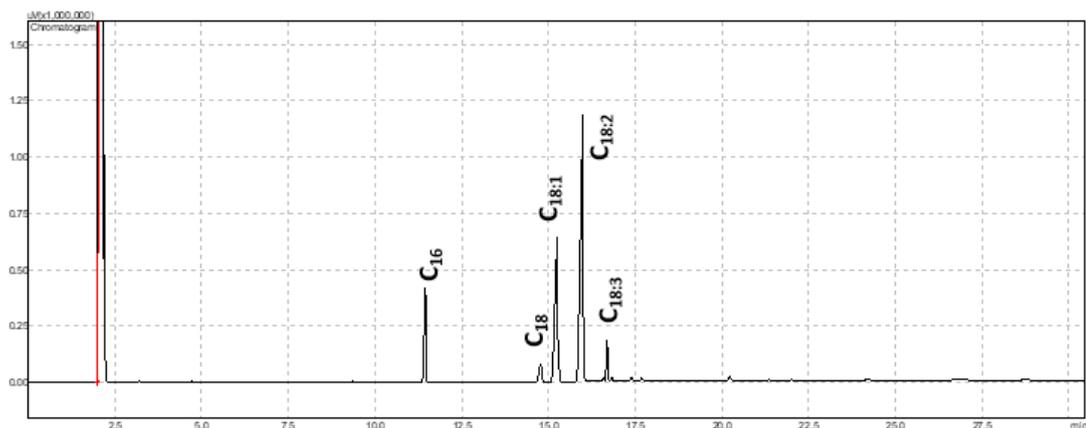
O óleo de semente de uva também foi caracterizado quanto ao seu perfil composicional em ácidos graxos utilizando cromatografia gasosa (Figura 8). As concentrações médias, bem como seus respectivos desvios padrões estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Perfil composicional (%) determinado por cromatografia gasosa do óleo de semente de uva puro utilizado para as reações de acidólise enzimática com ácido cáprico e lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.

Número de carbonos no Ácido Graxo (AG)	AG (%)
C16	11,23 ± 0,01
C18	3,76 ± 0,01
C18:1	28,70 ± 0,01
C18:2	51,27 ± 0,03
C18:3	4,11 ± 0,01
C20	0,40 ± 0,01
C22	0,54 ± 0,02
Soma	100,000

Fonte: o autor

Figura 8- Cromatograma obtido por cromatografia gasosa do óleo de semente uva puro utilizado para reações de acidólise enzimática com ácido cáprico e lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.



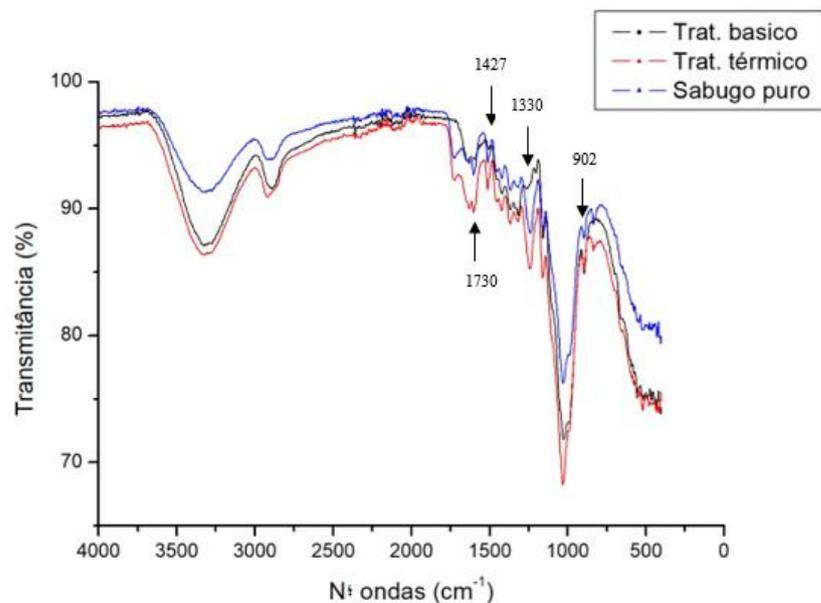
Fonte: o autor.

Analisando-se a Figura 9 e a Tabela 7, verifica-se que o óleo de semente de uva apresenta elevadas concentrações de ácidos graxos essenciais, aqueles não metabolizados pelo organismo humano, como o ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Este fato evidencia que o óleo de semente de uva é uma promissora matéria prima para utilização na produção de lipídios estruturados. Além disso, este óleo é proveniente do resíduo da indústria vinícola, sendo assim sua utilização para esta finalidade é uma oportunidade de agregar valor a este óleo (Abed et al., 2018; Demir e Demir, 2018).

5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE SABUGO DE MILHO

Conforme descrito no item 4.2, realizaram-se ensaios de Espectroscopia FTIR do suporte de imobilização in natura, de cada etapa ativação e tratamentos, bem como do derivado imobilizado. Os resultados destas análises estão representados entre as Figuras 9 e 12 a seguir.

Figura 9 - FTIR do pó de sabugo de milho puro, pós tratamento térmico e pós tratamento básico.

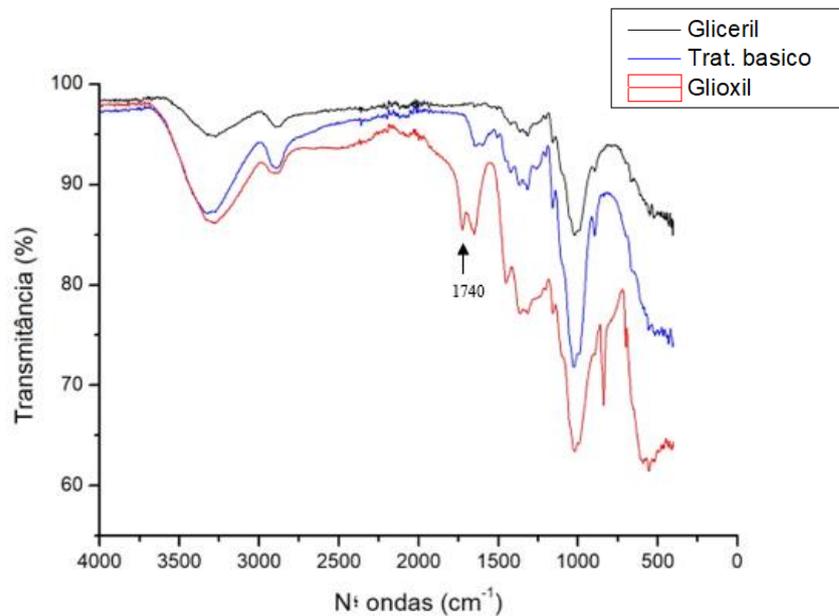


Fonte: o autor.

Analisando-se a Figura 9, é possível verificar as alterações realizadas no suporte após os tratamentos térmico com auxílio de autoclave e básico com auxílio de NaOH. Verifica-se que o pico em 1730 cm^{-1} , característico das ligações C=O da hemicelulose desapareceu após a realização do tratamento básico. Dessa forma, o aumento da transmitância desta amostra indica que estes grupos foram removidos e a hemicelulose foi solubilizada, um dos objetivos do pré-tratamento do material suporte. Além disso, o aumento da transmitância do pico 902 cm^{-1} indica a remoção parcial de celulose amorfa, uma vez que este comprimento de onda é característico de ligações β -glicosídicas C-O-C. Pode-se verificar também que o pico em 1427 cm^{-1} , correspondente a deformação planar C-H da lignina, apresentou redução, indicando assim a remoção deste composto. Nesse sentido, verifica-se também a redução do pico em 1330 cm^{-1} , correspondente aos grupos fenóis existentes na lignina, corroborando assim a remoção deste composto. (BASSAN et al., 2016).

Após análise dos pré-tratamentos, analisou-se também cada etapa de ativação, como exposto na Figura 10.

Figura 10 - FTIR do pó de sabugo de milho pós tratamento básico, bem como ativado com gliceril e glioxil.

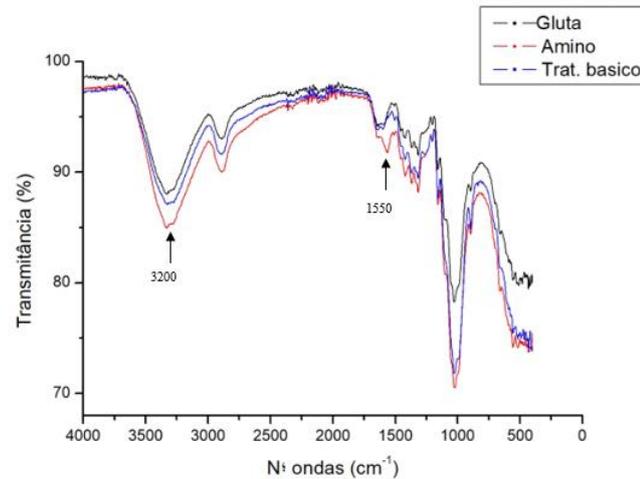


Fonte: o autor.

Observando agora a Figura 10, verifica-se o surgimento do pico na região de 1740 cm^{-1} para o suporte glioxil. Esta região é correspondente a ligação $\text{C}=\text{O}$ de aldeídos indicando a presença deste grupo funcional no suporte. Este resultado era esperado uma vez que o glioxil formado nesta etapa é um aldeído, comprovando assim que esta etapa de ativação foi satisfatória (PAVIA et al., 2010).

A Figura 11 representa as últimas etapas do processo de ativação do suporte, a ativação com grupamentos amina, bem como a funcionalização com glutaraldeído.

Figura 11 - FTIR do pó de sabugo de milho pós tratamento básico, bem como funcionalizado com grupamento amino e com glutaraldeído.



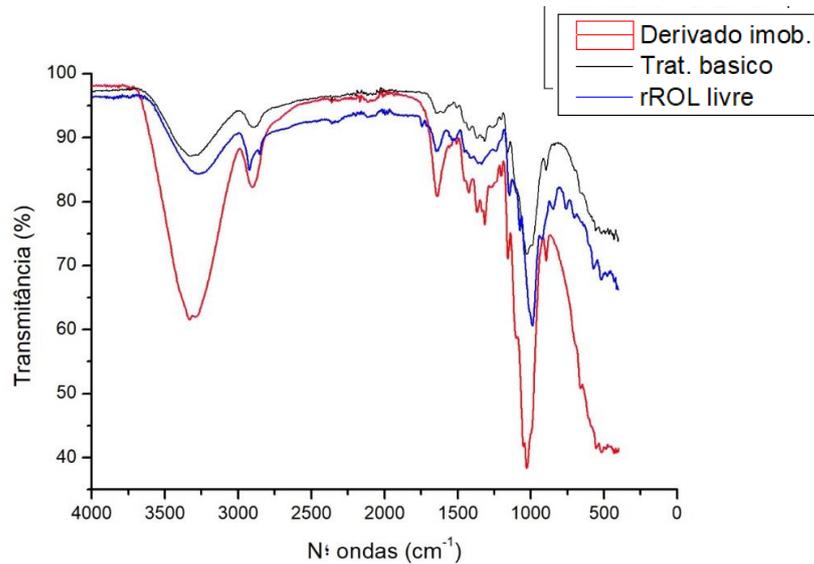
Fonte: o autor.

Ao observar o suporte ativado com grupamentos aminos, nota-se a presença do pico na região entre 1640 e 1550 cm^{-1} , característicos destes compostos, indicando que a inserção satisfatória deste grupamento ao suporte. Além disso, pode-se notar também o aumento, mais discreto, característico deste grupamento, na região de 3200 cm^{-1} . (PAVIA et al., 2010).

Já na amostra do suporte ativado com glutaraldeído, nota-se que o pico referente aos grupamentos amino citados anteriormente, nas regiões entre 1640 a 1550 cm^{-1} não são mais observados. Acredita-se que, como era esperado, que o glutaraldeído, agente de funcionalização utilizado, se ligou aos grupamentos aminos previamente inseridos (PAVIA et al., 2010).

Por fim, pode-se observar a Figura 12 a seguir o espectro de FTIR, a qual representa o pó de sabugo de milho já imobilizado, bem como a enzima de *Rhizopus oryzae* na sua forma livre.

Figura 12 - FTIR do pó de sabugo de milho tratamento básico, derivado imobilizado e lipase de *Rhizopus oryzae* livre.



Fonte: o autor.

Por fim, ao analisar-se a Figura 12, nota-se a amostra de tratamento básico, anterior ao processo de imobilização, bem como da enzima livre, apresentam espectros semelhantes. Isto pode justificar e indicar que o processo de imobilização aconteceu devido aos menores valores de transmitância do derivado imobilizado, bem como pode estar relacionado a sobreposição dos picos de forma a se anularem. Como exemplo pode-se citar a região de 1000 cm^{-1} , característica de grupamentos amins, a qual é observada tanto no suporte quanto na enzima livre. Dessa forma, acredita-se que a sobreposição de ambos os picos resultou em transmitância mais baixa no derivado imobilizado. Além disso, o pico em 3200 cm^{-1} característico também de grupos amins é observado no derivado imobilizado e não no suporte puro, podendo ser oriundo da própria lipase (PAVIA et al., 2010).

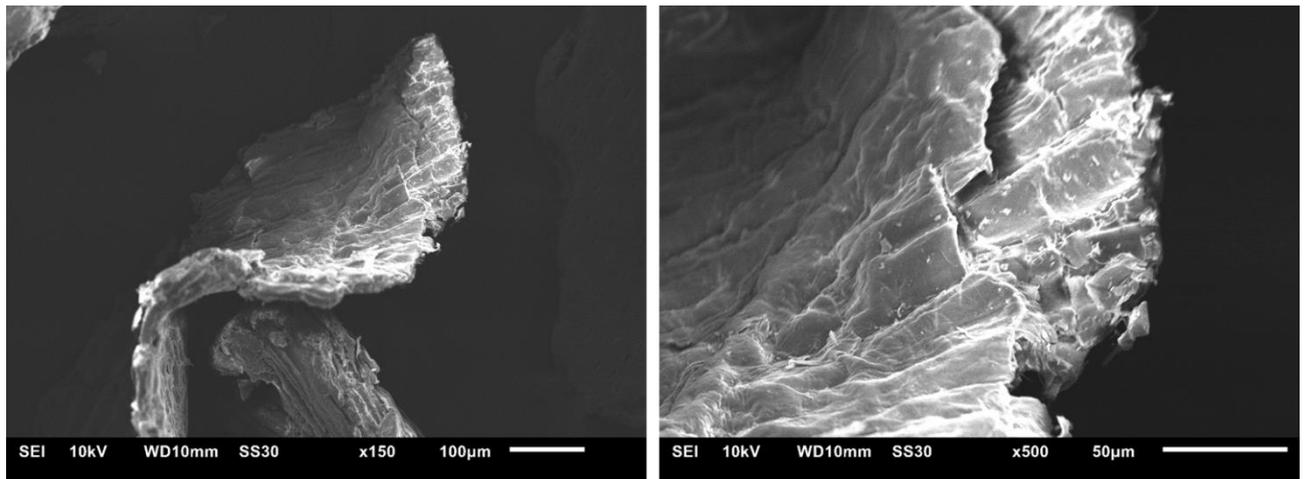
Analisando-se todos os espectros de FTIR, verifica-se que cada uma das etapas alcançou resultados satisfatórios e todos os grupamentos necessários para ativação e funcionalização do pó de sabugo de milho foram inseridos. Este fato é comprovado também com a dosagem da atividade hidrolítica do derivado imobilizado, apresentada no item 5.5.

Conforme descrito no item 4.2, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, do pó de sabugo de milho, das etapas de tratamento e ativação, assim como do derivado imobilizado. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 13 a 20 a seguir.

Analisando-se o pó de sabugo de milho puro (Figura 13) e amostra após a descompressão térmica (Figura 14) verificam-se nitidamente os efeitos causados pela alta

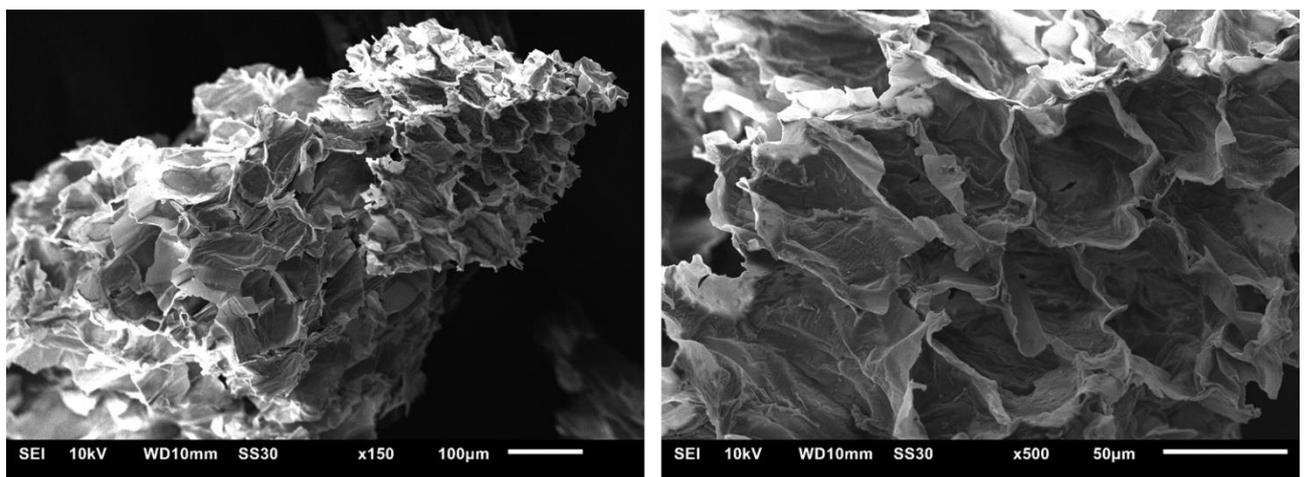
pressão e vapor aos quais a amostra foi submetida. Nota-se na Figura 14 o rompimento das ligações estruturais do material, evidenciando que o pré tratamento foi satisfatório e aumentou a superfície de contato entre o pó de sabugo de milho e os demais reagentes utilizados nos processos seguintes de tratamento e ativação (De SÁ; BIANCHI, 2015).

Figura 13 - MEV do pó de sabugo de milho in natura, antes dos tratamentos físico-químicos. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



Fonte: o autor.

Figura 14 - MEV do pó de sabugo pós tratamento térmico. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.

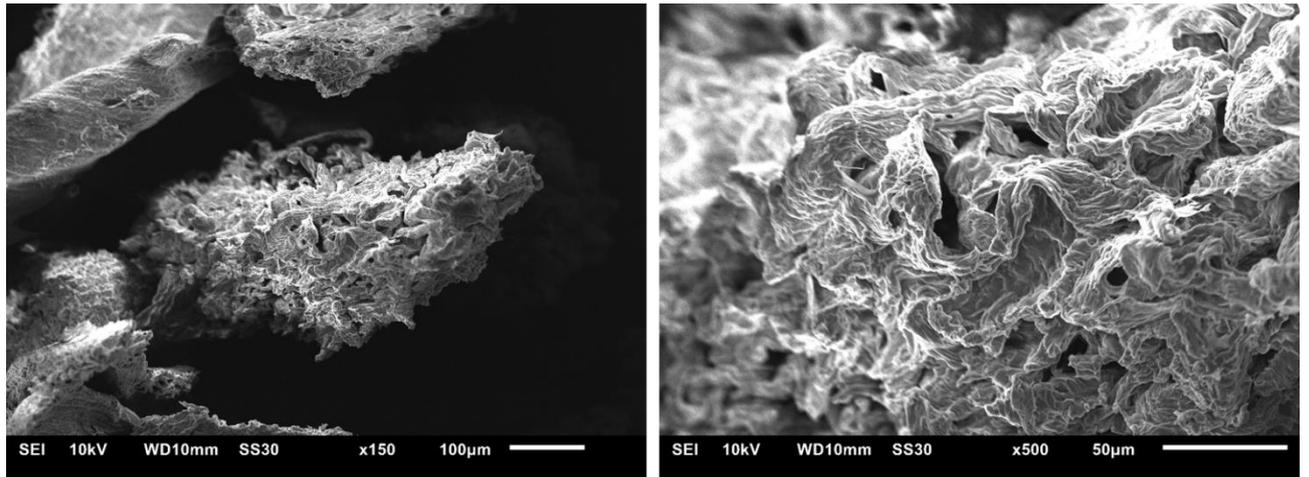


Fonte: o autor.

A Figura 15 ilustra o pó de sabugo de milho pós tratamento básico, etapa na qual visam-se a remoção da lignina e aumento da área superficial da celulose. Nota-se que nesta etapa o material adquiriu uma nova morfologia, a qual pode estar relacionada a remoção da lignina bem como da hemicelulose, fatos estes sugeridos na análise de FTIR (item 5.1). Esta nova estrutura

do material pode estar relacionada a presença apenas da celulose, composto com estrutura linear mais organizada (de SÁ; BIANCHI, 2015). Terminada esta etapa, após o processo de lavagem e filtragem, verifica-se redução significativa da massa de suporte, fato este que também evidencia a extração dos compostos lignocelulósicos.

Figura 15 - MEV do pó de sabugo pós tratamento básico. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.

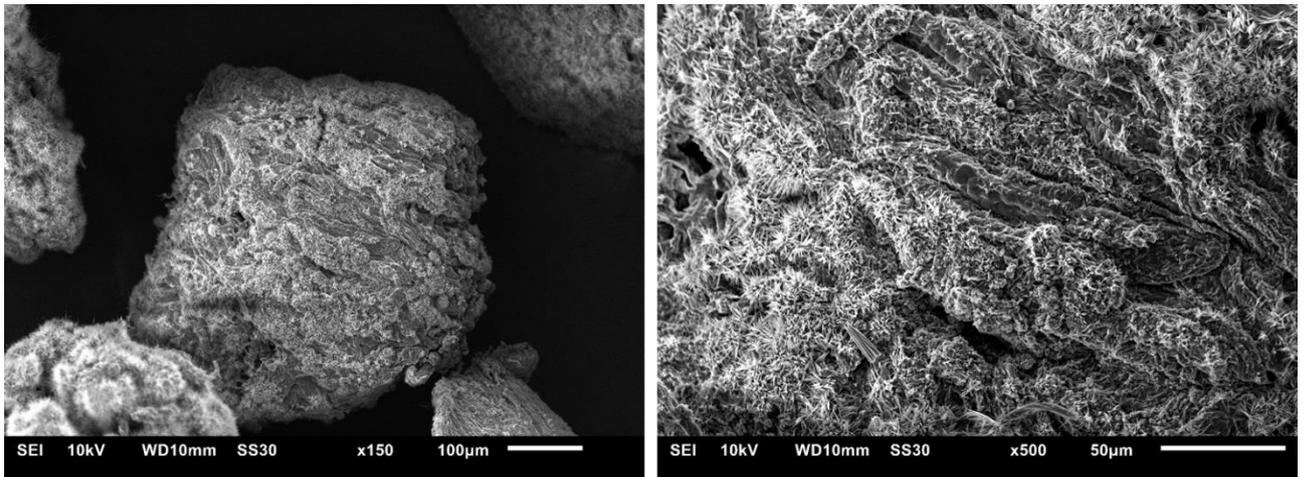


Fonte: o autor.

Por outro lado, nota-se que o material não é homogêneo, ou seja, algumas regiões do suporte apresentam superfície irregular, indicando que o tratamento básico realizado causou danos a estrutura da celulose. Este fato foi relatado por Assumpção e seus colaboradores (2016), os quais realizaram pré-tratamento químico em bagaço de cana de açúcar com hidróxido de sódio, reduzindo assim a cristalinidade da celulose, a fim de aumentar o contato entre o suporte e os demais reagentes utilizados. Dessa forma, verifica-se que os pré tratamentos, térmico e básico, realizados foram satisfatórios e indispensáveis para o sucesso das etapas seguintes.

Analisando-se a Figura 16, nota-se a presença de cristais na superfície do pó de sabugo de milho ativado com grupamento gliceril. Estes cristais podem ser oriundos de resíduos de borohidreto de sódio utilizado no processo de ativação, apesar do suporte ter sido lavado em abundância entre cada uma das etapas. Esta hipótese é justificada com base na análise química apresentada ainda neste item, a qual evidencia aumento nas concentrações de sódio desta etapa de ativação.

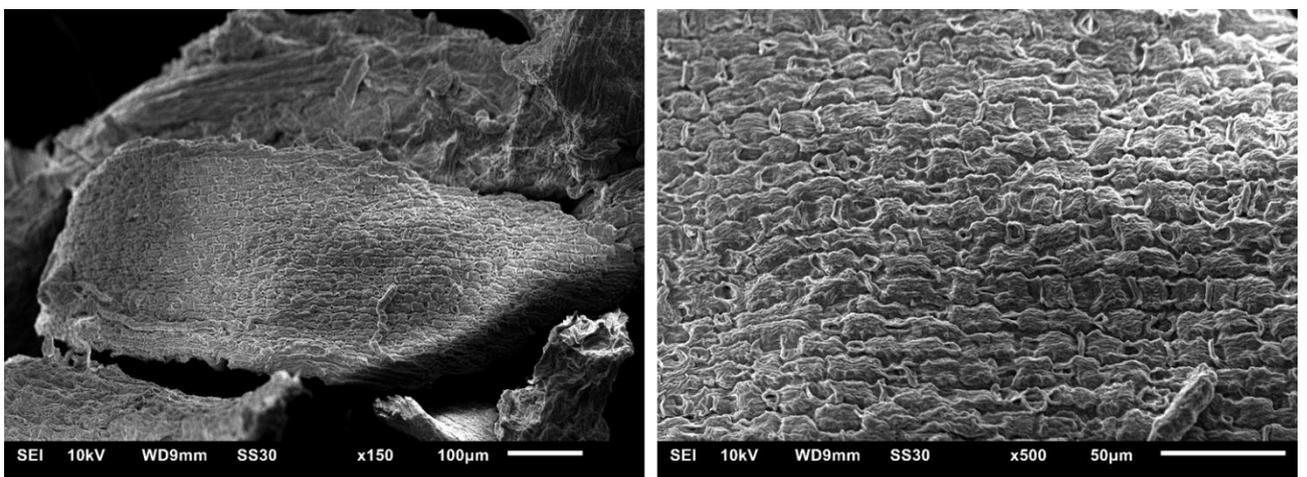
Figura 16 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento gliceril. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



Fonte: o autor.

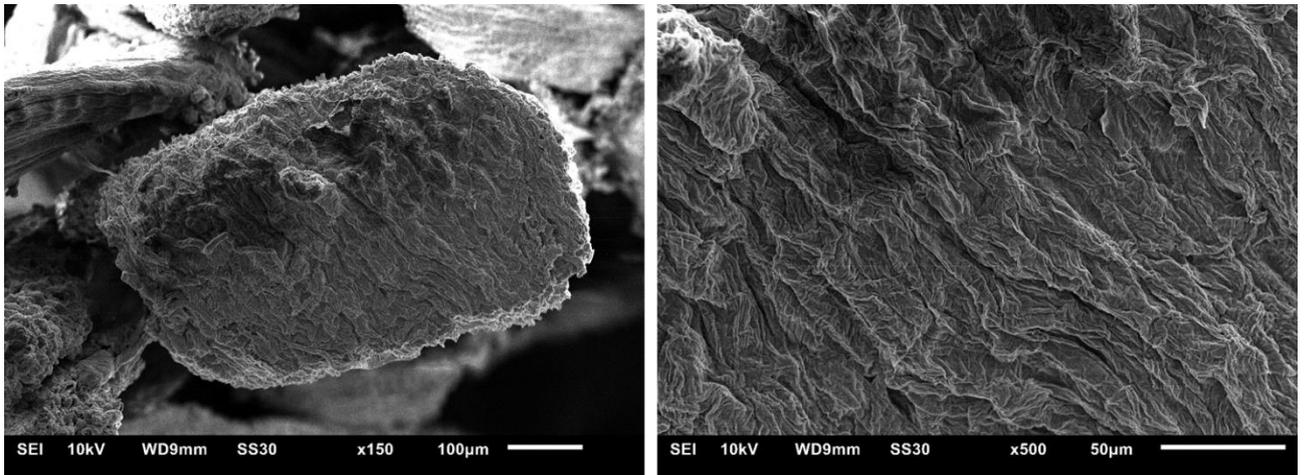
As Figuras 17, 18 e 19 a seguir representam respectivamente as etapas de ativação com glioxil, amino e funcionalização com glutaraldeído. Analisando-se estas imagens, verifica-se que o pó de sabugo de milho é heterogêneo. A Figura 17 evidencia de forma nítida este fato, na qual verifica-se grande diferença morfológica dependendo da área do suporte analisada. Observa-se também a influência dos reagentes utilizados em cada uma das etapas de ativação na estrutura do material, indicando assim a eficiência do tratamento.

Figura 17 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento glioxil. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



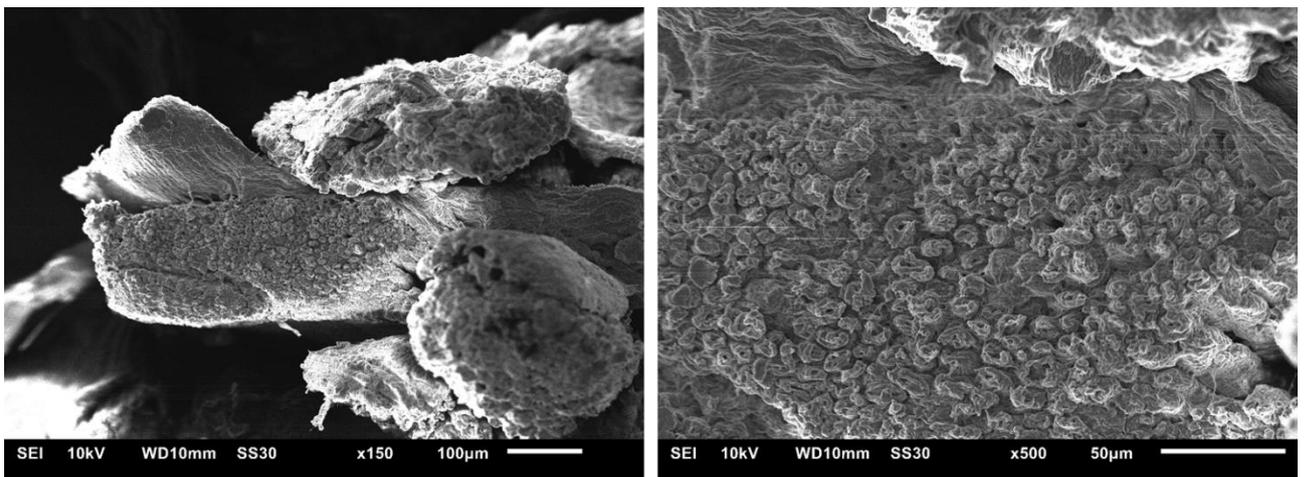
Fonte: o autor.

Figura 18 - MEV do pó de sabugo ativado com grupamento amino. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



Fonte: o autor.

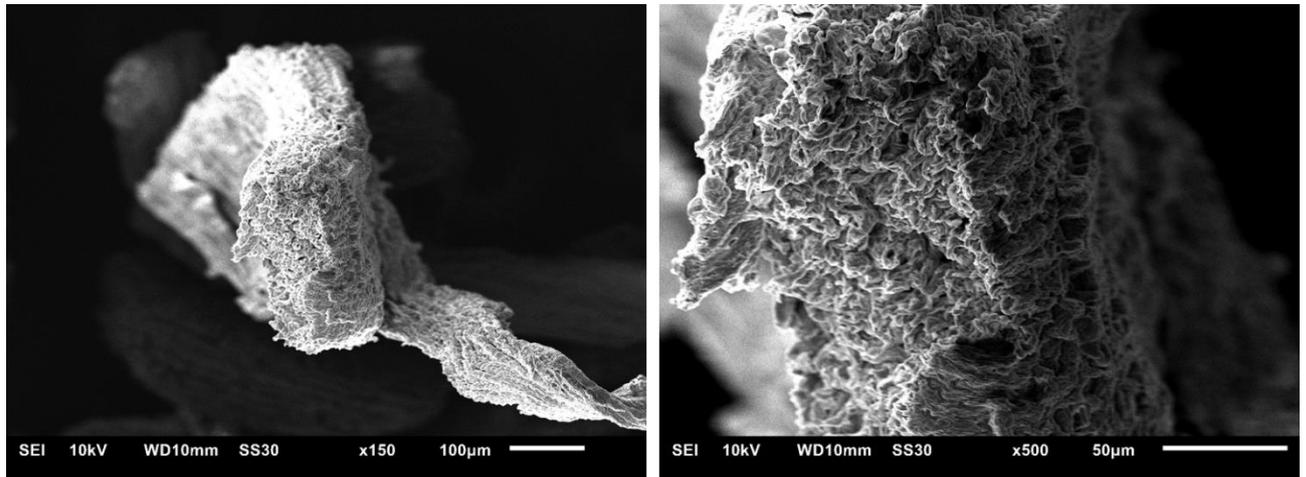
Figura 19 - MEV do pó de sabugo funcionalizado com glutaraldeído. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



Fonte: o autor.

Por fim, a Figura 20 exibe a análise de MEV da lipase de *Rhizopus oryzae* já immobilizada no pó de sabugo de milho. Verifica-se a possibilidade da existência de poros na estrutura do material, porém para corroborar esta hipótese, análises específicas são requeridas (RODRIGUES *et al.*, 2019; SHELDON, PELT, VAN, 2013).

Figura 20 - MEV do derivado imobilizado. À esquerda aumento de 150x e à direita aumento de 500x.



Fonte: o autor.

As amostras analisadas por MEV também foram submetidas a análise química por EDS. Trata-se de uma análise semi-quantitativa que visa apresentar indícios para possível composição elementar do material analisado. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise química do pó de sabugo de milho *in natura*, de cada etapa do processo de ativação, bem como do derivado imobilizado, realizadas por EDS.

% (m/m) dos elementos químicos presentes, determinados por EDS								
	Sabugo <i>in natura</i>	Tratamento Térmico	Tratamento Básico	Gliceril	Glioxil	Amino	Gluta	Derivado Imobilizado
<i>Be</i>	51,36	56,69	58,29	54,40	40,04	52,83	51,62	59,53
<i>C</i>	15,85	13,27	17,61	0,00	12,74	11,66	12,57	19,82
<i>N</i>	4,58	3,58	0,00	0,00	-	3,62	-	0,00
<i>O</i>	21,38	14,56	16,71	27,07	26,43	17,38	23,57	13,00
<i>Mg</i>	-	0,07	-	-	-	-	-	-
<i>Al</i>	-	0,25	0,15	0,25	-	0,25	-	-
<i>K</i>	-	0,41	-	-	-	-	0,26	-
<i>Na</i>	-	-	0,31	10,97	0,36	0,15	0,33	0,07

Fonte: o autor.

Analisando-se a Tabela 8, verifica-se que o elemento químico Berílio foi identificado em todas as amostras, inclusive do sabugo *in natura*. Entretanto, Dedavid, Gomes e Machado (2007) apresentam que a análise de EDS consegue identificar elementos com número atômico (*Z*) maior que 4. O Berílio tem *Z*=4 e, portanto, sua identificação nas amostras pode ser um erro de análise. Por outro lado, Kolanz (2001) apresentou em seu artigo de revisão que o Berílio é

um elemento químico onipresente na natureza e, conseqüentemente, nos alimentos. O autor mostra que já foi encontrado Berílio em arroz (80g/kg), alface (330g/kg) e batatas (0,3 g/kg). O autor afirma ainda que pessoas não expostas ocupacionalmente a tal elemento podem estar em contato com cerca de 0,53 g por dia do elemento. Dessa forma, é possível que o Berílio esteja de fato presente no pó de sabugo de milho ou mesmo em materiais metálicos aos quais as amostras foram expostas, como espátulas, equipamentos.

Observa-se também que a presença de Carbono se manteve em faixas próximas de porcentagem, com exceção a amostra de gliceril, a qual não registrou traços deste elemento. Este fato não define com certeza a ausência de Carbono na amostra, uma vez que talvez apenas a região analisada não contenha o elemento em questão, tendo em vista a elevada heterogeneidade do material estudado.

Nota-se também a presença de Nitrogênio no sabugo *in natura* e sua não mais observação a partir do tratamento básico, fato este possivelmente relacionado a remoção dos compostos lignocelulósicos. Este elemento é novamente identificado na amostra do suporte amino, fato este esperado devido a composição deste grupamento e sinaliza que a ativação foi satisfatória. Esperava-se encontrar o Nitrogênio também na amostra contendo a lipase, porém sabe-se que há regiões do suporte nas quais não há enzima, podendo esta ser uma justificativa a esta ausência.

Para o Oxigênio, observa-se um aumento no suporte gliceril, demonstrando que o glicidol utilizado na ativação foi incorporado à estrutura do material. Nas etapas seguintes, observa-se a diminuição do oxigênio, sugerindo que os próximos reagentes utilizados foram incorporados, ligando-se a este elemento químico.

O Sódio também foi identificado nas etapas seguintes ao tratamento básico, possivelmente devido a resquícios de NaOH utilizado na etapa alcalina.

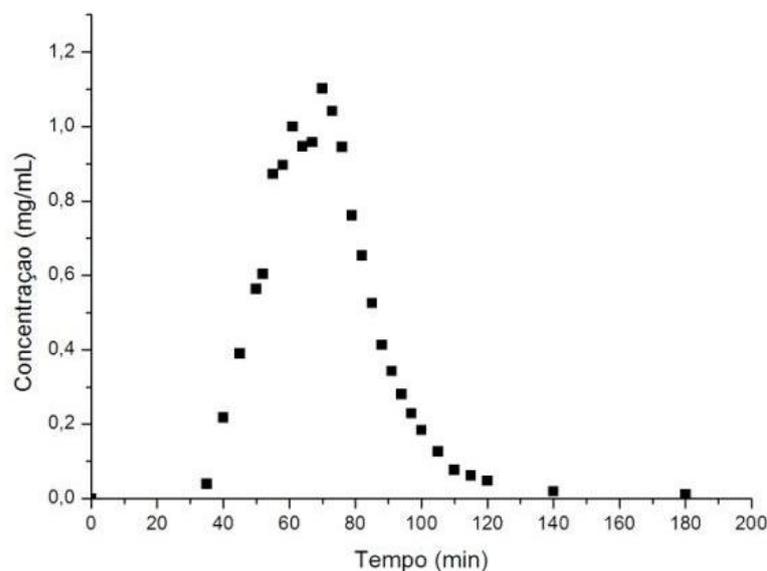
Ambas as análises, EDS e FTIR, elucidaram a quantidade significativa de etapas envolvidas no processo de imobilização, fato este que pode dificultar sua reprodutibilidade, além de ser uma fonte de possíveis erros durante o processo. Apesar disso, a metodologia utilizada apresentou resultado satisfatório e foi importante na consolidação de técnicas de imobilização enzimática em materiais lignocelulósicos, pouco encontrados na literatura. Com a motivação de obter processos cada vez mais eficientes, os próximos estudos do grupo de pesquisa analisam outras técnicas de imobilização, como por exemplo adsorção física.

5.2 DISTRIBUIÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA (DTR)

Segundo metodologia apresentada no item 4.3, realizou-se o teste de traçador tipo pulso no reator encamisado utilizado nas reações de acidólise, a fim de se comparar a distribuição do tempo médio de residência ao tempo espacial. Este teste é de suma importância para reatores empacotados, uma vez que reflete seu tipo de mistura e permite a descoberta de problemas de empacotamento, como pontos mortos e caminhos preferenciais, por exemplo (FOGLER, 2012).

Para a execução do teste, foram coletadas amostras no intervalo de tempo entre 0 e 180 minutos e obtidos os valores de absorvância para cada ponto. Com o auxílio da curva de calibração (Eq. 6) calcularam-se os valores de concentração, sendo tais dados representados de forma gráfica na Figura 21.

Figura 21 - Concentração traçador (mg/mL) em função do tempo (min) em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise de óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisado por lipase imobilizada em pó de sabugo de milho.



Fonte: o autor.

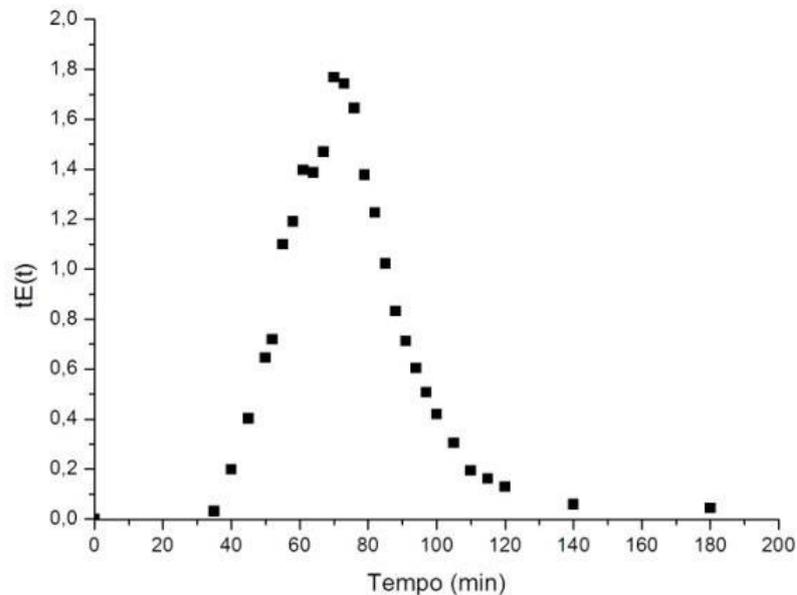
Utilizando-se a ferramenta do software Origin Pro 8®, calculou-se a área sob a curva da Figura 10, conforme representado na Eq. 13:

$$\int_0^{\infty} C(t)dt = 43,64 \quad (13)$$

Com o auxílio da Eq. 9 do item 4.3.1, calcularam-se os valores de $E(t)$, para cada amostra coletada. Tendo os valores de $E(t)$ calculados, multiplicou-se cada um deles por seu correspondente tempo de reação, a fim de plotar o gráfico de $t.E(t)$ em função do tempo (Figura 22). Conforme evidenciado na Eq. 10, do item 4.3.1, a área abaixo da curva deste gráfico é numericamente igual ao tempo médio de residência experimental. Dessa forma, novamente com o auxílio do software Origin Pro 8®, calculou-se esta integral, representada na Eq. 14:

$$t_m = \int_0^{\infty} tE(t)dt = 71,0 \text{ min} \quad (14)$$

Figura 22 - $t.E(t)$ em função do tempo para teste de traçador realizado em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise enzimática com óleo de semente de uva e ácido cáprico para a produção de lipídeos estruturados.



Fonte: o autor.

Conhecendo-se o volume útil do reator e a vazão utilizada durante o ensaio, fez-se possível calcular o tempo espacial. Esses dados, bem como o tempo espacial, calculado com o auxílio da Eq. 8 estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros de operação do teste de traçador em reator de leito fixo utilizado para reação de acidólise enzimática para produção de lipídeos estruturados e determinação do tempo espacial.

Volume do reator (mL)	61,2
Volume útil do reator (mL)	50,8
Vazão (mL/min)	1,0
τ (min)	50,8

Fonte: o autor.

Os valores teórico e experimental apresentam divergência de 32%. Segundo Fogler (2012), a existência de volumes mortos no reator, ou seja, regiões nas quais o óleo permanece estagnado, é comprovada quando o tempo médio de residência é maior que o tempo espacial, fato este observado neste ensaio. Durante a execução do teste de traçador, verificou-se que o corante não apresentava dificuldade para percorrer o leito, mas ficava concentrado na parte de cima do reator e demorava para sair, aumentando assim o tempo de residência. Dessa forma, acredita-se que a configuração do reator foi o fator mais agravante para esta discrepância, uma vez que o mesmo apresenta, em sua saída, considerável redução de diâmetro, aumentando assim a perda de carga no sistema. Além disso, outro fator que também por ter contribuído para esta diferença foi o corante alimentício utilizado, o qual pode ter causado certa resistência ao escoamento.

5.3 CARACTERÍSTICAS DA ENZIMA DE *RHIZOPUS ORYZAE* NA FORMA LIVRE

5.3.1 INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA LIVRE

Para avaliar a influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase de *Rhizopus oryzae* foram realizados 12 experimentos utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) (Tabela 10).

Tabela 10 - Matriz do planejamento experimental DCCR: variáveis independentes (pH e temperatura) e a variável resposta (atividade enzimática, U.g⁻¹) para cada ensaio.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Resposta
	pH	T(°C)	pH	T(°C)	Atividade (U/g)
1	-1	-1	6,0	35	22373
2	1	-1	9,0	35	9588
3	-1	1	6,0	45	24592
4	1	1	9,0	45	7583
5	-1,41	0	5,4	40	23241
6	1,41	0	9,6	40	4271
7	0	-1,41	7,5	33	24277
8	0	1,41	7,5	47	15138
9	0	0	7,5	40	28134
10	0	0	7,5	40	28266
11	0	0	7,5	40	26847
12	0	0	7,5	40	28421

Fonte: o autor.

Após o tratamento de dados no Protimiza Experimental Design® (2014) foi gerada a Tabela 15 (Apêndice B) que apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para a atividade obtida nos ensaios. Os dados tabelados foram utilizados na construção do modelo matemático descrito pela Eq. 15.

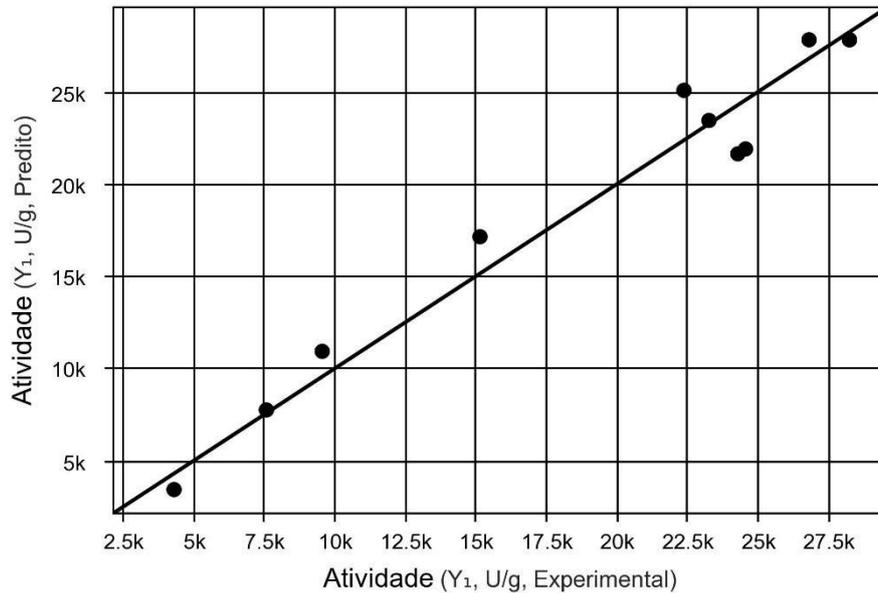
$$Y_1 = 27792,84 - 7077,55 x_1 - 7192,89 x_1^2 - 1588,76 x_2 - 4217,29 x_2^2 \quad (15)$$

Na qual: Y1 = Atividade (U.g⁻¹), x1 = pH e x2 = Temperatura (°C).

Em seguida, foi realizada a ANOVA com nível de significância $\alpha = 5\%$, exibida na Tabela 16 (Apêndice B).

Como $F_{\text{regressão/resíduos}} (37,7) > F_{\text{Tabelado}} (2,96)$ e $R^2 = 96,17\%$ o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, ou seja, os valores experimentais se ajustam aos valores preditos (Figura 23).

Figura 23 - Valores experimentais e valores previstos para o modelo de atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* na forma livre.

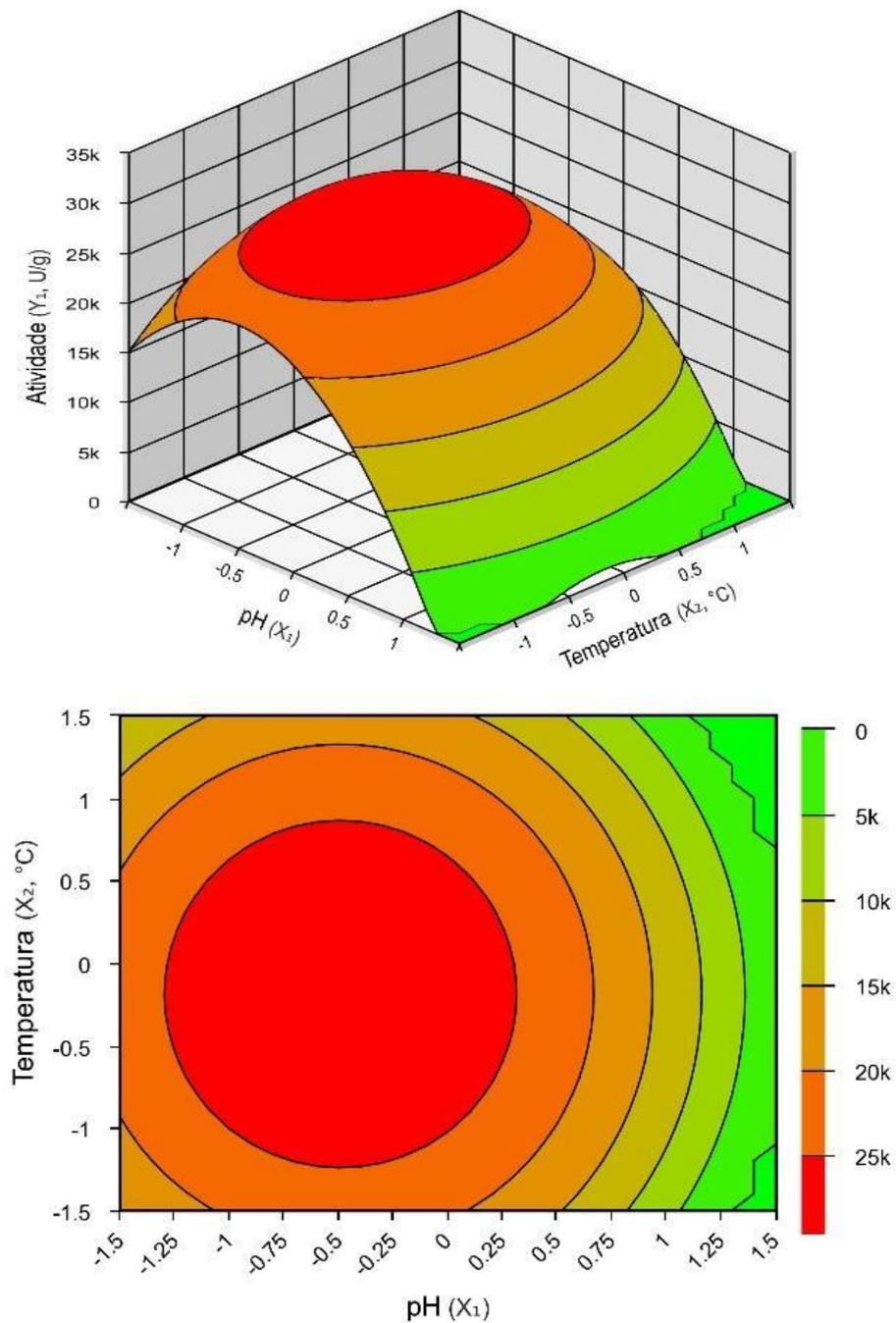


Fonte: o autor.

Assim, após a validação do modelo matemático para a variável de atividade enzimática, foram geradas as superfícies de respostas representadas pela Figura 24.

A Figura 24 indica que os valores de maior atividade para a lipase de *Rhizopus oryzae* em sua forma livre são obtidos próximos ao ponto central, no qual foi utilizada a temperatura de 40°C e o pH 7,5. O aumento, bem como a diminuição, do pH e da temperatura que se distanciam desse ponto, ocasionam queda significativa de atividade enzimática.

Figura 24 - Superfícies obtidas no planejamento experimental DCCR para a atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* como resposta da variação de pH e temperatura.



Fonte: o autor.

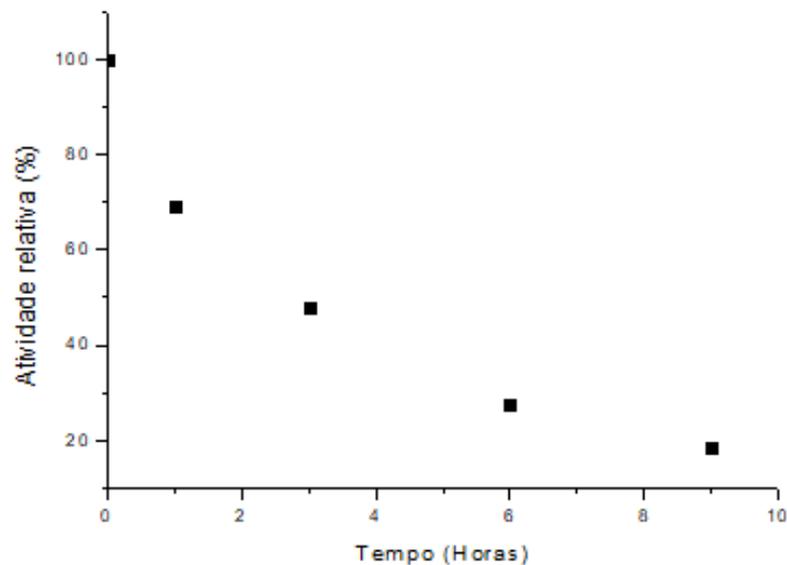
De acordo com as superfícies de resposta e as previsões representadas pelo modelo da equação 15, o ponto que apresenta a melhor resposta é o de temperatura igual a 39°C e pH 6,8 com um valor de atividade previsto em 29818,79 U/g.

Esse resultado se aproxima do observado no trabalho de HIOL e colaboradores (2000), que obtiveram valores de pH 7 e temperatura 40°C como ótimos para a lipase de *Rhizopus oryzae*, com queda de atividade nas temperaturas superiores e inferiores à 40°C e pHs acima e abaixo de 7,5. KHARRAT *et al* (2011) obtiveram um valor de temperatura ótima de 37°C em seus estudos e PASHANGEH e seus colaboradores (2017) valores ótimos de pH na faixa de 8 e temperatura de 40°C, para o mesmo biocatalisador. Todos os resultados encontrados na literatura descreveram decaimento de atividade para valores inferiores ou superiores aos ótimos.

5.3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

O estudo da estabilidade térmica com a enzima livre foi realizado na temperatura de 45°C, mesma utilizada na reação de acidólise e pH 7,0. Os resultados para o perfil de inativação térmica são apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Atividade residual da enzima de *Rhizopus oryzae* em função do tempo de incubação na temperatura de 45°C e pH = 7.



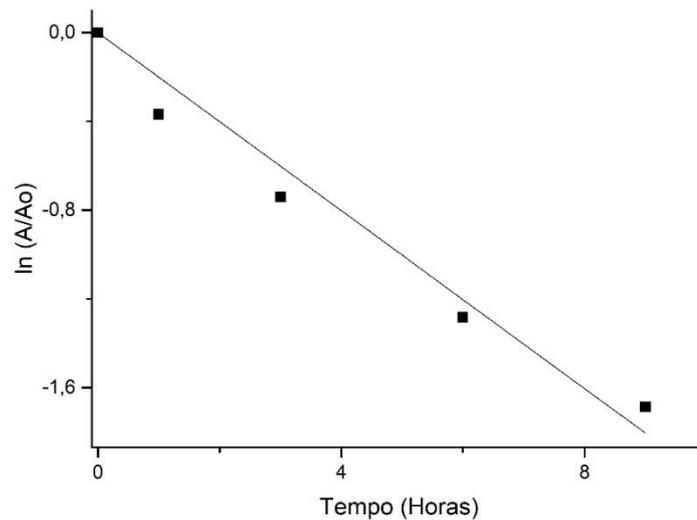
Fonte: o autor.

Analisando a Figura 15, tem-se que a enzima em sua forma livre perde atividade rapidamente quando incubada na temperatura de 45°C, reduzindo cerca de 80% de sua atividade inicial após um período de 9 h.

O efeito da temperatura influenciou diretamente na atividade da enzima durante o ensaio, uma vez que elevadas temperaturas alteram a conformação terciária das enzimas, ocasionando assim perda de suas atividades catalíticas. Tal fato ocorre devido à sensibilidade dos biocatalisadores livres às mudanças de temperatura, quando essas são abaixo da ótima a reação se torna lenta e quando são muito elevadas podem desnaturar a enzima, resultando em perda de funcionalidade (RAI, 2012).

Posteriormente, foi realizada a linearização dos dados experimentais da Figura 26, utilizando a Eq. 4. Os resultados obtidos estão representados na Figura 26.

Figura 26 – Linearização dos dados de atividade hidrolítica para determinação da constante de desativação térmica da enzima de *Rhizopus oryzae* livre.



Fonte: o autor.

A partir dessa curva, obteve-se a Eq. 16:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -0,2006 \cdot t \quad (16)$$

Em que A = atividade hidrolítica (U.g⁻¹) dosada no tempo t, A₀ = atividade hidrolítica (U.g⁻¹) no tempo 0.

Assim, o coeficiente angular obtido pela equação dessa reta equivale à constante de desativação térmica, sendo K_d = 0,2006 h⁻¹. Em seguida, utilizando a equação 5, foi calculado o tempo de meia vida para o biocatalisador solúvel, o tempo obtido foi 3,46 h.

Dessa forma, verifica-se que a temperatura de 45 °C foi muito elevada, resultando em uma elevada perda de atividade em um período curto de tempo. Nos estudos de KHARRAT e

seus colaboradores (2011) que caracterizaram a lipase livre de *Rhizopus oryzae* quanto à estabilidade térmica, esse padrão também foi observado, porém de forma mais intensa. Após 1 hora de incubação a 45°C apenas 20% da enzima ainda estava ativa, enquanto que neste trabalho, para o mesmo tempo 70% do biocatalisador apresentou atividade. Uma das possíveis justificativas para as diferenças entre os valores obtidos é o valor de pH para a execução dos ensaios. Neste trabalho utilizou-se pH 7, enquanto que KHARRAT e seus colaboradores avaliaram as atividades residuais em pH 8,5. Os estudos realizados por CHÂABOUNI e seus colaboradores (2008) também mostraram que em pH 8,5 e 45°C o biocatalisador perde drasticamente sua eficiência. Após o período de incubação de 1 hora a enzima apresentava apenas 40% de sua atividade inicial, quantificada pelo mesmo método utilizado neste trabalho. Novamente, verifica-se a influência do pH na atividade enzimática.

Por outro lado, os estudos realizados por Pashangeh e seus colaboradores (2017) apresentaram resultados mais atrativos para a estabilidade térmica da lipase de *Rhizopus oryzae*. Após um período de incubação de 3 horas a 45°C, a enzima apresentou atividade residual de 80%. Este valor destoava do encontrado neste trabalho e acredita-se que esta diferença se dá pelos métodos de dosagem de atividade enzimática utilizados. Este trabalho utilizou técnica titulométrica de emulsão de azeite de oliva, enquanto Pashangeh e seus colaboradores (2017) utilizaram como substrato o nitrofenil butirato (pNPP), analisando o produto por espectroscopia.

5.4 PROPRIEDADES DA ENZIMA IMOBILIZADA

5.4.1 INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA ENZIMA IMOBILIZADA

Para avaliar a influência da temperatura e do pH na atividade enzimática da lipase de *Rhizopus oryzae* immobilizada em pó de sabugo de milho foram realizados 7 experimentos utilizando o delineamento composto central (DCC) (Tabela 11). Estudos preliminares do grupo de pesquisa, evidenciaram que, diferentemente da enzima na forma livre, os dados para o derivado immobilizado se ajustam melhor ao modelo DCC, quando comparado ao DCCR.

Tabela 11- Matriz do planejamento experimental DCC: variáveis independentes (pH e temperatura) e a variável resposta (atividade enzimática, U.g-1) para cada ensaio.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais		Resposta
	pH	T(°C)	pH	T(°C)	Atividade (U/g)
1	-1	-1	6,0	35	74
2	1	-1	9,0	35	132
3	-1	1	6,0	65	80
4	1	1	9,0	65	172
5	0	0	7,5	50	113
6	0	0	7,5	50	114
7	0	0	7,5	50	108

Fonte: o autor.

Após o tratamento de dados no Protimiza Experimental Design® (2014) foi gerada a Tabela 17 (Apêndice C) que apresenta os coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor para a atividade obtida nos ensaios. Os dados tabelados foram utilizados na construção do modelo matemático descrito pela Eq. 17.

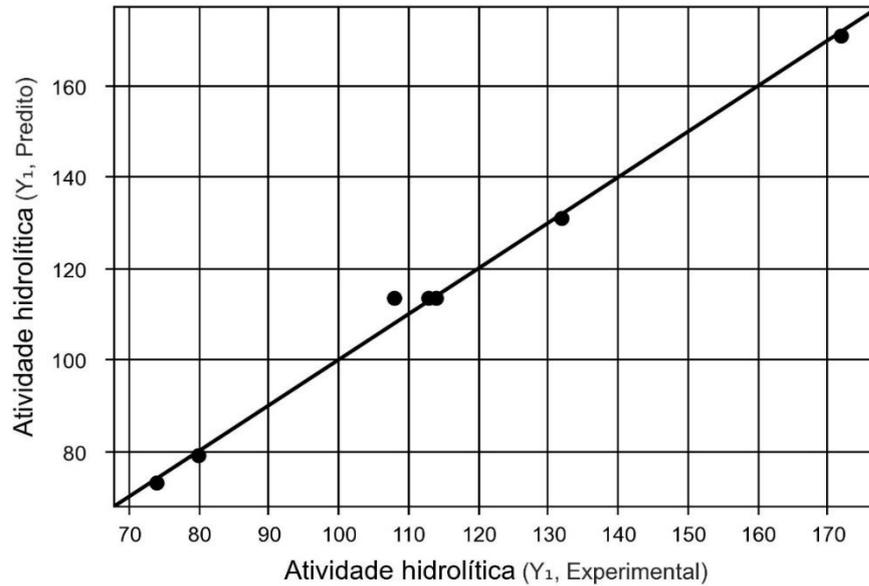
$$Y_1 = 113,29 + 37,50 x_1 + 11,50 x_2 + 8,50 x_1 x_2 \quad (17)$$

Na qual: Y1 = Atividade (U.g⁻¹), x1 = pH e x2 = Temperatura (°C).

Em seguida, foi realizada a ANOVA com nível de significância $\alpha = 5\%$, exibida na Tabela 18 (Apêndice C).

Como $F_{\text{regressão/resíduos}} (187,1) > F_{\text{Tabelado}} (8,94)$ e $R^2 = 99,47\%$ o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo, ou seja, os valores experimentais se ajustam aos valores preditos (Figura 27).

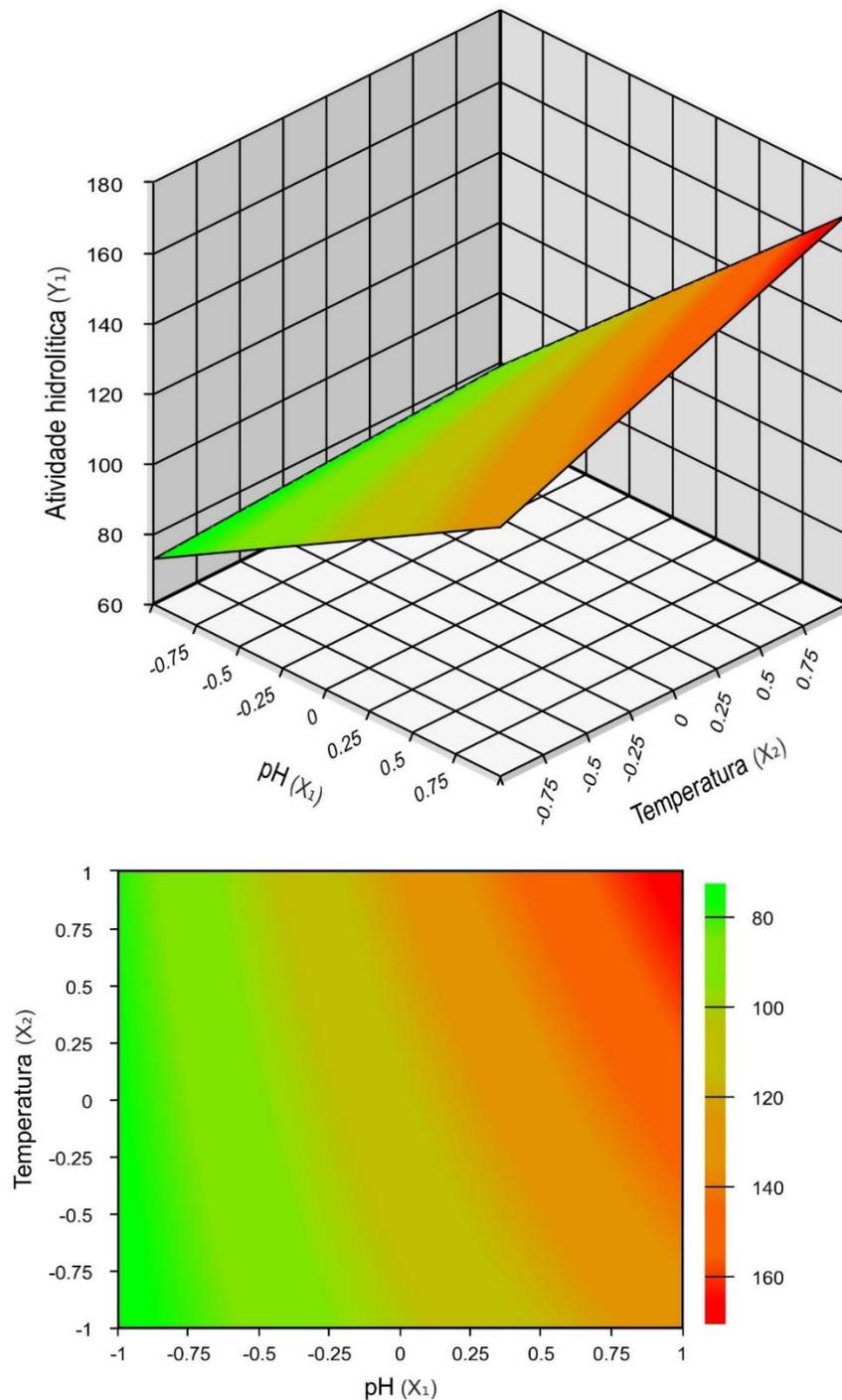
Figura 27 - Valores experimentais e valores previstos para o modelo de atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.



Fonte: o autor.

Assim, após a validação do modelo matemático para a variável de atividade enzimática, foram geradas as superfícies de respostas representadas pela Figura 28.

Figura 28 - Superfícies obtidas no planejamento experimental DCCR para a atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* em pó de sabugo de milho como resposta da variação de pH e temperatura.



Fonte: o autor.

Analisando-se as superfícies de respostas obtidas, verifica-se que, para este estudo, ambas as variáveis, pH e temperatura influenciam na atividade hidrolítica, de forma análoga ao verificado para a enzima livre. As reações de acidólise deste trabalho são realizadas em meio

orgânico, ou seja, não há pH, porém, este resultado permite que a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho seja utilizada em outras aplicações com meios aquosos, como por exemplo reações de interesterificação para síntese de biodiesel e reações de hidrólise aquosa para obtenção de determinados enantiômeros de fármacos (YUAN *et. al.*, 2019).

Ainda se analisando a Figura 29, verifica-se que com os dados obtidos não é possível obter um único par de valores para temperatura e pH ótimos e sim uma região de melhor atividade da enzima imobilizada. Este fato pode ser justificado devido a heterogeneidade do suporte e conseqüentemente do derivado imobilizado, como verificado nas análises de FTIR e MEV no item 5.1.3.

Dessa forma, verifica-se que, baseado neste planejamento experimental, a região de melhor atividade hidrolítica da enzima imobilizada são em pH entre 7-9 e temperaturas entre 50 e 65°C. Para a enzima na forma livre, descrita no item 5.3.1, obtiveram-se os valores de 39°C para temperatura ótima e 6,8 para o pH. Comparando-se os valores obtidos nos dois ensaios, verifica-se que a imobilização enzimática proporcionou aumento nos valores ótimos de pH e temperatura da enzima de *Rhizopus oryzae*. Esta é uma das possíveis vantagens que pode ser obtida a partir das técnicas de imobilização, porém nem sempre este fato é observado.

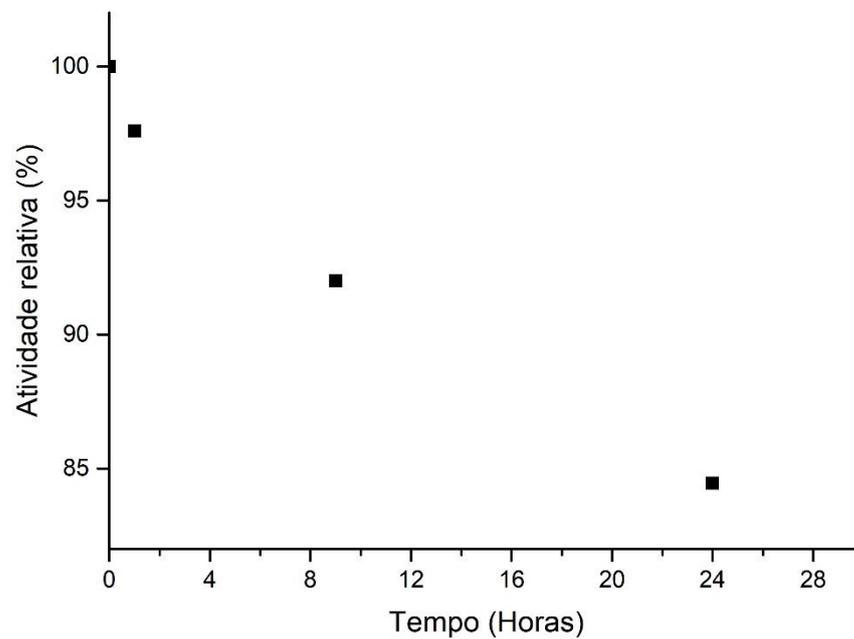
KHARRAT e seus colaboradores (2011) imobilizaram a lipase de rROL por adsorção em sílica obtiveram os mesmos valores de temperatura e pH ótimos, tanto para a enzima livre quanto para a imobilizada. Por outro lado, KARTAL *et. al.* 2012, caracterizaram a lipase de rROL imobilizada por crosslink e verificaram que a temperatura ótima do derivado imobilizado aumentou de 35°C para 45°C quando comparado a forma livre, bem como o pH ótimo apresentou aumento de 6,5 para 7. Os autores atribuem o aumento do pH ótimo a mudança na carga eletrostática total da enzima após o processo de imobilização, uma vez que há aumento do montante de grupamentos ácidos e dessa forma a enzima apresenta caráter mais poliônico.

Por fim, vale ressaltar que a imobilização da lipase de *Rhizopus oryzae* em pó de sabugo de milho foi satisfatória e apresentou vantagens quando comparada a enzima na forma livre, corroborando assim o potencial do pó de sabugo de milho como suporte. Além disso, interpretando as superfícies de respostas obtidas, verifica-se que poderiam ter sido exploradas outras regiões, com faixas de temperaturas e pH mais elevados a fim de verificar o possível aumento da atividade hidrolítica.

5.4.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

O estudo da estabilidade térmica com a enzima imobilizada foi realizado na temperatura de 45°C, mesma utilizada na reação de acidólise. Os resultados para o perfil de inativação térmica são apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Atividade residual da enzima de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho em função do tempo decorrido de incubação na temperatura de 45°C e pH = 7.

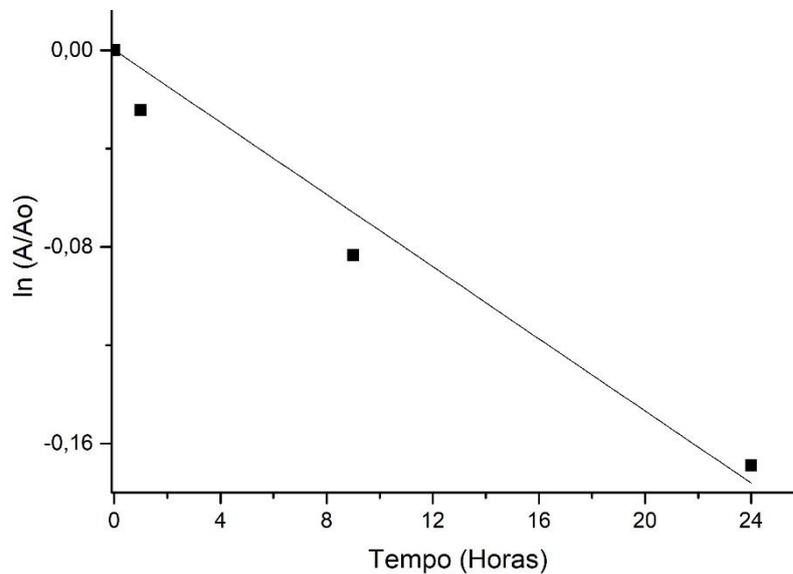


Fonte: o autor.

Analisando a Figura 30, tem-se que a enzima em sua forma imobilizada não perde atividade como o biocatalisador solúvel, sendo estável na temperatura de estudo e tendo perda de apenas 15% em atividade ao final das 24h.

Posteriormente, foi realizada a linearização dos pontos obtidos na Figura 30, utilizando a equação 4, sendo os resultados apresentados na Figura 30.

Figura 30 - Linearização dos dados de atividade hidrolítica para determinação da constante de desativação térmica da enzima de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.



Fonte: o autor.

A partir dessa curva, obteve-se a Eq. 18:

$$\ln \left(\frac{A}{A_0} \right) = 0,00734 \cdot t \quad (18)$$

Na qual A = atividade hidrolítica (U.g⁻¹) dosada no tempo t, A₀ = atividade hidrolítica (U.g⁻¹) no tempo 0.

O coeficiente angular obtido pela equação dessa reta corresponde numericamente a constante de desativação térmica, sendo $K_d = 0,00734 \text{ h}^{-1}$. Em seguida, utilizando a equação 6, foi calculado o tempo de meia vida para o biocatalisador imobilizado, o tempo obtido foi de 94,4 h. Nunes e seus colaboradores (2012) estudaram a lipase de rROL imobilizada em Eupergit, a qual apresentou tempo de meia vida de 54,3 h. Assim, a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho apresentou alta estabilidade térmica quando comparada ao biocatalisador livre, sendo cerca de cinco vezes superior, além de superior a imobilizada em suporte comercial.

Isso ocorre devido à interferência do processo de imobilização na estabilidade enzimática. Segundo Dwevedi (2016) essa interferência pode ser positiva ou negativa em função da matriz do suporte, a qual deve ter ampla área de superfície e grupos reativos que interajam com a enzima, nesse caso os grupos -OH presentes no pó de sabugo de milho. Além disso, a interação suporte-enzima é muito relevante e, apesar do método de imobilização por

ligação covalente reduzir a atividade enzimática, por outro lado aumenta significativamente a estabilidade da enzima em condições adversas, dentre elas o aumento de temperatura (QUILLES JUNIOR, 2014).

Pashangeh *et al.* (2017) imobilizaram covalentemente a lipase de *Rhizopus oryzae* em partículas nanomagnéticas e após 3 horas de incubação a 45°C a enzima apresentava cerca de 90% de sua atividade inicial. A temperatura mais extrema estudada por estes autores foi de 70°C, na qual após 3 horas de incubação a enzima imobilizada ainda manteve 10% de sua atividade enzimática. Os estudos realizados por Kharrat *et al.* (2011) com a mesma lipase, porém imobilizada por adsorção física em sílica gel também apresentou melhora significativa da estabilidade térmica após o processo de imobilização. Após incubação à 45°C, por 1 hora, o biocatalisador imobilizado apresentou cerca de 90% de sua atividade.

Portanto, para este estudo, os resultados de tempo de meia vida e K_d foram satisfatórios, uma vez que o derivado imobilizado se mantém estável durante o tempo de reação de acidólise para obtenção dos triglicerídeos estruturados.

5.5 TESTE DE CARREGAMENTO

Após os processos de funcionalização e ativação do suporte, o mesmo foi empregado na imobilização, item 4.1. Um estudo de carregamento foi realizado para avaliar a quantidade de enzima que proporcionasse rendimento de imobilização considerável e atividade hidrolítica suficiente para aplicação na reação de interesse. Optou-se por 25 mg/mL de enzima como carregamento máximo devido a solubilidade da enzima, uma vez que se verificaram em testes preliminares que concentrações acima deste limite não apresentaram completa dissolução. Os resultados descritos na Tabela 12 mostram os rendimentos de imobilização obtidos.

Tabela 12 - Comparação entre concentração de proteínas na enzima livre e no sobrenadante após a imobilização utilizando carregamento de 5 mg/mL e 25 mg/mL .

Carregamento (mg/mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Rendimento de imobilização (%)
5	Enzima Livre	1,21 ± 0,04
	Sobrenadante	0,83 ± 0,03
25	Enzima Livre	2,42 ± 0,07
	Sobrenadante	1,27 ± 0,06

Fonte: o autor.

Como se pode observar, obteve-se um rendimento de imobilização de 31,44% no carregamento de 5 mg/mL e 47,48% e para o carregamento de 25 mg/mL, com atividades

hidrolíticas de $34,64 \pm 7,00$ U/g e $54,45 \pm 7,00$ U/g, respectivamente. Desta forma, pode-se observar que tanto pelo rendimento de imobilização, quanto pela atividade hidrolítica obtida, o carregamento de 25 mg/mL apresentou melhores resultados.

Segundo Aghababaie e seus colaboradores (2018) que realizaram a imobilização da lipase de *Candida rugosa* em membrana de poliacrilonitrila ativada com glutaraldeído, obtiveram um rendimento de imobilização de cerca de 40%, o que mostra que, apesar de suportes diferentes e origens diferentes da enzima, o rendimento de imobilização da lipase está em conformidade com os valores encontrados na literatura.

Costa *et al.* 2017, imobilizaram por troca iônica a lipase de *Rhizopus oryzae* em Amberlite IRA 96. Esses pesquisadores obtiveram rendimento de 64,7%, enquanto neste trabalho o valor obtido foi de $47,5 \pm 3,1\%$. Uma possível justificativa para essa diferença é a uniformidade das partículas de suporte utilizadas nos dois trabalhos. O suporte comercial possui granulometria regular, fato esse que favorece a imobilização. Já o pó de sabugo de milho, apesar de ter sido tamisado, apresenta granulometria menos uniforme. Outros fatores a serem considerados também são as diferenças entre as propriedades dos suportes utilizados nos dois trabalhos, bem como os métodos de imobilização utilizados. Dessa forma, verifica-se que o pó de sabugo de milho apresentou desempenho satisfatório na imobilização e é uma promissora matéria prima para ser utilizada como suporte.

5.6. REAÇÕES DE ACIDÓLISE DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA E ÁCIDO CÁPRICO

5.6.1 REAÇÃO EM REATOR DE TANQUE AGITADO

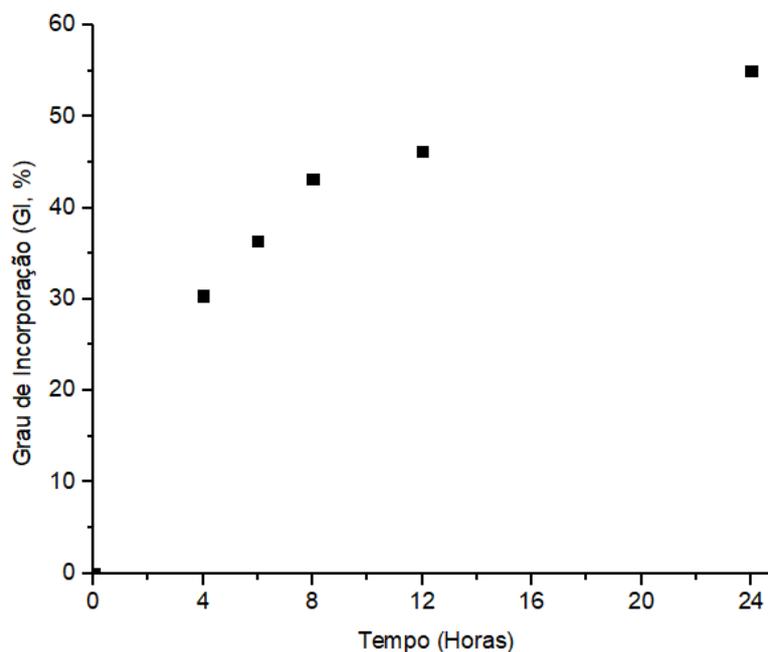
A maior parte dos estudos encontrados na literatura sobre reações de acidólise enzimática são operadas em reatores de tanque agitado (XU *et al.*, 2018; MORSELLI-RIBEIRO *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017; RUAN *et al.*, 2014). Este fato pode ser explicado por se tratar de uma configuração de simples construção e também devido a sua mistura perfeita, que propicia um produto uniforme. Outra vantagem deste reator em reações enzimáticas é que devido ao contato de enzima-substrato ser intenso as chances de sucesso da reação são elevadas (KIM, AKOH, 2015).

Com essa motivação, somada a necessidade de se comparar os valores de GI empregando-se o reator de leito fixo utilizado neste projeto, realizaram-se reações de acidólise em reator batelada de tanque agitado. Os testes foram realizados em duplicata, com dois lotes

diferentes de pó de sabugo de milho imobilizado, a fim de mitigar quaisquer possíveis efeitos de reprodutibilidade experimental.

Os valores médios dos graus de incorporação (GI) das duas reações de acidólise realizadas em modo batelada, bem como seus respectivos desvios padrão estão representados na Figura 31.

Figura 31 - Graus de incorporação (GI, %) médios em função do tempo para triplicata de reações de acidólise em reator de tanque agitado.



Fonte: o autor.

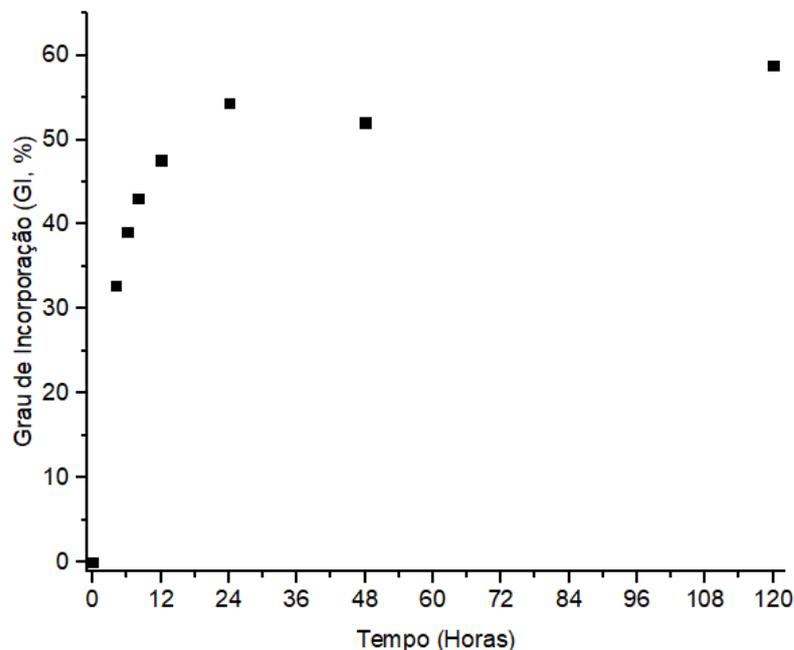
Como pode-se observar, o GI médio do ácido graxo de interesse (C_{10}) foi aumentando com o tempo de reação e atingiu seu ponto máximo de $55 \pm 0,3\%$ em 24 horas. Bassan *et al.* (2018), que também realizaram a acidólise enzimático do óleo de semente de uva para produção de lipídeos estruturados, porém empregando uma lipase imobilizada comercialmente (Lipozyme RM IM), obtiveram GI de 51,8%. Nunes e seus colaboradores (2011), apresentaram dados de produção destes triglicerídeos, pela acidólise do azeite de oliva e ácido cáprico, catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada covalentemente em Eupergit®, o GI obtido foi de 52,2%. Costa *et al* (2017) imobilizaram também a lipase de ROL em Amberlite IRA96 e obtiveram GI de 52,4%. Estes resultados mostram o potencial da enzima imobilizada em pó de sabugo de milho para a produção de lipídeos estruturados, uma vez que foram obtidos resultados semelhantes a lipases imobilizadas comercialmente, de alto valor agregado.

Os índices de peróxido (IP) do óleo de semente de uva puro e do produto obtido após 24 horas de reação foram analisados. Para a duplicata de reações em reatores de tanque agitado, obteve-se um valor de $5,1 \pm 0,5$ mEq/Kg óleo, enquanto para o óleo (matéria prima) obteve-se o valor de $2,0 \pm 0,5$ mEq/Kg óleo. Estes valores estão em conformidade com a exigência da Anvisa de no máximo 10 mEq/Kg óleo. Apesar disso, o aumento do IP após a reação evidencia a influência de fatores como luz e calor durante as reações de acidólise.

5.6.2 REAÇÃO EM LEITO FIXO OPERANDO COM RECICLO TOTAL

Seguindo a metodologia descrita no item 4.4.2, realizou-se uma reação de acidólise em reator de leito fixo encamisado operando em batelada. O meio reacional foi mantido sob agitação a fim de que estivesse bem homogêneo ao ser alimentado em fluxo ascendente no reator. A vazão de alimentação foi de 1 mL/min e a reação foi conduzida a 45°C. As amostras foram coletadas nos tempos de 0, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 120 horas e seus respectivos graus médios de incorporação (GI) estão representados na Figura 32.

Figura 32 - Grau de incorporação (GI, %) em função do tempo para reação de acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisada por lipase de ROL imobilizada em pó de sabugo de milho, em reator de leito fixo, operando em modo batelada.



Fonte: o autor.

Por se tratar da primeira reação utilizando leito fixo, decidiu-se conduzi-la por um período maior. Este estudo foi embasado por resultados de Abed *et al.* (2018) que mostram que o GI tende a estabilizar após longos períodos de reação. Dessa forma, analisando-se a Figura

20, verifica-se que o ponto de maior grau de incorporação foi atingido com 120 horas de reação, porém a partir das 24 horas já apresentou tendência de estabilização.

Uma vez que as reações conduzidas nos reatores de tanque agitado (STR) e leito fixo (PBR) mantiveram a relação entre a massa de biocatalisador e a massa de meio reacional, faz-se possível comparar seus resultados de grau de incorporação. Nesse sentido, verifica-se que para o período de 24 horas de reação ambos os reatores apresentaram graus de incorporação próximos, sendo 55,0% no STR e 54,4% no PBR.

Apesar da proximidade dos valores, cada configuração de reator apresenta certas vantagens e desvantagens, as quais devem ser ponderadas a fim de selecionar o melhor biorreator em cada processo. Nesse sentido, a eficiente agitação dos STR por um lado proporciona elevado contato entre enzima-substrato e por outro pode causar danos à integridade do suporte, inviabilizando sua reutilização. Nos reatores de tanque agitado o controle da temperatura, importante variável em processos enzimáticos é mais fácil quando comparado a reatores de leito fixo. Por outro lado, nos PBR a separação do biocatalisador do meio reacional, bem como sua operação em regime contínuo é mais vantajosa quando comparadas ao STR (PINO *et al.*, 2018; SEN, NATH, BHATTACHARJEE, 2016).

As atividades hidrolíticas do derivado imobilizado foram dosadas antes e após a reação de acidólise em reator de leito fixo. A média dos valores obtidos, bem como seus respectivos desvios padrões estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Atividades hidrolíticas (U.g^{-1}) dos derivados imobilizados antes e após a reação de acidólise do óleo de semente de uva e ácido cáprico, catalisada por lipase de ROL, em reator de leito fixo operando em batelada.

Atividade hidrolítica (U.g^{-1})	
Antes da reação	$259,85 \pm 3,31$
Após a reação	$217,45 \pm 2,00$

Fonte: o autor.

Analisando-se os valores da Tabela 13, verifica-se que a enzima imobilizada manteve suas propriedades catalíticas mesmo após 120 horas de reação, perdendo apenas cerca de 20% de sua atividade hidrolítica. Este fato evidencia uma das vantagens da imobilização, a qual proporciona a fácil separação do biocatalisador do meio reacional e permite sua reutilização em outras reações com a atividade hidrolítica preservada (COSTA *et al.*, 2017). Nas próximas

etapas do projeto, será analisada a estabilidade operacional do biocatalisador, permitindo assim uma análise mais profunda deste parâmetro.

Outra variável analisada foi o índice de peróxido (IP) do óleo no início e final da reação. Para o óleo inicial o IP foi de $3,8 \pm 0,5$ mEq/Kg óleo e para o produto após 120 horas de reação, obteve-se $16,6 \pm 0,9$ mEq/Kg óleo. Este valor está acima dos 10 mEq/Kg permitidos pela ANVISA para óleos refinados e prensados a frio, como é o caso do óleo de semente de uva. Esse elevado valor de índice de peróxido está associado ao longo período de reação, resultando em longa exposição do óleo a luz e ao calor. A fim de que o óleo de semente de uva modificado esteja dentro das especificações exigidas pelo órgão regulatório a reação deve ser conduzida por um período menor. Pode-se também verificar a influência da luz no índice de peróxido, deixando o reator em ambientes de baixa luminosidade durante a execução da reação (ANVISA, 1999; THODE FILHO *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, por meio de um planejamento experimental avaliaram-se a influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica. Para a lipase de *Rhizopus oryzae* na forma livre, determinaram-se a temperatura e pH ótimos como sendo 39°C e pH 6,8. Já para a lipase imobilizada em pó de sabugo de milho, verificou-se que não há um ponto máximo de pH e temperatura e sim uma região de maior atividade hidrolítica da enzima imobilizada, como sendo em pH entre 7-9 e temperaturas entre 50 e 65°C. Estes valores são superiores aos encontrados para a lipase na forma livre e foram alcançados devido a imobilização satisfatória da enzima em pó de sabugo de milho.

Com relação á estabilidades térmicas, a enzima livre apresentou tempo de meia vida de 3,46 horas, enquanto a imobilizada de 94,6 horas. O processo de imobilização por ligação covalente neste trabalho resultou em aumento de cerca de 30 vezes na estabilidade térmica, porém, diminuiu a atividade hidrolítica do biocatalisador.

Os derivados imobilizados foram aplicados em reatores de tanque agitado (STR) e de leito fixo (PBR) para reações de acidólise utilizando óleo de semente de uva e ácido cáprico (C₁₀). O desempenho do biocatalisador foi satisfatório em ambas configurações, resultou em um grau de incorporação médio (GI) de 55,0% e 54,5%, respectivamente para os STR e o PBR.

Os produtos obtidos também foram avaliados quanto ao índice de peróxido (IP), verificando-se que o processo de luz e calor presente nas reações provocou aumento no IP. Essa alteração foi mais intensa no reator de leito fixo, uma vez que a reação foi conduzida por mais tempo.

O pó de sabugo de milho *in natura*, bem como amostras de todas as etapas de tratamento e ativação do suporte foram analisadas em FTIR, MEV e análise elementar por EDS, verificando-se que estes processos foram realizados de maneira satisfatória.

Dessa forma, o sucesso na imobilização da lipase em pó de sabugo de milho concluiu-se que o pó de sabugo de milho é um suporte com elevado potencial para imobilização enzimática, agregando valor a um subproduto agroindustrial. Além disso, baseado nos graus de incorporação satisfatórios obtidos nas reações de acidólise enzimática, verificou-se que os reatores de tanque agitado, bem como o de leito fixo são viáveis para a produção de triglicerídeos estruturados.

REFERENCIAS

- ABED, S. M. et al. Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *Lwt – Food Science and Tecnology*, v. 93, p. 306–315, 2018.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013.
- AL-QODAH, Z. et al. Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review. *Biochemical Engineering Journal*, v. 121, p. 94–106, 2017.
- ANG, X.; QUEK, S.-Y.; CHEN, H. Structured Lipid Functionality and Application. *Elsevier*, 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. *Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais*. Disponível em: < <http://legis.bvs.br/leisref/public> >. Acesso em: 12/09/2019.
- ASSUMPCÃO, S. M. N. et al. Pré-tratamento combinado de H₂SO₄/H₂O₂/NaOH para obtenção das frações solúveis lignocelulósicas do bagaço da cana-de-açúcar. *Rev. Virtual Quim*, v. 8, n. 3, p. 803-822, 2016.
- AYDIN, A.; EMRAH, G.; GÜRAY, E. *Aspergillus niger* may improve nutritional quality of grape seed and its usability in animal nutrition through solid-state fermentation. v. 02, n. 03, p. 273–277, 2018.
- BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2014.
- BASSAN, C. J. et al. Immobilization of trypsin in lignocellulosic waste material to produce peptides with bioactive potential from whey protein. *Materials*, v. 9, n. 5, 2016.
- BASSAN, N. R. et al. Enzymatic modification of grape (*Vitis vinifera L.*) seed oil aimig to obtain dietary triacylglycerols in a batch reactor. *LWT - Food Science and Technology*, 2018.
- CABALLERO, E.; SOTO, C.; OLIVARES, A.; ALTAMIRANO.; C. Potential use of avocado oil on structured Lipids MLM type production catalysed by commercial immobilised lipases. *Plos one*, v. 9, set., 2014.
- CASAS-GODOY, L.; MARTY, A.; SANDOVAL, G.; FERREIRA – DIAS, S. Optimization of medium chain length fatty acid incorporation into olive oil catalyzed by immobilized Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Biochemical Engineering Journal*. v. 77, p. 20 – 27, 2013.
- CHOI, J. H. et al. Lipase-catalysed production of triacylglycerols enriched in pinolenic acid at the sn-2 position from pine nut oil. *Wiley Online Library*, v. 92, n. 4, p. 870-876, Set. 2011.

- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento da safra brasileira: Grãos*, v. 6 Safra 2018/19 - Quarto levantamento e monitoramento agrícola, v. 6, n. 2318–6852, p. 126, 2019.
- COSTA, C. M et al. Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 120, 2018.
- COSTA SILVA, T. A. et al. Drying of enzyme immobilized on eco-friendly supports. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 44, p. 3019–3026, 2015.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia Eletrônica de Varredura: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. 1 ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2
- DEMIR, H.; DEMIR, B. B. Comparison of Chemical Composition of Pomegranate (*Punica Granatum L.*) and Grape (*Vitis Vinifera L.*) Seed Oils Obtained By Extraction. v. 1, n. 2, p. 18–23, 2018.
- FERREIRA-DIAS, S.; SANDOVAL, G.; PLOU, F.; VALERO, F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 1-38, 2013.
- FOGLER, S. C., *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*, 3ª ed., Editora LTC, 2002.
- GANGULY, S.; NANDI, S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 102, p. 2–5, 2015.
- GARAVAGLIA, J. et al. Grape seed oil compounds: Biological and chemical actions for health. *Nutrition and Metabolic Insights*, v. 9, p. 59–64, 2016.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.
- GARMROODI, M. et al. Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 86, p. 208–215, 2016.
- GRUBECKI, I. Optimal feed temperature for an immobilized enzyme fixed-bed reactor: A case study on hydrogen peroxide decomposition by commercial catalase. *Chemical and Process Engineering*. v. 39, n. 1, p. 39–57, 2018.
- IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. *Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas*, p. 134, 2012.
- ISO 12966-1:2014. Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters. 2014
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

- KIM, B. H.; AKOH, C. C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 8, p. C1713–C1724, 2015.
- KOLANZ, M. C. Introduction to Beryllium: Uses, Regulatory, History, and Disease. *Applied Occu. Env. Hygiene*, v.16, n. 5, p. 559-567. 2001
- LAI, O.-M. *et al.* Lipase/Esterase: Properties and Industrial Applications. *Elsevier*, 2019.
- LEVENSPIEL, O., *Engenharia das Reações Químicas*, Tradução da 3ª ed., Editora Blucher, 2000.
- LONDOÑO-HERNÁNDEZ, L. *et al.* *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, v. 257, n. May, p. 110–127, 2017.
- MANDARINO, J. *et al.* *Óleos Alimentos Funcionais*. Londrina: Embrapa, 2005.
- MARIA, G.; CRISAN, M. The instability of solid oxide fuel cells in an intermediate. n. February, p. 199–203, 2011.
- MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: A review. *Journal of Biotech Research*, v. 8, n. 1, p. 58–77, 2017.
- MOREIRA, D. K. T. *et al.* Production and characterization of structured lipids with antiobesity potential and as a source of essential fatty acids. *Food Research International*, v. 99, p. 713–719, 2017.
- PAVIA, D. *et al.* *Introdução à espectroscopia*. Cengage Learning, 2010.
- PASHANGEH, K. *et al.* Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 105, p.300-307, 2017.
- PANDE, G. *et al.* Synthesis of infant formula fat analogs enriched with DHA from extra virgin olive oil and tripalmitin. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 90, n. 9, p. 1311–1318, 2013.
- PARK, E. *et al.* Effects of grape seed extract beverage on blood pressure and metabolic indices in individuals with pre-hypertension: A randomised, double-blinded, two-arm, parallel, placebo-controlled trial. *British Journal of Nutrition*, v. 115, n. 2, p. 226–238, 2016.
- PAULA, A. V. *Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais*. 2011. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2012.
- PINO, M. S. *et al.* Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chemical Engineering Journal*, v. 347, p. 119–136, 2018.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUD, M. A. Z. Enzymatic reactor for biodiesel synthesis: Presents status and future prospects. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 511-525, Oct. 2015

QUILLES JUNIOR, J. C. *Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise*. 2014. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

RAI, B., *Essentials of Industrial Microbiology*. 4. ed. *Dharan*: Lulu, 2012. 423 p.

RAMOS, O. L.; MALCATA, F. X. Food-Grade Enzymes. *Reference Module in Life Sciences*, n. April 2016, p. 1–17, 2017.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

SEN, P.; NATH, A.; BHATTACHARJEE, C. Packed-Bed Bioreactor and Its Application in Dairy, Food, and Beverage Industry. *Bioprocesses, Bioreactors and Controls*, p. 235-277, 2016.

SHELDON, R. A.; PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, Mar. 2013.

SHINAGAWA, F. B. et al. Grape seed oil: a potential functional food? *Food Science and Technology*, v. 35, n. 3, p. 399–406, 2015.

_____. Chemical composition of cold pressed Brazilian grape seed oil. *Food Science and Technology*, v. 38, n. 1, p. 164–171, 2018.

SILVA, H. S. et al. *Adição de cinza de sabugo de milho em formulações de cerâmica vermelha*. p. 2617–2624, 2016.

SOUSA, E. C. et al. Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera L.*), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*, v. 34, n. 1, p. 135–142, 2014.

SOUZA VANDENBERGHE, L. P. DE et al. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass, *Elsevier*, 1 ed, 350 p, 2016.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Continuous biodiesel conversion via enzymatic transesterification catalyzed by immobilized Burkholderia lipase in a packed-bed bioreactor. *Applied Energy*, v. 168, p. 340–350, 2016.

VILAS BÔAS, R. N. et al. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 119, p. 61–68, 2018.

WANG, Y.; XIA, L.; XU, X.; XIE, L.; DUAN, Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, n. 4, p. 707-712, 2012.

YUAN, X., et al. Lipase-catalyzed Production of (S)-Carprofen Enhanced by Hydroxyethyl- β -cyclodextrins: Experiment and Optimization. *Organic Process Research & Development*, 2019.

ZANIN, G. M.; Moraes, F. F. *Enzimas como agentes biotecnológicos*; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004, p. 35-85.

ZHAO, J. et al. Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase by Reasonable Immobilization on Magnetic Nanoparticles and Its Application in Synthesis 1,3-Diacylglycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 188, n. 3, p. 677–689, 2019.

ZORN, K. et al. Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update. *Progress in Lipid Research*, v. 63, p. 153–164, 2016.

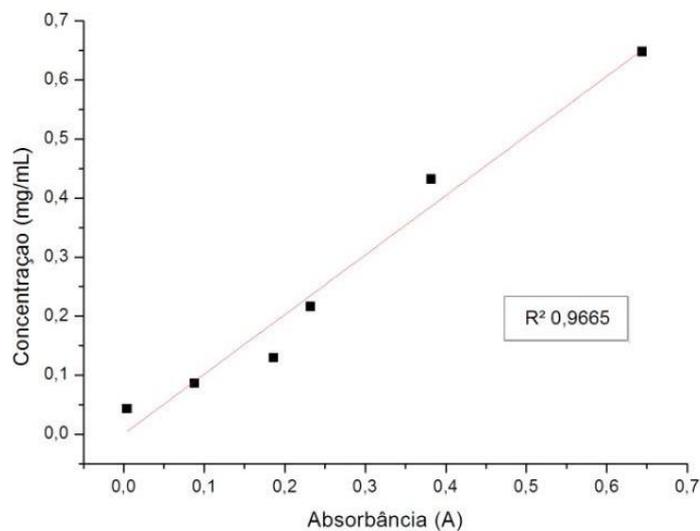
Apêndice A – Curva de calibração do corante utilizado no teste de traçador

Tabela 14 - Concentrações do traçador ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e respectivas absorvâncias das amostras coletadas durante a execução do teste de traçador em reator de leito fixo.

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Absorbância (A)
0,043	0,004
0,086	0,088
0,130	0,186
0,216	0,232
0,432	0,382
0,648	0,644

Fonte: o autor.

Figura 33 - Curva de calibração do corante lipossolúvel Rosa Mix® utilizado no teste de traçador em reator de leito fixo.



Fonte: o autor.

Apêndice B – Teste ANOVA, coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p valor do delineamento experimental da enzima de *Rhizopus oryzae* livre

Tabela 15 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor no estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da lipase livre de *Rhizopus oryzae*.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	t-calculado	p-valor
Média	27949,84	1030,76	27,116	2,38E-08
x ₁	-7077,55	728,86	-9,711	2,60E-05
x ₁ ²	-7271,34	814,89	-8,923	4,51E-05
x ₂	-1588,77	728,86	-2,180	0,066
x ₂ ²	-4295,73	814,89	-5,272	0,001

Fonte: o autor.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-valor
Regressão	740400225,2	4,00	185100056,3	37,7	0,00022
Resíduos	29748897,05	6,00	4908921,10	-	-
Falta de Ajuste	28111455,22	4,00	7027863,81	10,5	0,08906
Erro Puro	1342071,3	3,00	671035,60	-	-
Total	769853751,7	10,00	-	-	-

Fonte: o autor.

Apêndice C - Teste ANOVA, coeficientes de regressão, erro padrão, valores de t e p valor do delineamento experimental da enzima de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho

Tabela 17 - Coeficientes de regressão, erros padrão, os valores de t calculado e de p-valor no estudo do efeito da temperatura e pH na atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*. imobilizada em pó de sabugo de milho.

Nome	Coefficiente	Erro Padrão	t-calculado	p-valor
Média	113,29	1,28	88,48	0,0000
x ₁	37,50	1,69	22,14	0,0002
x ₂	11,50	1,69	6,79	0,0065
x ₁ . x ₂	8,50	1,69	5,02	0,0152

Fonte: o autor.

Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) no estudo do efeito do pH e da temperatura na atividade hidrolítica da lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em pó de sabugo de milho.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{calc}	p-valor
Regressão	6443,0	3,00	2147,7	187,q	0,00066
Resíduos	34,4	3,00	11,5	-	-
Falta de Ajuste	13,8	1,00	13,8	1,3	0,36776
Erro Puro	20,7	2,00	10,3	-	-
Total	6477,4	6,00	-	-	-

Fonte: o autor.