

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
CAMPUS AVANÇADO DE POÇOS DE CALDAS
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

RAFAELA TAVARES DE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Penicillium citrinum* PARA
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA**

Poços de Caldas/MG

2017

RAFAELA TAVARES DE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Penicillium citrinum* PARA
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Engenharia Química.
Orientadora: Profa. Dra. Grazielle Santos Silva Andrade.

Poços de Caldas/MG

2017

L732p Lima, Rafaela Tavares de.

Produção de células íntegras de *Penicilium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja / Rafaela Tavares de Lima. – Poços de Caldas, 2017.

79 f. –

Orientadora: Grazielle Santos Silva Andrade.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

Bibliografia.

1. Células íntegras. 2. Lipase. 3. Hidrólise. 4. Ultrassom. 5. Óleo de soja. I. Andrade, Grazielle Santos Silva. II. Título.

CDD: 660

RAFAELA TAVARES DE LIMA

**PRODUÇÃO DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE *Penicillium citrinum* PARA
APLICAÇÃO NA HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA**

A banca examinadora abaixo-assinada,
aprova a Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química
pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de Concentração: Engenharia
Química.

Aprovada em: 10 de março de 2017

Prof^o: Dra. Grazielle Santos Silva Andrade
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: *Grazielle S. S. Andrade*

Prof^o: Dra. Daniela Battaglia Hirata
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: *Daniela B. Hirata*

Prof^o: Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho
Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura: *Ana Karine Furtado de
Carvalho*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e coragem em todos os momentos da minha vida, por renovar minha fé todos os dias, pela força e sabedoria nos momentos difíceis. Obrigada pelas oportunidades, pelas pessoas que me cercam e por ter sempre guiado o meu caminho.

Aos meus pais Carlos e Isabel pelo apoio e amizade, por lutarem comigo, pelo estímulo nas horas difíceis, pela paciência nos meus momentos de estresse e pelo imenso amor que é a fonte da minha força, por contribuírem diretamente na minha formação profissional e pessoal.

As minhas irmãs Isabela e Maria Eduarda, pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora profa. Dra. Grazielle Santos Silva Andrade pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo carinho, incentivo, compreensão e conselhos dispensados neste período. Obrigada por compartilhar de seus conhecimentos, por toda a paciência e amizade.

Aos meus queridos amigos do mestrado pelos anos de amizade, por sempre me ajudarem, por seus conselhos e suas orações. Obrigado a todos pela convivência, pela amizade. Vocês tornaram mais alegres os meus dias de trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unifal, por todo o conhecimento repassado no decorrer destes dois anos.

A todos do laboratório pela agradável convivência e pelos bons momentos de descontração e alegria.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal de Alfenas, que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro do projeto.

RESUMO

LIMA, R. T. **Produção de células íntegras de *Penicillium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG, 2017.

A aplicação da tecnologia enzimática em óleos e gorduras vem se consolidando como uma alternativa atraente para a substituição dos processos químicos tradicionais. A hidrólise de óleos vegetais é um processo pelo qual se pode obter vários compostos de interesse industrial, possibilitando agregar valor tanto a cadeia produtiva como aos produtos finais. O presente trabalho teve como objetivo a produção de um biocatalisador ativo e estável a partir das células íntegras do fungo filamentoso *Penicillium citrinum* para aplicação na reação de hidrólise de óleos vegetais. As células íntegras contendo lipase ligada ao micélio foram produzidas na sua forma livre e imobilizada em espumas de poliuretano cortadas em cubos de 6 mm de aresta. Os biocatalisadores obtidos foram caracterizados quanto suas propriedades bioquímicas e cinéticas incluindo valores ótimos de pH, temperatura e constantes cinéticas, utilizando o método de hidrólise do azeite de oliva. As células livres apresentaram valores ótimos de atuação em pH 7,5 e temperatura de 45 °C. O tempo de meia vida obtido a 60 °C foi de 1,81 h, com velocidade máxima de 267,33 U/g. Para as células imobilizadas, a melhor atuação da lipase ligada ao micélio foi em pH 8,0 e temperatura de 40 °C, com velocidade máxima de 123,24 U/g e tempo de meia vida a 60 °C de 2,23 h. Definidas as condições ótimas de atuação das células, a próxima etapa do trabalho consistiu em realizar a hidrólise do óleo de soja empregando inicialmente as células livres, avaliando-se os efeitos da temperatura, pH, agitação e uso de solventes. Com o objetivo de melhorar a produtividade do sistema, os parâmetros temperatura e razão mássica óleo/tampão foram otimizados por meio do planejamento experimental, em busca das melhores condições para a reação. A condição otimizada predita pelo planejamento fatorial foi temperatura de 37°C e razão mássica óleo/tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 de 20%, obtendo-se uma porcentagem máxima de hidrólise de 38,6% após 3 horas de reação empregando 10% m/m de biocatalisador em sua forma livre na presença de agente emulsificante. A etapa seguinte explorou a utilização de ondas ultrassônicas na hidrólise do óleo de soja sendo constatados incrementos significativos no grau de hidrólise máximo em um período de tempo de 9 h. Foram obtidos valores de 77 e 96% de grau de hidrólise com e sem agente emulsificante, evidenciando a influência positiva das ondas ultrassônicas na reação. A análise cromatográfica do hidrolisado revelou que as células de *P. citrinum* forneceram os principais ácidos graxos presentes no óleo de soja, com predominância dos ácidos graxos C18:1 e C18:2. A influência de óleos vegetais contendo diferentes composições em ácidos graxos (oliva, canola e girassol) também foi avaliada na reação de hidrólise, sendo constatada a preferência do biocatalisador livre na conversão em ácidos graxos de cadeia longa, presentes no óleo de girassol. Ao final, o desempenho do biocatalisador imobilizado foi investigado na reação de hidrólise do óleo de soja e revelou resultados promissores, com grau de hidrólise máximo de 55,7% em 12h de reação. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o emprego de células íntegras como biocatalisador em reações de hidrólise de óleos vegetais é uma alternativa promissora à catálise convencional, principalmente na obtenção de ácidos graxos poli-insaturados, como ômega 6.

Palavras-chave: Células íntegras. Lipase. Hidrólise. Ultrassom. Óleo de soja.

ABSTRACT

LIMA, R. T. **Production of *Penicillium citrinum* whole cells for application in the hydrolysis of soybean oil.** 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG, 2017.

The application of enzymatic technology in oils and fats has been consolidated as an attractive alternative for the substitution of traditional chemical processes. The hydrolysis of vegetable oils is a process by which several compounds of industrial interest can be obtained, allowing to add value both the production chain and the final products. This study aimed to the production of an active biocatalyst and stable from whole cells of the filamentous fungus *Penicillium citrinum* for application in the hydrolysis reaction of vegetable oils. The whole cells containing intracellular lipase attached to the mycelium were produced in free and immobilized form polyurethane foams cut into cubes 6 mm edge. The biocatalysts were characterized as their biochemical and kinetic properties including optimum values of pH, temperature and kinetic constants. The free cells showed optimal values of activity at pH 7.5 and temperature 45 ° C. O half-life obtained at 60 ° C was 1.81 h, with a maximum speed of 267,33 U / g. For immobilized cells, the best performance of intracellular lipase was at pH 8.0 and 40 ° C, with a maximum speed of 123,24 U / g and half-life at 60 ° C for 2,23 h. After the optimum conditions of cell performance were determined, the next stage of the work consisted in hydrolysis of soybean oil using the free cells, evaluating the effects of temperature, pH, agitation and solvent use. In order to improve system productivity, the temperature parameters and ratio by weight oil / buffer were optimized through experimental design, in search of better conditions for reaction. The optimized conditions predicted by the experimental design was 37 ° C and weight ratio oil / 20% buffer to give a maximum percentage of hydrolysis of 38.6% after 3 hours of reaction using 10% m / m biocatalyst in free form in the presence of emulsifying agent. The next step explored the use of ultrasonic waves in the hydrolysis of soybean oil with significant increases in the degree of maximum hydrolysis in a time period of 9 h. The values of 77 and 96% of hydrolysis degree with and without emulsifying agent were obtained, evidencing the positive influence of the ultrasonic waves in the reaction. The chromatographic analysis of the hydrolyzate showed that the *P. citrinum* cells provided the main fatty acids present in soybean oil, predominantly C18:1 and C18:2 fatty acids. The influence of vegetable oils containing different compositions in fatty acids (olive, canola and sunflower) was also evaluated in the hydrolysis reaction, being verified the preference of the free biocatalyst in the conversion to long chain fatty acids present in sunflower oil. At the end, the performance of the immobilized biocatalyst was investigated in the hydrolysis reaction of soybean oil and showed promising results, with a maximum hydrolysis degree of 55.7% in 12 hours of reaction. The results obtained in this work demonstrate that the use of intact cells as a biocatalyst in hydrolysis reactions of vegetable oils is a promising alternative to conventional catalysis, especially in the production of polyunsaturated fatty acids, such as omega 6.

Key words: Whole cells. Lipase. Hydrolysis. Ultrasound. Soybean oil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 -	Estrutura molecular dos principais ácidos graxos dos óleos vegetais....	18
FIGURA 3.2 -	Exemplos de reações catalisadas por lipase.....	25
FIGURA 3.3 -	Esquema representativo da hidrólise de triglicerídeos.....	26
FIGURA 4.1 -	Cromatograma representativo do perfil em ácidos graxos do padrão de FAMES.....	37
FIGURA 5.1 -	Valores de (a) biomassa seca e de (b) atividade lipolítica da biomassa e do filtrado em função do tempo de cultivo.....	38
FIGURA 5.2 -	Células íntegras livres: (a) com o meio de cultivo; (b) após processo de filtração.....	39
FIGURA 5.3 -	Valores de (a) biomassa seca e de (b) atividade lipolítica da biomassa e do filtrado em função do tempo de cultivo.....	40
FIGURA 5.4 -	Processo de preparação das células íntegras imobilizadas pelo método da fermentação submersa: (a) Biomassa imobilizada nas espumas de poliuretano ainda no meio de cultivo e (b) Biomassa imobilizada nas espumas de poliuretano após a filtração.....	41
FIGURA 5.5 -	Microscopia eletrônica de varredura das células de <i>Penicillium citrinum</i> imobilizadas em espumas de poliuretano (a) 100 X (b) 500X.....	42
FIGURA 5.6 -	Influência do pH (a) e da temperatura (b) na atividade lipolítica das células de <i>P. citrinum</i>	43
FIGURA 5.7 -	Perfil de atividade residual das células íntegras livres e imobilizadas de <i>P. citrinum</i> em diferentes tempos de incubação a 60°C.....	44
FIGURA 5.8 -	Perfil de atividade lipolítica das células íntegras de <i>P. citrinum</i> em função da concentração de substrato (expresso em total de ácidos graxos contido na emulsão de azeite de oliva e água).....	46
FIGURA 5.9 -	Influência da temperatura e pH no progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> (a) T=37 °C (b) T=45 °C. Condições reacionais: emulsão a 25% com agente emulsificante, pH 7,0 e 8,0, 10% m/m biocatalisador.....	48
FIGURA 5.10 -	Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja sob agitação mecânica e em <i>shaker</i> (a) na presença de agente emulsificante (b) na ausência de agente emulsificante. Condições reacionais: emulsão a 25%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador.....	49

FIGURA 5.11 -	Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> na presença de terc-butanol e hexano. Condições reacionais: emulsão a 25%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação em <i>shaker</i> , sem agente emulsificante.....	51
FIGURA 5.12 -	Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático predito para a hidrólise enzimática do óleo de soja catalisado pelas células livres de <i>P. citrinum</i> em função da razão mássica (X_1) e temperatura (X_2).....	54
FIGURA 5.13 -	Perfil cinético da reação de hidrólise do óleo de soja catalisada pelas células livres de <i>P. citrinum</i> nas condições preditas pelo modelo matemático (razão mássica óleo/tampão 20% a 37 °C. Condições reacionais: pH 8,0, 10% m/m biocatalisador, agitação em <i>shaker</i> , com agente emulsificante.....	55
FIGURA 5.14 -	Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de <i>P. citrinum</i> em banho de ultrassom, na presença e na ausência de agente emulsificante. Condições reacionais: emulsão 20%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação mecânica.....	56
FIGURA 5.15 -	Cromatogramas gerados nas análises dos hidrolisados de óleo de soja (a) na ausência de agente emulsificante (b) na presença de agente emulsificante.....	58
FIGURA 5.16 -	Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras de <i>P. citrinum</i> imobilizadas em poliuretano. Condições reacionais: pH 7,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação em <i>shaker</i> , com agente emulsificante.....	61
FIGURA A1 -	Linearização para obtenção do k_D e $t_{1/2}$ das células livres de <i>P. citrinum</i>	75
FIGURA A2 -	Obtenção de k_M e $V_{máx}$ das células livres de <i>P. citrinum</i>	76
FIGURA B1 -	Linearização para obtenção do k_D e $t_{1/2}$ das células imobilizadas de <i>P. citrinum</i>	78
FIGURA B2 -	Obtenção de k_M e $V_{máx}$ das células imobilizadas de <i>P. citrinum</i>	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 -	Aplicações das lipases.....	24
TABELA 5.1 -	Características da lipase ligada ao micélio de <i>P. citrinum</i> livres e imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano.....	47
TABELA 5.2 -	Matriz experimental para a hidrólise do óleo de soja catalisado pelas células livres de <i>P. citrinum</i> . Condições experimentais: 50 g de substrato, 10% m/m biocatalisador, tampão fosfato pH 7,0, 170 rpm e 3 horas de reação.....	52
TABELA 5.3 -	Estimativa dos efeitos das variáveis, erros padrão e teste t de Student's t para os níveis de hidrólise do óleo de soja utilizando delineamento experimental composto rotacional.....	53
TABELA 5.4 -	Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo que representa os níveis de hidrólise do óleo de soja utilizando o delineamento experimental composto rotacional.....	54
TABELA 5.5 -	Composição dos concentrados de ácidos graxos obtidos nos hidrolisados do óleo de soja empregando a lipase de <i>P. citrinum</i>	57
TABELA 5.6 -	Composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.....	59
TABELA 5.7 -	Grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase de <i>P. citrinum</i>	59
TABELA A1 -	Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função do pH para as células íntegras livres de <i>P. citrinum</i>	74
TABELA A2 -	Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função da temperatura para as células íntegras livres de <i>P. citrinum</i>	74
TABELA A3 -	Evolução da atividade residual das células livres de <i>P. citrinum</i> em diferentes tempos incubadas a 60°C.....	74
TABELA A4 -	Evolução da atividade residual das células livres de <i>P. citrinum</i> em diferentes concentrações de ácidos graxos.....	75
TABELA B1 -	Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função do pH para a células íntegras imobilizadas de <i>P. citrinum</i>	77
TABELA B2 -	Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função da temperatura para as células íntegras imobilizadas de <i>P. citrinum</i>	77
TABELA B3 -	Evolução da atividade residual das células imobilizadas de <i>P. citrinum</i> em diferentes tempos incubadas a 60°C.....	77

TABELA B4 - Evolução da atividade residual das células imobilizadas de <i>P. citrinum</i> em diferentes concentrações de ácidos graxos.....	78
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Óleos e gorduras	15
3.1.1	<i>Ácidos graxos</i>	17
3.2	Hidrólise enzimática	18
3.2.1	<i>Fatores que influenciam o processo de hidrólise enzimática</i>	20
3.2.2	<i>Hidrólise enzimática irradiada por ultrassom</i>	21
3.3	Lipase	23
3.3.1	<i>Reações catalisadas por lipases</i>	25
3.3.1.1	<i>Hidrólise</i>	26
3.3.1.2	<i>Reações de síntese</i>	26
3.3.2	<i>Lipase fúngica ligada ao micélio</i>	27
3.4	Imobilização de células	29
4	MATERIAS E MÉTODOS	31
4.1	Materiais	31
4.2	Metodologia experimental	31
4.2.1	<i>Preparo do meio de cultura</i>	31
4.2.2	<i>Preparo das células íntegras</i>	31
4.2.3	<i>Preparo das células íntegras imobilizadas</i>	32
4.2.4	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos e bioquímicos das células íntegras</i>	32
4.2.5	<i>Hidrólise do óleo de soja</i>	32
4.2.6	<i>Separação dos produtos da hidrólise</i>	34
4.2.7	<i>Delineamento experimental</i>	34
4.3	Metodologia analítica	35
4.3.1	<i>Determinação da atividade hidrolítica</i>	35
4.3.2	<i>Determinação do teor de umidade das células íntegras</i>	35
4.3.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	36
4.3.4	<i>Determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa</i>	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Preparação das células íntegras livres	38
5.2	Imobilização das células íntegras	40
5.3	Caracterização das células íntegras livres e imobilizadas	42
5.3.1	<i>Análise morfológica das células íntegras imobilizadas</i>	42
5.3.2	<i>Determinação do pH e da temperatura ótimos de atuação da lipase</i>	43
5.3.3	<i>Estabilidade térmica</i>	44
5.3.4	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i>	45
5.4	Hidrólise do óleo de soja	47

5.4.1	<i>Influência do pH e temperatura</i>	47
5.4.2	<i>Influência do tipo de agitação</i>	49
5.4.3	<i>Influência do solvente</i>	50
5.4.4	<i>Otimização da hidrólise de óleo de soja</i>	52
5.4.5	<i>Efeito do ultrassom</i>	55
5.5	Hidrólise de diferentes óleos vegetais	58
5.6	Células imobilizadas	60
6	CONCLUSÕES	62
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	74

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o grande desafio tem sido o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos em termos ambientais, contribuindo para o desenvolvimento sustentável. Nesse sentido, a tecnologia enzimática e a biocatálise vêm sendo apontadas como rotas alternativas para a síntese de compostos de alto valor agregado com o estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo (FABER, 2011). Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, que apresentam ampla capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico (MENDES et al., 2013).

As lipases têm sido utilizadas como ferramenta tecnológica, apresentando-se como perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de mono e diacilgliceróis e ácidos graxos, representando um grupo de enzimas com grande potencial para modificação de óleos e gorduras (TREICHEL et al., 2010). Entre os processos de maior interesse industrial estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases (DE CASTRO et al., 2004).

As lipases ligadas ao micélio, especialmente as microbianas, vem despertando grande interesse de investigação pelo seu potencial de uso na biotecnologia, pois sua aplicação pode reduzir consideravelmente os custos de um processo enzimático. Diversos estudos estão sendo direcionados na utilização de células íntegras de fungos filamentosos como biocatalisadores, baseados em sua habilidade de imobilização e na evidência de proteínas funcionais de interesse na superfície celular, no caso, as lipases ligadas ao micélio que estão ligadas à membrana celular (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017). Além disso, técnicas simples de imobilização e a relativa facilidade de ampliação de escala ao se utilizar fungos filamentosos tornam as células íntegras biocatalisadores com muitas vantagens comerciais.

Em vista do grande potencial relacionado às reações de hidrólise empregando lipases como biocatalisadores, pesquisas voltadas a esta área têm relatado a aplicação crescente de métodos enzimáticos visando a obtenção de concentrados de ácidos graxos a partir de óleos de diferentes fontes. A hidrólise enzimática de óleos e gorduras constitui-se numa alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos, utilizando lipases e promovendo a reação em condições brandas de temperatura e pressão (DE CASTRO et al., 2004).

Na busca por novas técnicas que possam melhorar o rendimento de processos industriais, a tecnologia que emprega ultrassom vem se mostrando uma alternativa promissora devido aos benefícios que pode promover, como miscibilidade do substrato, e à sua

aplicabilidade em uma vasta gama de atividades (KWIATKOWSKA et al., 2011). Alguns estudos relatam que o uso de ultrassom possibilita a formação de emulsões mesmo sem a presença de substâncias surfactantes, devido à ocorrência de fenômenos no meio que promovem uma efetiva agitação e dispersão de fases em sistemas heterogêneos. Em reações enzimáticas, o uso de ultrassom tem demonstrado aumentos na atividade e estabilidade enzimática, bem como na vida útil destes biocatalisadores. (CHANDRALAPA et al., 2012; KWIATKOWSKA et al., 2011).

A inspeção da literatura revela que são escassos os relatos em âmbito nacional sobre o emprego de células íntegras como biocatalisadores nesse tipo de reação. Nesse contexto, o presente trabalho investiga a potencialidade das células íntegras do fungo filamentosso *P. citrinum* para mediar a reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo obter um biocatalisador ativo e estável a partir das células íntegras do fungo filamentososo de *P. citrinum* para mediar a reação de hidrólise do óleo de soja. Para alcançar o objetivo foram propostas as seguintes atividades:

- a) Produzir as células íntegras livres e imobilizadas em espumas de poliuretano cortadas em cubos de 6 mm de aresta;
- b) Determinar as características bioquímicas e cinéticas do biocatalisador na forma livre e imobilizado;
- c) Empregar o biocatalisador obtido na reação de hidrólise do óleo de soja e avaliar o efeito de parâmetros de processo, tais como temperatura, agitação e pH na porcentagem de hidrólise;
- d) Otimizar a porcentagem de hidrólise por meio da técnica de planejamento experimental avaliando as variáveis razão mássica óleo: tampão e temperatura;
- e) Explorar o potencial do ultrassom na reação de hidrólise do óleo de soja;
- f) Determinar e quantificar os ácidos graxos produzidos na hidrólise enzimática do óleo de soja.
- g) Empregar o biocatalisador produzido na reação de hidrólise de diferentes óleos e avaliar a especificidade da lipase do *P. citrinum*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste tópico serão abordados os principais temas relacionados com o trabalho desenvolvido, iniciando-se pela importância de óleos e gorduras e dos ácidos graxos, os mecanismos das reações de hidrólise enzimática e a utilização de enzimas como catalisadores.

3.1 Óleos e gorduras

Cerca de dois terços da produção mundial de óleos e gorduras são destinados ao consumo humano e animal, sendo o restante usado em uma ampla variedade de aplicações industriais. Recentemente, tem surgido um grande interesse na transformação biotecnológica de óleos e gorduras, visando a utilização destas matérias-primas na produção de compostos de alto valor agregado, de uso potencial em vários setores industriais (DE CASTRO et al., 2004).

Os óleos e as gorduras são substâncias hidrofóbicas cujos principais componentes são os triglicerídeos, ésteres resultantes da ligação do glicerol com ácidos graxos (AWADALLAK et al., 2013). Óleos e gorduras pertencem a classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal ou vegetal. Os lipídeos são uma classe abundante na natureza e são constituídos predominantemente por ésteres de ácidos graxos e glicerol (VOLL, 2011).

A diferenciação entre óleos e gorduras baseia-se no estado físico destes compostos a temperatura ambiente (BALCÃO; MALCATA, 2012). Os óleos caracterizam-se por sua forma líquida, ao passo que as gorduras dependem da composição, estrutura e distribuição dos ácidos graxos (AWADALLAK, 2012), principais componentes dos triglicerídeos.

O óleo vegetal é uma gordura obtida de plantas. É extraído na maioria das vezes das sementes ou grãos desses vegetais conhecidos como oleaginosos. Os óleos vegetais destinados ao consumo humano são submetidos a um processo de refino cuja finalidade é melhorar suas características por meio da remoção de alguns componentes (GAMBARRA NETO, 2008).

As gorduras têm duas funções importantes na alimentação humana: fornecer energia e transportar agentes químicos orgânicos solúveis em óleos: os ácidos graxos essenciais, as vitaminas e os hormônios óleo-solúveis (BABICZ, 2009). Os óleos têm um papel fundamental na alimentação, pois são importantes fontes de ácidos graxos essenciais, veículo para as vitaminas lipossolúveis, e participam da síntese de muitas substâncias endógenas. Contudo, seu consumo excessivo está diretamente relacionado a doenças cardiovasculares, obesidade e resistência à insulina (PHUAH et al., 2012).

Diante dos problemas relacionados ao consumo de óleos e gorduras e ao mesmo tempo a importância destes na alimentação, tem surgido um crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias de modificação dos óleos e gorduras (DE CASTRO et al., 2004). A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada, por meio de hidrogenação, que envolve a modificação química dos ácidos graxos, pela hidrólise, através da reversão da ligação éster, e interesterificação pela reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo (SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011).

Um dos primeiros passos para a obtenção de derivados químicos de gorduras e óleos vegetais é a hidrólise, que conduz a glicerol, mono e diglicerídeos e uma mistura de ácidos graxos. As transformações de óleos e gorduras são predominantemente baseadas em processos químicos convencionais. No caso da hidrólise, o processo mais utilizado é o Colgate-Emery, que opera sob temperaturas e pressões elevadas, ocasionando reações secundárias que exigem posteriores operações de separação e purificação (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação, devido ao aumento da solubilidade da água nos glicerídeos. A água é mais solúvel nos ácidos graxos do que nos glicerídeos e a solubilidade aumenta com o incremento da temperatura (MOQUIN; TEMELLI, 2008). Os principais fatores que afetam esta reação são temperatura, tipo de catalisador, teor de água no meio reacional e a concentração de glicerol liberado na fase aquosa (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2013). A reação procede em estágios, que ocorrem simultaneamente em velocidades diferentes.

A hidrólise convencional de óleos e gorduras é geralmente conduzida sob pressão da ordem de 4,83 MPa e temperatura ao redor de 250 °C por um período máximo de 2 h, obtendo-se rendimentos entre 96 a 99%. (BALCÃO; MALCATA, 2012). Os produtos resultantes são ácidos graxos extremamente escuros e uma solução aquosa rica em glicerol, que necessitam ser redistilados para remoção da cor e de subprodutos. Depois da destilação, alguns desses produtos encontram aplicação direta e outros são quimicamente processados, fornecendo uma variedade de outros produtos (ABDELMOEZ; MOSTAFA; MUSTAFA, 2013).

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras constitui-se numa alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos. Utilizando lipases e promovendo a reação em condições brandas de temperatura e pressão é possível obter produtos com baixo custo energético (BUENO, 2005; DE CASTRO et al., 2004).

3.1.1 Ácidos graxos

Os óleos vegetais são constituídos majoritariamente por triglicerídeos, que são compostos de três moléculas de ácido graxo com uma molécula de glicerol. Ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeia alifática linear formada a partir de duas unidades de carbono e as ligações duplas são inseridas por enzimas dessaturases em posições específicas em relação ao grupo carboxila (SCRIMGEOUR, 2005). Os ácidos graxos que contêm apenas ligação simples entre os carbonos são denominados ácidos graxos saturados. Os que possuem dupla ligação entre carbonos são chamados de ácidos graxos insaturados, sendo que os que apresentam mais de uma ligação dupla são conhecidos como poli-insaturados.

Ácidos graxos são encontrados na natureza na forma não associada, sendo assim conhecidos como ácidos graxos livres, ou associados formando outras classes de compostos químicos como fosfatídeos e glicerídeos (BABICZ, 2009).

Os ácidos graxos livres podem ser convertidos em uma série de produtos de alto valor agregado. Podem ser produzidos ésteres de ácidos graxos e açúcares, que apresentam larga aplicação como emulsificantes em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011). Além de seu efeito conservante, ésteres de carboidratos e ácidos graxos têm sido associados como agentes anti-tumor e inibidores do crescimento de plantas. O processo é baseado na esterificação de carboidratos (glicose, frutose, sacarose e sorbitol) com ácidos graxos (esteárico, oleico e linoleico) utilizando lipases de diferentes fontes (SOTO-VACA et al., 2013). Os ácidos graxos podem ser também, esterificados com metanol ou etanol, obtendo-se o metil ou etil-éster (biodiesel) com elevada pureza (GOMES, 2009).

Ácidos graxos essenciais são ácidos graxos poli-insaturados que desempenham importantes funções e não podem ser sintetizados pelo organismo por meio de precursores e, portanto, devem ser incluídos na alimentação (PRENTKI; MADIRGU, 2012). Os ácidos graxos essenciais para a alimentação humana são o ácido linolênico (ômega-3) que está presente em grande quantidade nos peixes (especialmente o salmão) e óleos de peixe; e o ácido linoléico (ômega-6), presente nos óleos vegetais (soja, milho, girassol) (SOTO-VACA et al., 2013).

Óleos vegetais tem sido alvo de constantes pesquisas a fim de se obter uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados devido aos efeitos que possuem sobre a saúde humana. Várias pesquisas vêm demonstrando a importância de ácidos graxos insaturados na

prevenção de doenças cardíacas (GLÜCK; ALTER, 2016) e neurológicas (SONG et al., 2015).

Nos óleos vegetais, os ácidos graxos mais comuns são o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0), entre os saturados, e oléico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), entre os insaturados.

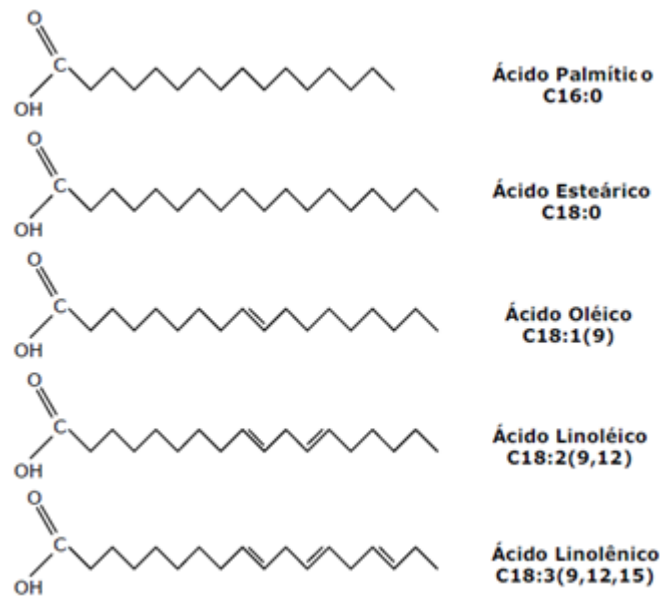


Figura 3.1 - Estrutura molecular dos principais ácidos graxos dos óleos vegetais.
Fonte: GAMBARRA NETO, 2008.

As sementes de soja são fonte de óleo de altíssima qualidade, com teor em torno de 18% no grão. O óleo se caracteriza por ser rico em ácidos graxos insaturados (aproximadamente 85% do total), mais especificamente ácido palmítico (variação entre 7 – 14%), ácido oléico (faixa de 19 – 30%), ácido linoléico (entre 44 – 62%) e ácido linolênico (entre 4 – 11%) (RINALDI et al., 2007).

3.2 Hidrólise enzimática

Em geral, a hidrólise enzimática é considerada importante na ciência, tecnologia e indústria. Hidrolases específicas, por exemplo, lipases degradam lipídeos e outros ésteres em uma grande variedade de processos industriais e científicos (PAPAMICHAEL et al., 2012). Desde há muitos anos, um conjunto de trabalhos tem sido publicado relatando que o mecanismo de hidrólise de éster, incluindo a digestão dos triglicerídeos, poderia oferecer informações importantes sobre o entendimento e controle desta reação (SALIHU et al., 2012).

Vários trabalhos relatam a eficiência das lipases microbianas com capacidade de síntese de ésteres e hidrólise. As lipases ligadas ao micélio de *M. circinelloides* são aplicadas na hidrólise de triglicerídeos e síntese de ésteres, por possuírem alta atividade catalítica e alta estabilidade em solventes orgânicos apolares (REIS et al., 2009).

Linfield et al., (1984a) estudaram a hidrólise de sebo e óleos de coco e oliva utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. A reação em emulsão foi conduzida em sistemas de frascos agitados, obtendo-se altos valores de conversão de 97 a 99% em 72 horas de reação.

Ghosh e Bhattacharyya (1995) estudaram a hidrólise enzimática de óleos comerciais com alta acidez, como de coco, mostarda, girassol e arroz. Acilgliceróis neutros de óleos de alta acidez foram quase completamente hidrolisados por lipase de *Candida cylindracea* em 48 horas de reação. O óleo de coco, com acidez inicial de 69,2% em ácido láurico, foi hidrolisado à temperatura de 35 °C por 48 horas, atingindo acidez final de 80%.

Fu et al. (1995) estudaram a hidrólise do óleo de oliva, óleo de soja, óleo de palma, óleo de coco e óleos hidrogenados com lipase de *Aspergillus* sp. Todos os substratos analisados puderam ser hidrolisados aos ácidos graxos correspondentes pela enzima, com rendimento de 90 a 99%, em tempo de reação de 2 à 24 horas.

Gomes (2009) realizou a hidro-esterificação de óleo residual da indústria pesqueira. Na etapa de hidrólise, ácidos graxos livres foram obtidos por duas vias: hidrólise química e hidrólise enzimática. Na hidrólise química, o óleo residual de indústria pesqueira foi adicionado ao reator a 300 °C e 500 rpm por 1 hora. A hidrólise enzimática foi realizada pela enzima de *Penicillium simplicissimum* durante 48 horas, a 45 °C. Após 1 hora a 300 °C, a hidrólise química resultou em 93% de conversão em ácidos graxos e após 48 horas a 45 °C, a hidrólise enzimática resultou em 81% de conversão.

Rodrigues e Ayub (2011) estudaram a hidrólise de óleo de soja com mistura de enzimas comerciais de *T. lanuginosus* (TLL, Lipolase 100L, imobilizada em Lewatit® VP OC 1600) e *R. miehei* (RML, Lipozyme RM IM) em agitador rotativo, a 30 °C por 10 horas. Na condição ótima (razão molar água: óleo 3:1, 25% de enzima sobre a massa de óleo, razão mássica TLL/RML de 65%) foram obtidos 95% de conversão.

Do ponto de vista comercial, a reação de hidrólise de óleos e gorduras catalisada por lipase é aparentemente menos econômica que a técnica convencional. Entretanto, considerando a possibilidade da obtenção de produtos específicos de alto valor agregado a partir da hidrólise de óleos vegetais por lipases, este tipo de processo pode tornar-se viável economicamente (BEUVE; MORISON, 2010).

A hidrólise enzimática pode ser realizada em condições amenas (20 a 40 °C e pressão atmosférica), reduzindo o gasto energético em comparação aos processos físico-químicos (ABDELMOEZ; MOSTAFA; MUSTAFA, 2013). Nesta técnica, uma solução aquosa de lipase entra em contato com o óleo, formando uma dispersão líquido-líquido. O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior será a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de hidrólise mais elevadas (YAN et al., 2011).

A literatura aponta que, em condições de pressão atmosférica e temperaturas mais amenas, a hidrólise enzimática é bastante lenta e, em muitos casos, atinge baixas conversões mesmo em longos tempos de reação (PAPAMICHAEL et al., 2012). Frente a isso, surge a necessidade de se estudar novas tecnologias para a otimização de reações de hidrólise enzimática de óleos vegetais (FEITEN et al., 2014).

3.2.1 Fatores que influenciam o processo de hidrólise enzimática

Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de óleos e gorduras usando lipases como catalisadores.

- a) Temperatura:** o aumento da temperatura e o conseqüente aumento da taxa de reação estão correlacionados a ativação das moléculas de substrato. Em temperaturas mais altas, as moléculas de substrato adquirem maior energia de ativação para superar o estado transiente da reação de hidrólise parcial, e o número de colisões entre as moléculas de enzima e óleo aumentam a taxa de hidrólise (WANG et al., 2010).
- b) pH:** enzimas são biocatalisadores que apresentam pH ótimo de atuação, na maioria dos casos, próximo a neutralidade. Além de influenciar a estrutura enzimática, o pH impacta na atividade enzimática podendo alterar a conformação do sítio ativo da enzima (DONG; WANG; ZHENG, 2010). Por envolver a medida de cargas elétricas, o pH também pode afetar a estabilidade da interface óleo/água, ocasionando maior exposição do substrato, favorecendo assim, a adesão ao sítio ativo da enzima (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2013).
- c) Concentração da enzima:** a taxa inicial da reação enzimática aumenta proporcionalmente com a adição da enzima até a saturação do substrato. Alcançado

esse estágio, qualquer adição de enzima torna-se inócua em relação ao aumento da taxa de conversão (RATHUD; PANDIT, 2009).

- d) Razão molar de substrato:** a razão molar para reações de hidrólise se dá pelas quantidades de óleo e água. A água desempenha importante função na enzima ao manter sua conformação nativa. Um leve acréscimo na quantidade de água em uma reação de hidrólise acarreta aumento da atividade devido a melhor conformação enzimática e a maior área de interface (FARIA, 2010). Porém, a partir de uma quantidade máxima, pode ocorrer inibição da atividade enzimática pelo alto teor de água (MOQUIN; TEMELLI, 2008). Altas concentrações de óleo ocasiona o fenômeno de coalescência, reduzindo a área interfacial, desfavorecendo a reação de hidrólise. Agitação, emulsificantes e alguns sais vêm sendo empregados para evitar o agrupamento de partículas de óleo (MENDES et al., 2013).

3.2.2 Hidrólise enzimática irradiada por ultrassom

Uma das principais limitações da hidrólise enzimática de óleos e gorduras é a imiscibilidade dos substratos, que conduzem a uma baixa transferência de massa e por consequência, uma baixa taxa de reação (ZHONG et al., 2010). O ultrassom tem se mostrado uma excelente ferramenta no auxílio aos processos enzimáticos e biológicos, atuando no controle de agregação e dispersão de partículas (LONING, HORST, HOFFMANN, 2002), além de gerar um aumento na estabilidade e atividade catalítica e aumento da vida útil dos biocatalisadores (BATISTELLA et al., 2012).

A irradiação por ultrassom pode ser um método alternativo para reduzir as limitações de transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas (BABICZ, 2009). O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (LERIN et al., 2014).

Um dos fatores limitantes mais comuns para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente (LERIN et al., 2014).

Outro fator a ser considerado é o solvente que está sendo utilizado na reação. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, visto que ocorre um aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona

como um mecanismo de proteção, permitindo que as moléculas de água que encontram-se em torno da enzima não sejam facilmente movidas pelo ultrassom (MARTINEZ; DAVOLOS; JAFELICCI, 2000). Além disso, um solvente mais volátil aumenta o efeito cavitacional, podendo favorecer a reação, já que o ultrassom em baixas intensidades aumenta o movimento do meio, favorecendo o fluxo de reagentes para o sítio ativo da enzima (BABICZ et al., 2010).

Quando ondas de ultrassom são propagadas através de um meio líquido, ocorre a interação entre as ondas ultrassônicas, o líquido e o gás dissolvido, acontecendo o fenômeno conhecido como cavitação acústica (CHANDRAPALA et al., 2012). Nas reações assistidas por irradiação ultrassônica, as cavitações (formação, aumento e implosão de bolhas no meio da reação) geradas pelo ultrassom, aumentam a miscibilidade entre os reagentes, aumentando a transferência de massa entre as duas fases através do fornecimento de aquecimento e de mistura (VELJKOVIC et al., 2012).

A cavitação provoca um aumento localizado de temperatura na fronteira das fases e fornece a energia mecânica para a mistura e a energia de ativação necessária para iniciar a reação. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que ciclos periódicos de oscilação de pressão (compressão e expansão) causam aumento do tamanho das bolhas, que ao atingirem um tamanho crítico implodem-se, liberando grande quantidade de energia em pontos localizados no líquido (YU et al., 2010). O colapso das bolhas de cavitação rompe a fronteira de fase e promove a emulsificação por jatos ultrassônicos. Estes efeitos proporcionam o aumento das taxas de reação e a obtenção de elevados rendimentos (THANK et al., 2010) com pouca quantidade de catalisador e menor consumo energia, quando comparado ao processo com agitação mecânica (CHAND et al., 2010).

Existem duas configurações de equipamentos de ultrassom: o banho de ultrassom e a ponteira ultrassônica. Nestes, a fonte de energia ultrassônica é um transdutor piezoelétrico, que é constituído por cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais e o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (BARBOZA; SERRA, 1992).

O uso da tecnologia do ultrassom se destaca como uma alternativa aos métodos convencionais, apresentando efeitos benéficos em reações catalisadas por enzimas como reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Nos últimos anos têm sido relatados estudos na área, como o de Liu et al. (2008), que estudaram o efeito do ultrassom na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando lipase de *Candida lipolytica*. Os

autores relataram que, comparando com a reação conduzida em *shaker*, as taxas de reação aumentaram em 94% para a reação realizada em 1 hora, 64% na reação de 2 horas, 58% na reação de 3 horas, 41% na reação em 4 horas e de 34% na reação de 5 horas. A taxa de reação em 5 horas em banho ultrassônico foi 2,3 vezes maior que a obtida em 12 horas de reação em *shaker*.

Babicz et al. (2010) avaliaram a hidrólise enzimática em banho de ultrassom, utilizando diferentes lipases. Os autores relataram que, com frequência de 47 kHz e potência de 12 W, utilizando 1% de enzima, a produção de diacilgliceróis foi de 40% com Lipozyme TL IM, 41% com Lipozyme RM IM e de 32% utilizando Novozym 435. Os experimentos foram conduzidos em pressão atmosférica, temperatura de 55 °C e taxa de agitação de 700 rpm, por 1 hora e 30 minutos.

3.3 Lipase

Lipases (glicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) fazem parte de um grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra e ligações ésteres, promovendo a liberação de ácidos graxos e glicerol (ARAÚJO et al., 2016). Sua principal função é catalisar a hidrólise de triglicerídeos em uma interface óleo-água, porém, em condições que há pouca disponibilidade de água no meio, as lipases tornam-se capazes de catalisar com alta especificidade, estabilidade e condições reacionais brandas, reações reversas como esterificação e transesterificação (ANABOM et al., 2014).

As lipases apresentam massa molecular variando entre 19 a 75 kDa e, normalmente, são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. Sua atividade ótima ocorre em temperaturas entre 30 e 40 °C, podendo variar dependendo de sua origem (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017).

As lipases são encontradas na natureza em tecidos animais e vegetais e em micro-organismos. As lipases provenientes de micro-organismos são as mais utilizadas industrialmente por serem mais estáveis e apresentarem propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (KAMINI et al., 2014).

O modo de ação das lipases é bastante complexo. Todas as lipases são constituídas por folhas β e α -hélice e um sítio ativo formado por uma tríade catalítica composta por Serina-Histina-Aspartato/Glutamato (ERICSSON et al., 2008; SECUNDO et al., 2006; YAN et al., 2011). Muitas delas apresentam uma estrutura hidrofóbica α helicoidal que encobre o sítio ativo, denominada tampa ou “lid”, que bloqueia a entrada do substrato até o sítio ativo.

Quando em contato com o substrato em uma interface lipídio/água, tem sua conformação alterada, movendo-se e expondo o sítio catalítico e ao mesmo tempo uma superfície hidrofóbica, aumentando a afinidade da enzima pelo substrato, facilitando a ligação da lipase à interface (GUPTA, 2016; PALOMO et al., 2006; YAN et al., 2011).

Devido ao seu grande potencial biotecnológico, sua versatilidade e por catalisarem muitas reações em diversos substratos quando comparada às outras hidrolases, as lipases são as enzimas preferenciais para aplicações em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil, de couro, cosméticos, papel e detergentes (SANTOS, 2012; SOARES, 2012).

As lipases têm sido utilizadas na formulação de detergentes; no tratamento de efluentes, na indústria oleoquímica; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (ANABOM et al., 2014).

Tabela 3.1 - Aplicações das lipases.

Setor	Área	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício	Laticínio	Hidrólise de gordura do leite	Agente aromatizante para produtos lácteos
	Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação por remoção dos lipídeos	Bebidas Alcoólicas (vinhos e outras)
	Processamento de derivados do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídeos	Maionese, molhos e cremes.
	Processamento de óleos e gorduras	Transesterificação de óleos naturais; hidrólise de óleos (ácidos graxos)	Óleos e gorduras modificadas (substitutos da manteiga de cacau)
Químico	Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
	Detergentes	Remoção de manchas de óleos e gorduras	Gorduras
	Farmacêuticos	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
	Analítico	Análise de triglicerol no sangue	Diagnostico
	Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
	Curtume	Remoção de gorduras das peles de animais	Produtos de couro

Fonte: Adaptado de SANTOS, 2012.

As lipases são classificadas como enzimas intracelulares e extracelulares. No caso de lipases extracelulares, a enzima irá ser recuperada a partir do caldo de cultura e, em seguida,

purificada, ao passo que a lipase intracelular permanece no interior da célula ou nas paredes celulares produtoras (AARTHY et al., 2014).

3.3.1 Reações catalisadas por lipases

Dependendo do sistema reacional (aquoso ou solvente orgânico), as lipases são capazes de catalisar além da hidrólise, reações de síntese, como esterificação e alcoólise.

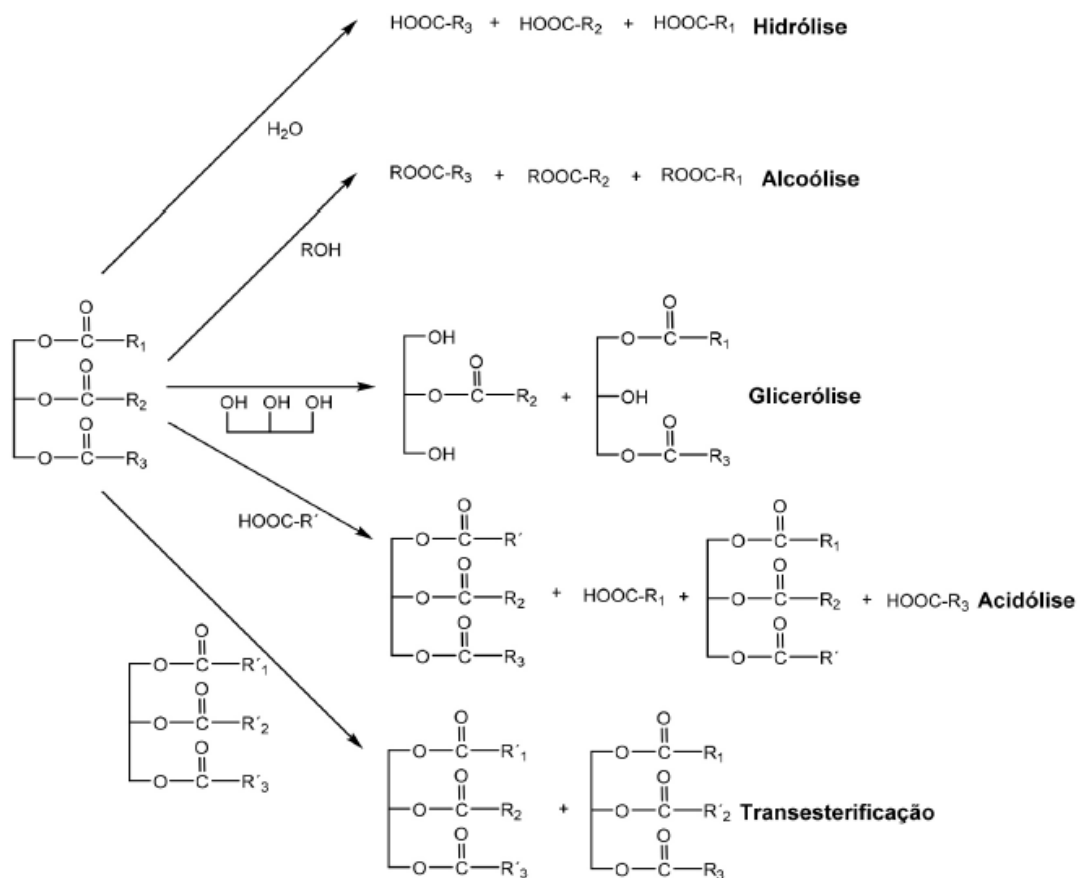


Figura 3.2 - Exemplos de reações catalisadas por lipase.
 Fonte: CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017.

As lipases são ferramentas poderosas nas reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, interesterificação e lactonização, em solventes orgânicos.

A utilização de lipases como catalisadores tem sido investigada na resolução de misturas racêmicas, na síntese de fármacos, na formulação de detergentes e síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica (bioconversão de óleos e gorduras), na indústria agroquímica, na manufatura do papel e na nutrição (GUPTA, 2016).

3.3.1.1 Hidrólise

Triglicerídeos na presença de água e catalisador sofrem hidrólises reversíveis, liberando glicerol e ácidos graxos. A reação procede em estágios, que ocorrem simultaneamente em velocidades diferentes. Nas reações de hidrólise química ou enzimática, os triglicerídeos são convertidos para diglicerídeos e monoglicerídeos e estes em glicerol e ácidos graxos (SHARMA; CHAURASIA; DALAI, 2013).

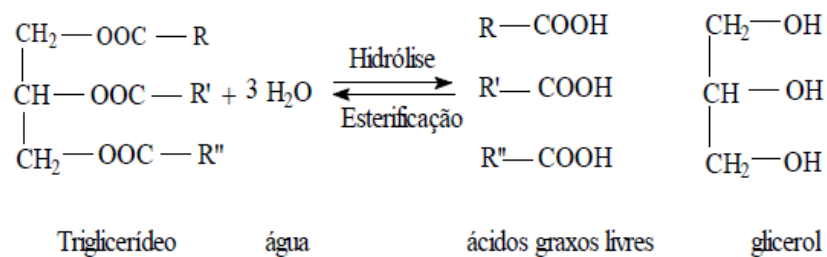


Figura 3.3 - Esquema representativo da hidrólise de triglicerídeos.
Fonte: MOQUIN; TEMELLI, 2008.

Nesse sentido, as lipases atuam na formulação de detergentes e cosméticos, na modificação de gorduras do leite, na produção de ácidos graxos poli-insaturados a partir da hidrólise de óleos, no processamento de couro e peles para remover gorduras residuais e na recuperação de efluentes contaminados com óleos e gorduras (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; HOU e SHIMADA, 2009; MOHAMED et al., 2011).

3.3.1.2 Reações de síntese

As lipases que catalisam as reações de síntese (trans ou esterificação) podem apresentar especificidade pelos alcoóis com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, que variam desde o metanol (C1) até o dodecanol (C12), embora outros fatores, como a temperatura, o tipo de solvente, outros componentes do meio reacional e a estrutura e dinâmica molecular das lipases, possam interferir nessas seletividades (BEZBRADICA et al., 2006).

Salah et al. (2007) estudaram a síntese de acetato de butila (aroma de abacaxi), mediada pela lipase de *Rhizopus oryzae*, e avaliaram diversas condições na reação de

esterificação, alcançando um rendimento de 80% ao utilizar a lipase imobilizada e o heptano como solvente. Além disso, Liu, Holland e Crow (2004) reportaram que algumas lipases microbianas, como as de *Candida cylindracea*, *Candida deformans* e *Aeromonas hydrophila* podem catalisar a síntese de ésteres que dão sabor a produtos lácteos, por esterificação e/ou alcoólise em sistemas com baixa atividade de água.

Os ésteres alquílicos de ácidos graxos, conhecidos como biodiesel, também são produtos de reações de síntese catalisadas por lipases e comumente, a reação responsável pela sua produção é a transesterificação. A transesterificação consiste em uma série de reações consecutivas e reversíveis. A primeira etapa é a conversão dos triglicerídeos em diglicerídeos, seguido da conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos, e os monoglicerídeos em glicerol, gerando uma molécula de metil ou etil-éster (SHAHID; JAMAL, 2011).

3.3.2 Lipase fúngica ligada ao micélio

Lipases ligadas ao micélio vêm sendo cada vez mais estudadas visando identificar o potencial de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, para utilização como biocatalisador (células íntegras) baseado na sua habilidade de imobilização e de exposição das proteínas funcionais de interesse na superfície de sua célula (FUKUDA; KONDO; NODA, 2009). Como biocatalisadores, as lipases apresentam características como especificidade, regiosseletividade e enantiosseletividade, que os catalisadores químicos não possuem, além de permitirem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos (COLLA et al., 2016).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como as melhores fontes de lipases, sendo que um grande número desses micro-organismos tem sido estudado do ponto de vista genético e bioquímico (COLEN, 2006). Entretanto, somente as enzimas de poucas espécies tem demonstrado possuir estabilidade adequada e capacidade satisfatória de biocatálise para serem empregadas em reações de síntese (MESSIAS et al., 2011).

Quando provenientes de fungos filamentosos, as lipases ligadas ao micélio apresentam alta atividade lipolítica. Lipases fúngicas ligadas ao micélio tem tido destaque, em especial quando provenientes de fungos dos gêneros *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que são citados como bons produtores de lipases (IFTIKHAR et al., 2008). Ainda são poucas as espécies estudadas e por isso, pouco utilizadas industrialmente.

Vários trabalhos relatam a eficiência das lipases microbianas com capacidade de síntese de ésteres e hidrólise, como aquelas obtidas a partir de *Penicillium citrinum* (MIRANDA et al., 1999), *Aspergillus niger* (MUHADIK et al., 2002) *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et. al, 2009), *Penicillium sp.* (RIGO et. al, 2010) e *Rhizopus chinensis* (SUN e XU, 2008).

O fungo filamentoso *P. citrinum* ocorre normalmente com distribuição mundial. Foi isolado a partir de uma variedade de fontes, incluindo solos, vegetação em decomposição e gêneros alimentícios. É descrito como fungo endofítico, ou seja, que coloniza raiz de plantas e cereais de plantas como trigo e óleo de soja e também causa o bolor no pão (SAMSON; FRISVAD, 2004).

Pode ser encontrado em diferentes condições ambientais, forma colônias planas ou radialmente sulcadas, velutinosa, com micélio branco e canédeas esferoidais abundantes de coloração verde. É uma espécie mesofílica, com temperatura ótima de crescimento que varia de 26-30 °C (PITT; HOCKING, 2009).

Entretanto, a viabilidade econômica do processo de utilização de lipases microbianas, encontra-se na imobilização dessas células íntegras em um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao micro-organismo (FUKUDA; KONDO; NODA, 2009). O método de preparo das células íntegras imobilizadas é feito por meio de cultivo, em que as enzimas permanecem aderidas no interior das células. A imobilização no suporte poroso ocorre como consequência natural do seu crescimento e podem ser facilmente separadas do meio de cultivo (ANDRADE et al., 2012). A estrutura celular age como uma matriz natural capaz de proteger as enzimas da ação de possíveis efeitos de agentes externos, promovendo um efeito análogo ao empregado por matrizes comuns utilizadas na imobilização de enzimas (ROMERO; BAIGORI; PERA, 2007).

A produção de lipase ligada ao micélio e sua retenção na membrana é um fator crucial para o desenvolvimento de biocatalisadores de células íntegras imobilizadas e com alta atividade em reações de etanolise. Hama et al., (2006) imobilizaram as células de *R. oryzae* em partículas de poliuretano com o intuito de investigar os fatores que levaram a produção de lipase ligada ao micélio. Os autores verificaram que a imobilização contribuiu para a produção de enzima ligada ao micélio, de modo que grandes quantidades de lipase ficaram retidas no interior das células. Os autores também verificaram que a adição de óleo de oliva auxilia na retenção da lipase nas células, o que contribui para a inibição da secreção de lipase para o meio, sugerindo que esse efeito de retenção de lipase na membrana causa um aumento da atividade da lipase ligada ao micélio.

3.4 Imobilização de células

A imobilização de células pode ser definida como um confinamento físico das células em uma região definida, sejam encapsuladas em glóbulos ou aprisionadas em um suporte sólido, mantendo sua atividade catalítica em processos de operação contínuos e descontínuos (COVIZZI et al., 2007). A imobilização de células representa uma forma particular de adesão celular baseada na habilidade de certos micro-organismos se fixarem em suportes sólidos por meio de ligações naturais físico-químicas (GUPTA, 2016).

As principais técnicas de imobilização normalmente aplicadas em processos de biotransformação são baseadas na adsorção em suportes inertes, na encapsulação e aprisionamento em matrizes poliméricas ou ligação covalente, cruzada e iônica em suportes previamente ativados (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2017).

Segundo Canilha, Carvalho e Silva (2006), as principais vantagens propiciadas pela imobilização celular são o reaproveitamento do material biológico, principalmente quando os suportes escolhidos são inertes e com alta resistência mecânica, aumento da estabilidade e o uso em processo contínuo.

O uso de células imobilizadas apresenta algumas desvantagens. O processo de imobilização pode não ser econômico e as limitações de transferência de massa podem afetar a fisiologia e cinética do crescimento celular. Além disso, a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e produção de gases, devido às limitações na transferência de oxigênio (WANG et al., 2005).

A escolha de uma matriz adequada para a imobilização é um fator de relevância para a obtenção do produto desejado, sendo que para cada micro-organismo e metabólito, faz-se necessário uma análise distinta (SILVA et al., 2006). O tamanho do poro, a porosidade e o grau de hidrofobicidade da matriz interferem na intensidade da adesão celular (COVIZZI et al., 2007).

Não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal adequado a qualquer processo. A escolha do tipo de suporte dependerá das características peculiares do material biológico e das condições de uso do sistema imobilizado (KILONZO; MARGARITIS; BERGOUGBOU, 2011).

Diversos materiais podem ser utilizados como suporte para a imobilização de células. Para a imobilização celular de fungos filamentosos utilizam-se suportes porosos, já que ocorre a adesão das células microbianas na superfície do suporte. Quando os poros são maiores, as

células em crescimento penetram no suporte, preenchendo seu espaço interno (COVIZZI et al., 2007).

O método de imobilização em suportes é utilizado devido sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes. Para a escolha de um suporte, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas (MENDES, 2009).

Dentre os suportes porosos, as espumas de poliuretano e a bucha vegetal têm adquirido grande relevância como suportes de imobilização, pois oferecem suporte biológico e oxigenação ideal para o crescimento de micro-organismos (JIN et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Espumas de poliuretano têm sido utilizadas como suporte de imobilização, face ao crescimento do número de aplicações reportado na literatura, como remoção de componentes orgânicos (MOE; IRVINE, 2001), fermentação do ácido acético (De ORY; ROMERO; CANTERO, 2004) e reações de transesterificação (BAN et al., 2001; JIN et al., 2009). Seu uso tem se destacado devido suas características: grande área superficial com interstícios para o crescimento celular, porosidade uniforme garantindo a troca gasosa, boa estabilidade mecânica, química, térmica e biológica, resistência à degradação enzimática, além de proporcionarem fácil imobilização, baixo custo comercial e uso viável para escala industrial (SOARES, 2012).

As espumas de poliuretano apresentam porosidade e leveza adequadas para o crescimento de fungos filamentosos, além de oferecer suporte biológico para o crescimento, sendo, dessa forma, muito utilizado na imobilização das células desses micro-organismos (SOARES, 2012).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Utilizou-se o fungo filamentosso *Penicillium citrinum* URM 4216 adquirido da UFPE. O fungo foi conservado sob refrigeração em meio BDA (Batata Dextrose Agar – Difco), preparado conforme recomendação do fornecedor, sendo repicado a cada dois meses. O repique foi feito em tubos de ensaio contendo o meio BDA inclinado, com a ajuda de uma alça metálica. Após o repique, os tubos de ensaio contendo os esporos foram incubados em estufa a 30°C durante 7 dias e em seguida estocados sob refrigeração. Como suporte de imobilização foi utilizado espuma de poliuretano (cubos 6x6 mm³ – Esfrebon®). Nas reações de hidrólise foi empregado óleo de soja comercial refinado (Soya). Os demais reagentes empregados foram de grau analítico, tais como: óleo de oliva de baixa acidez (Carbonell), goma arábica em pó pura (Synth), hidróxido de potássio (KOH) (Synth), ácido nítrico (HNO₃), soluções tampão fosfato em pH 7,0.

4.2 Metodologia experimental

4.2.1 Preparo do meio de cultura

Os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido composto por óleo de oliva (comercial) 30g/L, peptona (Himedia) 70g/L, NaNO₃ (Vetec) 1g/L, KH₂PO₄ (Synth) 1g/L e MgSO₄.7H₂O (Vetec) 0,5g/L, previamente autoclavados (121°C/15 min). Óleo de oliva (comercial) 30g/L foi transferido assepticamente ao meio autoclavado.

4.2.2 Preparo das células íntegras

As células íntegras foram preparadas utilizando a técnica de fermentação submersa, realizada em Erlenmeyers de 250 mL. Para preparo do inóculo, os esporos foram raspados e suspensos em água estéril. Um volume contendo cerca de 1x10⁶ esporos de fungo foi inoculado em cada Erlenmeyer, contendo 100 mL de meio de cultura, os quais foram incubados por até 120 h a 30°C sob agitação orbital em *shaker* (170 rpm). A biomassa foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e seca em dessecador.

4.2.3 Preparo das células íntegras imobilizadas

Em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura foram adicionados 100 cubos de espumas de poliuretano e após esterilização procedeu-se o processo de inoculação (conforme descrito no item 4.2.2). A biomassa imobilizada foi separada do meio de cultura por filtração a vácuo, lavada com água e seca em dessecador, contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo.

4.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos e bioquímicos das células íntegras

A atividade enzimática do biocatalisador foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme descrito por Andrade et al. (2014). Os valores de pH e temperatura ótimos foram avaliados e os parâmetros cinéticos (constante de Michaelis-Menten; K_m e velocidade máxima de reação, V_{max}) determinados com o auxílio do programa Origin Pro versão 8.0 e linearização de Lineaweaver-Burk, a partir da curva de concentração substrato *versus* atividade. A estabilidade térmica foi avaliada por meio de tratamento térmico do biocatalisador a 60 °C por um período máximo de 150 min, com retiradas periódicas a cada 30 min. para quantificação da atividade residual e cálculo da constante de inativação térmica (k_D) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

4.2.5 Hidrólise do óleo de soja

a) Sob agitação em shaker

A reação de hidrólise enzimática do óleo de soja foi realizada com base no trabalho descrito por Freitas et al. (2007). Em Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 g do substrato (óleo de soja em tampão fosfato de sódio 0,1M) contendo agente emulsificante goma arábica a 2,5% m/v. Após a adição de 10% m/m de biocatalisador, os Erlenmeyers foram incubados sob temperatura controlada a 170 rpm de agitação por um período máximo de 24h.

b) Sob agitação em shaker com solventes

Em Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 g do substrato (25% de óleo de soja em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0) contendo 50 g de solvente (hexano ou terc-

butanol). Após a adição de 10% m/m de biocatalisador, os Erlenmeyers foram incubados sob 37°C a 170 rpm de agitação por um período máximo de 9h.

c) *Sob agitação mecânica*

Em Bequer de 250 mL foram adicionados 50 g do substrato (25% do óleo de soja em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0) com e sem agente emulsificante goma arábica a 2,5% m/v. Após a adição de 10% m/m de biocatalisador, os Béqueres foram imersos em banho de glicerina a 37 °C acoplado ao agitador mecânico (Fisatom) com rotação de 800-1000 rpm por um período máximo de 9h.

d) *Sob agitação mecânica acoplado ao banho de ultrassom*

Em Bequer de 250 mL foram adicionados 50 g do substrato (20% do óleo de soja em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0) com e sem agente emulsificante goma arábica a 2,5% m/v. Após a adição de 10% m/m de biocatalisador, os Béqueres foram imersos em banho ultrassônico Soniclean mantendo a frequência a 40 kHz em uma potência de 132W e temperatura de 37 °C acoplado ao agitador mecânico (Fisatom) com rotação de 1000 rpm por um período máximo de 9h.

Em todos os casos, periodicamente foram retiradas amostras de 0,6 g do meio reacional e o teor de ácido graxo quantificado por titulação com KOH 0,02 M. A conversão foi calculada pela determinação da concentração de ácidos graxos formados durante a hidrólise dos triglicerídeos presentes no substrato, de acordo com a equação 4.1 (Freitas *et al.*, 2007).

$$\% \text{ Hidrólise} = \frac{(V_a - V_b) * N * 10^{-3} * M}{m * f} * 100 \quad (4.1)$$

Em que:

V_a = volume de KOH da amostra (mL);

V_b = volume de KOH do controle (mL);

N = normalidade do KOH;

M = massa molecular média dos ácidos graxos no óleo de soja (g/mol);

m = massa da amostra (g);

f = fração de óleo usada.

4.2.6 Separação dos produtos da hidrólise

A reação de hidrólise foi finalizada adicionando-se ao reator, uma mistura de 90 mL de clorofórmio e 25 mL de ácido acético glacial, com homogeneização por 10 min, sob agitação. Em seguida, o conteúdo do reator foi transferido para uma proveta de 500 mL e o volume completado com água destilada. Posteriormente, o conteúdo da proveta foi transferido para um funil de separação e deixado em repouso para a separação das fases (AOAC, 2003).

A fase clorofórmica, contendo os ácidos graxos livres foi metilada e identificados por cromatografia em fase gasosa. A metilação foi realizada de acordo com a metodologia ISO 12966-2 (2011). Foram pesados aproximadamente 50 mg do triglicerídeos purificado em um vial de 20 mL. Adicionaram-se 2 mL de uma solução metanólica de hidróxido de sódio (0,2 M) e aqueceu-se (80°C/15min), sob agitação vigorosa. Em seguida, a amostra foi resfriada e adicionaram-se 2 mL de uma solução metanólica de ácido sulfúrico (1 M). A amostra foi aquecida (80°C/15min) sob agitação vigorosa e posteriormente resfriada. Em seguida adicionou-se 1 mL de uma solução saturada de NaCl e 2 mL de hexano. A mistura foi agitada vigorosamente em vortex (30 segundos), sendo mantida em repouso para separação de fases. A fase superior (orgânica) foi transferida para outro vial de 20 mL, e o processo de extração com hexano foi repetido por duas vezes. O hexano foi evaporado a 50 °C em chapa de aquecimento e o triglicerídeo metilado foi armazenado a baixa temperatura (6°C) para posterior análise em ácidos graxos.

4.2.7 Delineamento experimental

A influência das variáveis razão mássica óleo/tampão e temperatura na reação de hidrólise do óleo de soja sob agitação em *shaker*, foi investigada empregando o planejamento experimental composto central 2² obtendo como variável resposta a porcentagem de hidrólise alcançada em 3 horas de reação. Os ensaios foram conduzidos de forma randômica, sendo realizados três replicatas no ponto central, para estimar o erro experimental. Os resultados foram analisados empregando o programa Statistica versão 7.0. A significância estatística da regressão individual dos coeficientes e o modelo matemático foram determinados pelo teste

de *Fischer* e a análise de variância explicada pelo modelo obtido, foi dada pelo coeficiente de determinação (R^2).

4.3 Metodologia analítica

4.3.1 Determinação da atividade hidrolítica

A atividade enzimática das células livres e imobilizadas foi determinada pelo método de hidrólise, conforme metodologia modificada por Andrade et al. (2014). O substrato foi preparado pela emulsão de 10 mL de azeite de oliva e 90 mL de goma arábica a 3% (m/v). Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 mL de substrato, 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) e 0,5 g de células imobilizadas (massa seca) ou 1,0 ml do caldo fermentado. Os frascos foram incubados a 37°C por 5 minutos, em banho termostaticado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de etanol e água destilada (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,025 M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os cálculos foram realizados pela Equação 4.2, sendo uma unidade de atividade definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades são expressas em µmols/g.min (U/g).

$$\text{Atividade} \left(\frac{\mu.mol}{g.min} \right) = \frac{(V_A - V_B).M.10^3}{t.m} \quad (4.2)$$

Em que: V_A = volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B volume do KOH gasto na titulação do branco (mL); M = molaridade da solução de KOH (M); t = tempo de reação (min); m = massa (g).

4.3.2 Determinação do teor de umidade das células íntegras

O teor de umidade das células íntegras após a etapa de filtração foi determinado a partir da Equação 4.3, para ser utilizado na determinação da atividade lipolítica:

$$\text{Umidade}(\%) = \frac{(M_{\text{úmida}} - M_{\text{seca}})}{M_{\text{úmida}}} * 100 \quad (4.3)$$

Em que *Múmida* é a massa de micélio obtida após filtração a vácuo (g) e a *Mseca* é a massa de micélio obtida após secagem em estufa a 105°C por 24h (g), até atingir massa constante.

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das células imobilizadas foi realizada por microscopia de varredura eletrônica (MEV) utilizando microscópio eletrônico LEO 440i Oxford (Cambridge, Inglaterra) com ampliação de 100 vezes.

4.3.4 Determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os ácidos graxos liberados na hidrólise foram analisados por cromatografia em fase gasosa. As amostras submetidas a análise cromatográfica foram previamente metiladas, conforme descrito no item 4.2.7 e os ésteres metílicos identificados por cromatografia em fase gasosa (PerkinElmer) utilizando-se injetor Split, detector de ionização por chama (FID) e coluna Supelcowax (L × I.D. 30 m × 0.32 mm, d_f 0.50 μ m). A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, sendo o modo de injeção split (1:10), utilizando-se nitrogênio na vazão de 0,5 mL/min., como gás de arraste. A rampa de aquecimento do forno foi estabelecida da seguinte forma: temperatura inicial de 60°C até 210°C à uma taxa de aquecimento de 20°C/min; a temperatura de 210°C foi mantida por 7 min., e uma taxa de aquecimento 20°C/min., foi empregada para que fosse atingida a temperatura final de 250 °C, sendo esta mantida por 25 minutos. A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com padrões FAME e a quantificação foi realizada por normalização de áreas calculadas pelo software Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O cromatograma representativo do perfil em ácidos graxos do padrão de FAMEs é apresentado na Figura 4.1.

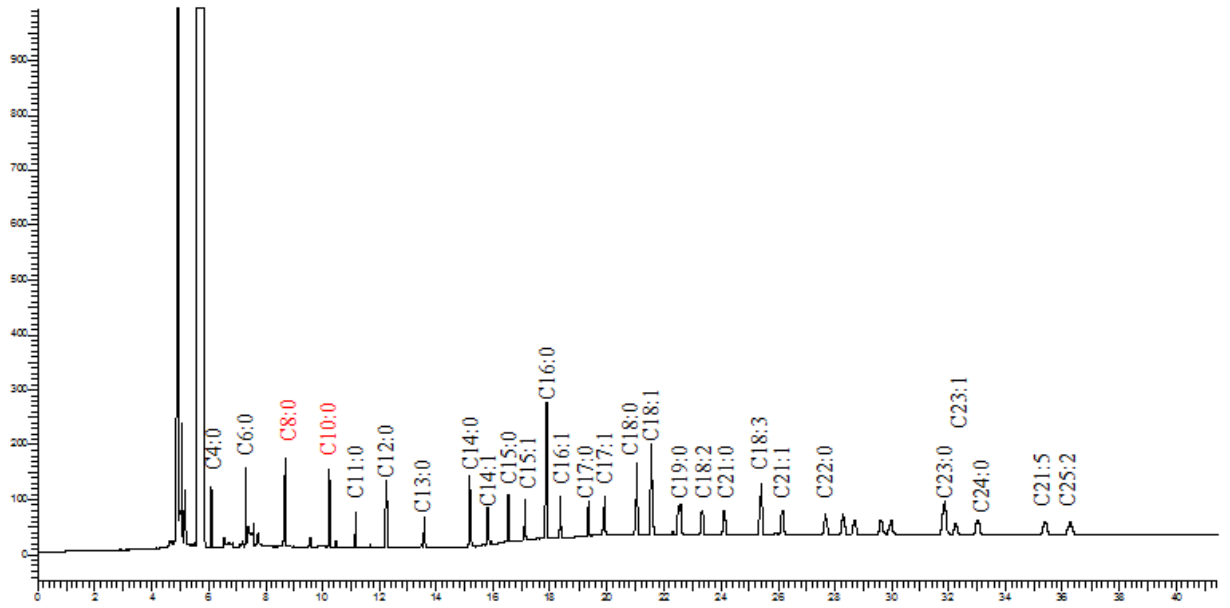


Figura 4.1 - Cromatograma representativo do perfil em ácidos graxos do padrão de FAMES.
Fonte: do autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação das células íntegras livres

A etapa inicial do trabalho foi direcionada para a preparação das células íntegras livres do fungo filamentoso *P. citrinum*, descrito como produtor de lipase ligada ao micélio. As células foram cultivadas em meio de cultura líquido, composto por óleo de oliva e nutrientes adequados por um período máximo de 120h, conforme descrito na seção 4.2.2. Os perfis de biomassa seca de micélio, atividade lipolítica no filtrado e na biomassa em função do tempo de cultivo estão mostrados nas Figuras 5.1 (a-b).

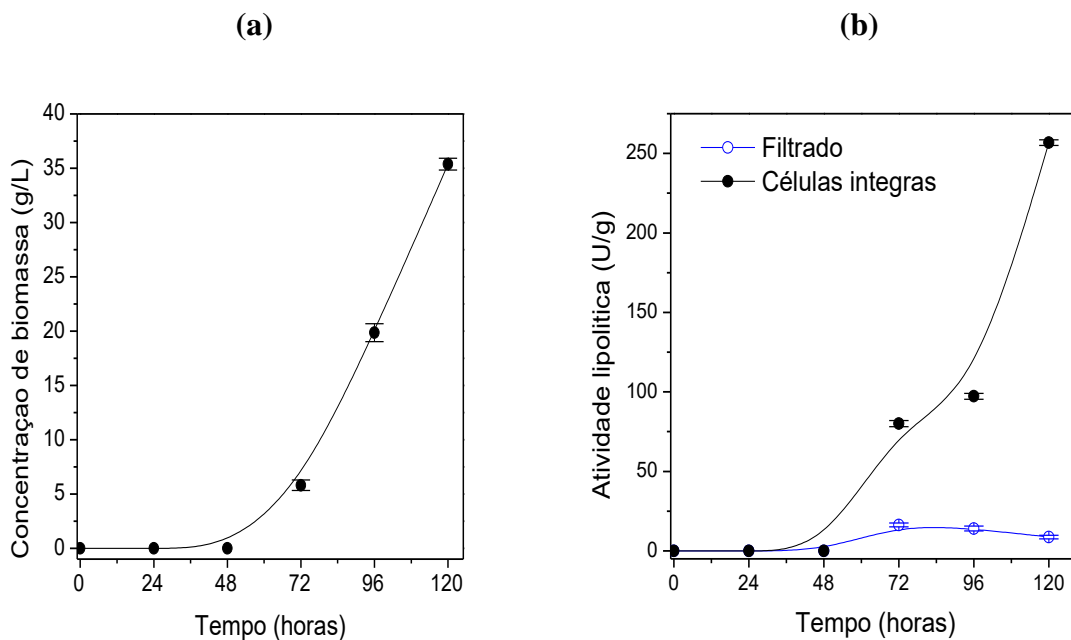


Figura 5.1 - Valores de (a) biomassa seca e de (b) atividade lipolítica da biomassa e do filtrado em função do tempo de cultivo.

Fonte: do autor.

Observa-se na Figura 5.1 (a) que até 48h de incubação, não houve crescimento expressivo do micro-organismo. Verifica-se que após este período de cultivo, o perfil de crescimento celular é semelhante a um perfil padrão de crescimento microbiano e a biomassa obtida aumenta conforme se aumenta o tempo de incubação, obtendo-se o maior valor ($35,37 \pm 0,53$ g/L) em 120h.

Ao comparar os resultados de atividade lipolítica obtida no filtrado e na biomassa na Figura 5.1 (b), nota-se que até 48h de cultivo não foi possível quantificar a atividade

lipolítica, dada a baixa taxa de crescimento. A partir de 72h de cultivo, os valores de atividade lipolítica obtidos para o filtrado se mostraram inferiores em relação aos valores de atividade da biomassa, sugerindo que a maior parte da lipase produzida ficou retida no micélio. Os valores de atividade do filtrado ficaram na faixa de $8,7 \pm 1,19$ a $16,3 \pm 1,23$ U/ml e a atividade da biomassa entre $80,12 \pm 1,93$ e $256,81 \pm 1,82$ U/g.

Ainda na Figura 5.1 (a-b) é possível estabelecer uma relação entre o crescimento celular e a atividade lipolítica da biomassa, pois o crescimento foi diretamente proporcional ao aumento da atividade lipolítica, visto que o maior valor de concentração de biomassa em 120h ($35,37 \pm 0,54$ g/L) forneceu o maior valor de atividade ligada ao micélio, da ordem de $256,81 \pm 1,82$ U/g.

A Figura 5.2 (a-b) ilustra a biomassa fúngica após o cultivo de 120h. Verifica-se que as células do *P. citrinum* em meio submerso apresentam um crescimento em forma de “pellets”, devido à morfologia desse fungo (Figura 5.2 a). Pellets são massas esféricas de hifas com estrutura interna variável, formando pelotas “fofas”, compactas e densas. A densidade de hifas dentro dos pellets é de importância para a difusão de nutrientes e oxigênio para a biomassa micelial, com consequentes efeitos sobre o crescimento, particularmente no centro de pellets (PAPAGIANNI, 2004).

Após o processo de filtração, como observado na Figura 5.2 (b), a biomassa adquire um aspecto filamentososo e de elevada resistência mecânica, o que pode ser explicado pela rigidez da parede celular dos fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2004).

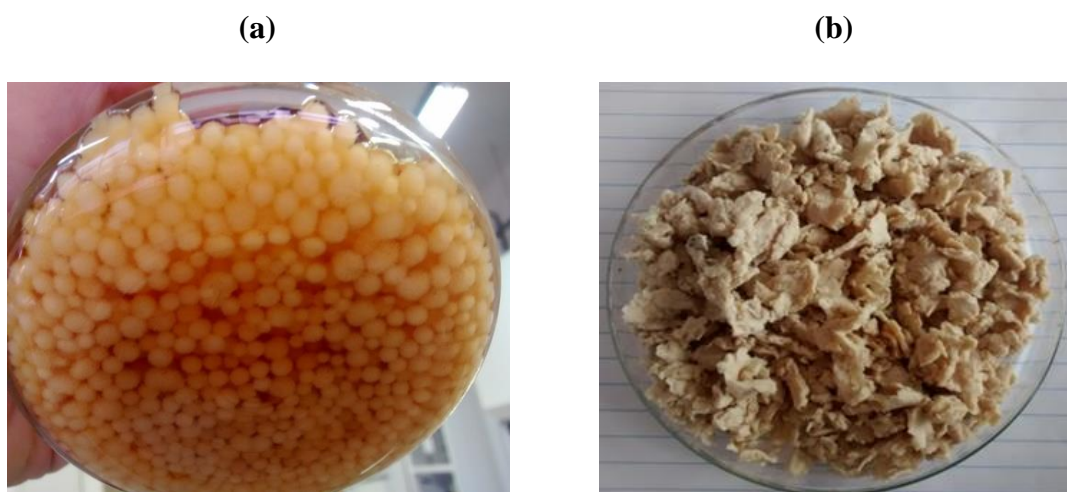


Figura 5.2 - Células íntegras livres: (a) com o meio de cultivo; (b) após processo de filtração.
Fonte: do autor.

Os fungos filamentosos são micro-organismos morfologicamente complexos, exibindo diferentes formas estruturais em todo seu ciclo de vida. A mudança na morfologia durante o crescimento afeta o consumo de oxigênio e a taxa de absorção de nutrientes em uma cultura submersa (PAPAGIANNI, 2004).

5.2 Imobilização das células íntegras

Para avaliar a influência do processo de imobilização sob as propriedades catalíticas e físico-químicas das células íntegras, o fungo filamentoso *P. citrinum* foi imobilizado em suporte poroso (espumas de poliuretano) durante o seu cultivo, conforme descrito na seção 4.2.3. Os perfis de biomassa seca de micélio, atividade lipolítica no filtrado e na biomassa em função do tempo de cultivo estão mostrados nas Figuras 5.3 (a-b).

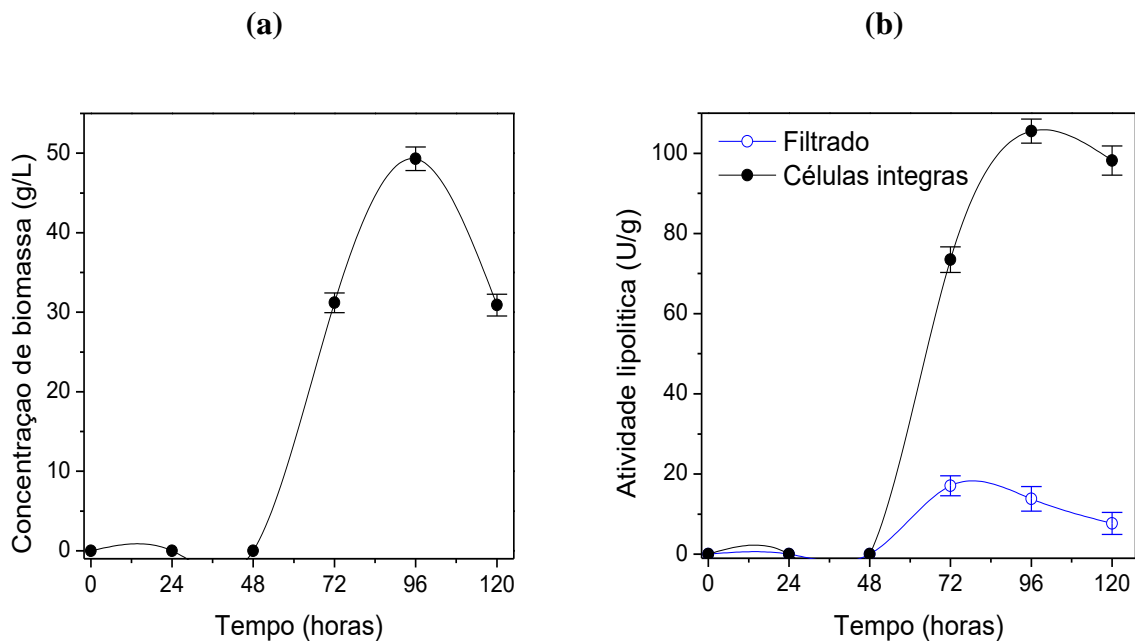


Figura 5.3 - Valores de (a) biomassa seca e de (b) atividade lipolítica da biomassa e do filtrado em função do tempo de cultivo.

Fonte: do autor.

Assim como observado para as células íntegras livres, até 48h de incubação, verificou-se que não houve crescimento expressivo da biomassa nas espumas de poliuretano, conforme Figura 5.3 a. No entanto, após 48h foi possível quantificar o crescimento do micélio aderido ao suporte de imobilização, que atingiu seu maior valor em 96h ($49,3 \pm 1,49$ g/L).

A Figura 5.3 (b) mostra que os valores de atividade obtidos no filtrado também se mostraram inferiores aos valores de atividade da biomassa imobilizada, sugerindo que a presença do suporte não interferiu na produção de lipase, e que a maior parte dela ficou retida no micélio. Pode-se observar que o tempo de cultivo com maior atividade enzimática para as células íntegras imobilizadas foi em 96h, apresentando valor médio de $105,51 \pm 3,01$ U/g. Novamente, constata-se uma proporcionalidade direta no crescimento celular e na atividade lipolítica da biomassa imobilizada. No entanto, ao contrário das células livres que atingiram valores máximos em 120h, as células imobilizadas após 96h tiveram um decaimento no crescimento e atividade enzimática, que sofreu uma queda de aproximadamente 45% em seu valor após as 96h, indicando que possivelmente a fermentação atingiu o seu fim pelo esgotamento dos nutrientes.

A Figura 5.4 (a-b) ilustra a biomassa fúngica imobilizada após o cultivo de 120h. Como pode ser observado o processo de imobilização das células do *P. citrinum* em espumas de poliuretano foi satisfatório, pois houve o crescimento e a adesão das células nas espumas, as quais permaneceram fortemente aderidas mesmo após a filtração.



Figura 5.4 - Processo de preparação das células íntegras imobilizadas pelo método da cultivo e fermentação submersa: (a) Biomassa imobilizada nas espumas de poliuretano ainda no meio de (b) Biomassa imobilizada nas espumas de poliuretano após a filtração.

Fonte: do autor.

5.3 Caracterização das células íntegras livres e imobilizadas

Após a determinação do tempo ótimo de cultivo, as células íntegras livres e imobilizadas foram caracterizadas quanto aos parâmetros morfológicos, cinéticos e bioquímicos, a fim de se determinar os valores ótimo de pH e temperatura, assim como o tempo de meia vida e a constante de Michaelis-Menten.

5.3.1 Análise morfológica das células íntegras imobilizadas

O processo de adesão das células nas espumas de poliuretano pode ser melhor visualizado através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme Figura 5.5(a-b).

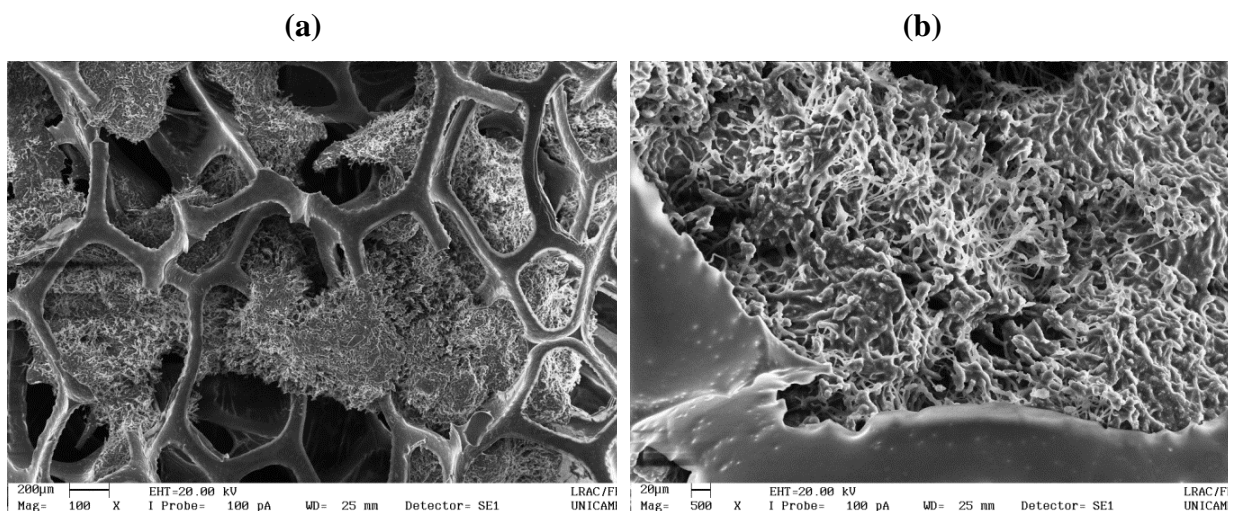


Figura 5.5 - Microscopia eletrônica de varredura das células de *Penicillium citrinum* imobilizadas em espumas de poliuretano (a) 100 X (b) 500X.

Fonte: do autor.

Como pode ser observado na Figura 5.5. (a) com ampliação de MAG = 100X, as células cresceram tanto no interior dos poros como ao redor das fibras das espumas, formando um emaranhado de biomassa fortemente aderido ao suporte. Essa forte adesão se torna interessante na aplicação da biomassa imobilizada, pois indica uma redução na dessorção de células do suporte, mesmo sob vigorosa agitação. Na Figura 5.5. (b) com ampliação MAG = 500X, pode-se observar melhor a morfologia das células após o processo de imobilização, evidenciando o aspecto filamentososo do fungo aderido as espumas.

Esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura que demonstram que a imobilização celular em espumas de poliuretano reticulado é a forma mais espontânea e efetiva de se obter biocatalisadores de células íntegras (BAN et al., 2001; LI et al., 2008b).

5.3.2 Determinação do pH e da temperatura ótimos de atuação da lipase

A influência das variáveis pH e temperatura na atividade lipolítica das células íntegras livres e imobilizadas de *P. citrinum* foram investigadas por meio da hidrólise do azeite de oliva. Para determinação do pH ótimo, os ensaios foram conduzidos a 37°C sob diferentes valores de pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 e para determinar a temperatura ótima, a atividade lipolítica da biomassa foi realizada em pH 7,0 sob diferentes valores de temperatura de incubação: 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 5.6 (a-b).

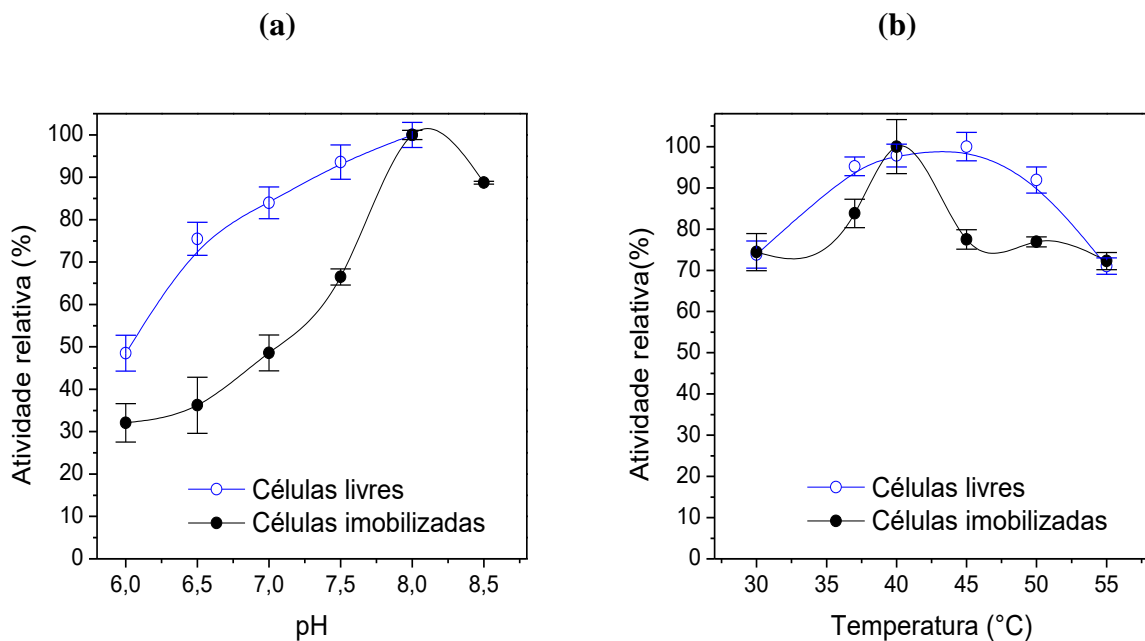


Figura 5.6 - Influência do pH (a) e da temperatura (b) na atividade lipolítica das células de *P. citrinum*.

Fonte: do autor.

Verifica-se que a melhor faixa de atuação das células íntegras livres ficou entre os pHs 7,5 e 8,0, com valores máximos de $222,17 \pm 4,04$ U/g e $237,44 \pm 2,97$ U/g. Para as células íntegras imobilizadas, a melhor atuação das células foi alcançado em pH 8,0 ($221,14 \pm 1,09$ U/g), como observado na Figura 5.6 (a).

Na Figura 5.6 (b), encontra-se o maior valor de atividade das células livres na faixa de temperatura de 37 a 45°C, com valores de atividade enzimática de $163,67 \pm 2,26$ U/g e $171,86 \pm 3,45$ U/g, respectivamente. Observa-se que a maior atividade obtida pelas células imobilizadas foi na temperatura de 40°C com valor de $112,49 \pm 3,23$ U/g.

Os resultados obtidos mostram que o processo de imobilização não interferiu nos valores de pH e temperatura ótimos de atuação da lipase ligada ao micélio, o qual se manteve na faixa comum aos valores encontrados na literatura para lipases extracelulares.

5.3.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das células livres e imobilizadas foram testadas por meio da determinação das atividades lipolíticas residuais durante o cultivo variando-se o tempo em que as amostras permaneceram incubadas numa temperatura de 60°C em meio aquoso (tampão fosfato de sódio 0,1 M) em pH 7,0 por um período de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. Os dados obtidos encontram-se na Figura 5.7.

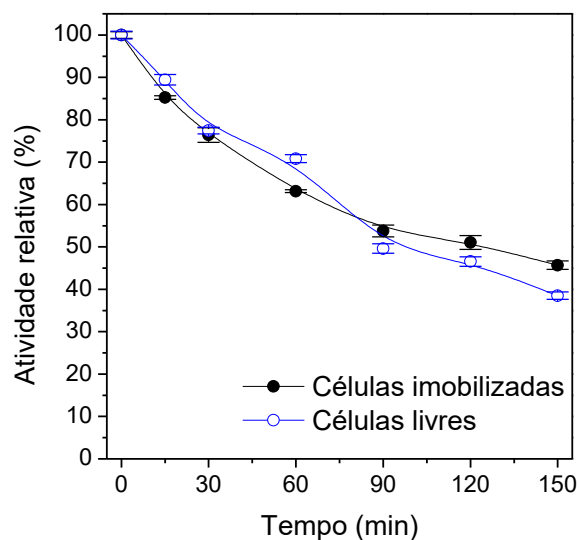


Figura 5.7 - Perfil de atividade residual das células íntegras livres e imobilizadas de *P. citrinum* em diferentes tempos de incubação a 60°C.

Fonte: do autor.

Conforme ilustra a Figura 5.7, as células imobilizadas possuem boa estabilidade térmica, mantendo mais de 50% da atividade inicial após incubação por 150 min a 60 °C. Por outro lado, as células livres apresentaram uma perda de aproximadamente 60% da sua atividade inicial, sugerindo que o suporte conferiu maior proteção térmica às células.

A partir desses resultados, calculou-se a constante de inativação térmica (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial da enzima (SAID; PIETRO, 2004). A constante de inativação (k_d) foi calculada pela equação 5.1 e o tempo de meia-vida pela equação 5.2 .

$$A = A_o \exp(-K_d \cdot t) \quad (5.1)$$

$$t_{1/2} = \ln \frac{0,5}{-K_d} \quad (5.2)$$

Através da aplicação das equações 5.1 e 5.2 o valor de k_d obtido para as células íntegras livres foi de $1,06 \cdot 10^{-4} h^{-1}$ e o $t_{1/2}$ foi igual a $1,81 h$. Para as células imobilizadas o valor de k_d foi de $8,62 \cdot 10^{-5} h^{-1}$ e o $t_{1/2}$ de $2,23 h$.

A literatura reporta que fungos mesofílicos, ou seja, fungos que crescem e sintetizam enzimas lipolíticas em faixas de temperatura de 20 a 30°C tendem a serem menos estáveis a um tratamento térmico (FERNANDES-LAHORE et al., 1999), o que pode explicar a baixa estabilidade térmica da lipase ligada ao micélio do *P. citrinum*.

5.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade lipolítica foi avaliado empregando emulsões de azeite de oliva em diferentes proporções (5-70% m/v) que correspondem em concentração de ácidos graxos de 372 a 2232 mM. O perfil de atividade lipolítica em diferentes concentrações de ácidos graxos para as células livres e imobilizadas estão ilustrados na Figura 5.8.

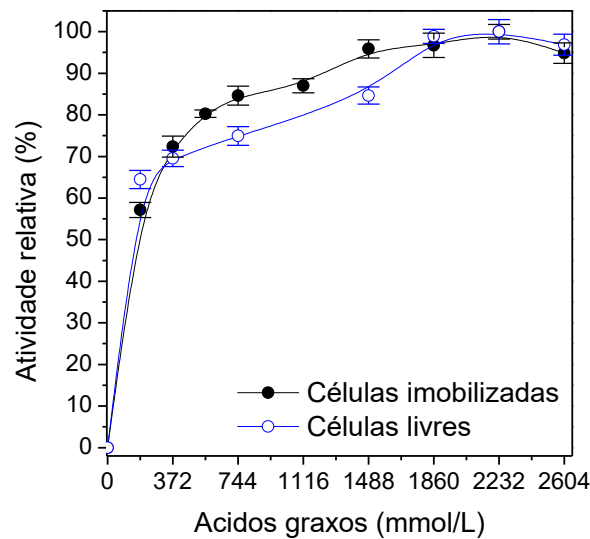


Figura 5.8 - Perfil de atividade lipolítica das células íntegras de *P. citrinum* em função da concentração de substrato (expresso em total de ácidos graxos contido na emulsão de azeite de oliva e água).

Fonte: do autor.

Para as células íntegras livres, os maiores valores de atividade enzimática $264,74 \pm 1,69$ e $267,68 \pm 2,93$ U/g foram obtidos utilizando emulsões contendo 50 e 60% de azeite de oliva, que correspondem a 1860 e 2232 mM de ácidos graxos, respectivamente (Figura 5.8). A partir dessa concentração há uma tendência na diminuição da atividade, provavelmente pelos efeitos inibitórios sobre a lipase causados pela elevada concentração de substrato.

Para as células imobilizadas, concentrações de 50 e 60% de azeite de oliva, que correspondem a 1860 e 2232 mM de ácidos graxos, respectivamente forneceram os maiores valores de atividade enzimática, da ordem de $115,13 \pm 2,91$ U/g e $119,04 \pm 1,76$ U/g.

A partir desses resultados foi possível determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} com o auxílio do programa Origin Pro versão 8. Assim, para as células livres, tem-se a velocidade máxima de reação no valor de 267,33 U/g e constante K_m em 136,51 mM. Para as células imobilizadas houve uma redução na velocidade máxima (123,24 U/g) e um aumento no valor de K_m (158,10 mM), evidenciando a diminuição da afinidade do substrato pela enzima causada pelo processo de imobilização. A presença do suporte, aliado a o micélio, causam problemas difusionais na transferência de massa entre o substrato e a lipase intracelular (WANG et al., 2005).

Isso pode ser confirmado por meio do cálculo da eficiência catalítica das células, que consiste na razão entre a velocidade máxima de reação e a constante de Michaelis-Menten, sendo obtido um valor de 1,95 e 0,78 para as células livres e imobilizadas, respectivamente.

As principais características das células de *P. citrinum* livres e imobilizadas em espumas de poliuretano descritas nas seções anteriores estão sumarizadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Características da lipase ligada ao micélio de *P. citrinum* livres e imobilizadas em espumas comerciais de poliuretano.

Parâmetros	Imobilizada	Livre
Ph	8,0	7,5
Temperatura (°C)	40	45
K_m(mM)	158,10	136,51
V_{max}(U/g)	123,24	267,33
k_D (h^{-1})	$8,62 \cdot 10^{-5}$	$1,06 \cdot 10^{-4}$
$t_{1/2}$ (h)	2,23	1,81
Eficiência catalítica	0,78	1,95

Fonte: do autor.

5.4 Hidrólise do óleo de soja

O potencial catalítico das células íntegras livres e imobilizadas foi investigado na reação de hidrólise do óleo de soja baseado na metodologia de Freitas et al., 2007.

Apesar das inúmeras vantagens que a imobilização celular confere ao processo enzimático, tais como a possibilidade de reutilização e maior estabilidade térmica, os experimentos iniciais foram direcionados para a utilização do biocatalisador na sua forma livre, a fim de evitar ou minimizar os problemas difusionais presentes nas células imobilizadas que são causados pela presença do suporte.

5.4.1 Influência do pH e temperatura

Os estudos iniciais tiveram como objetivo investigar o desempenho das células livres na hidrólise do óleo de soja empregando as condições ótimas de atuação da lipase, pH 7,0 e 8,0 e temperatura de 37 e 45°C. As células íntegras livres foram preparadas conforme descrito na seção 4.2.2 e apresentaram atividade lipolítica média de $144,73 \pm 1,99$ U/g e concentração média de biomassa de $20,34 \pm 2,68$ g/L.

A Figura 5.9 (a-b) apresenta o perfil cinético da hidrólise do óleo de soja por um período máximo de 6 horas.

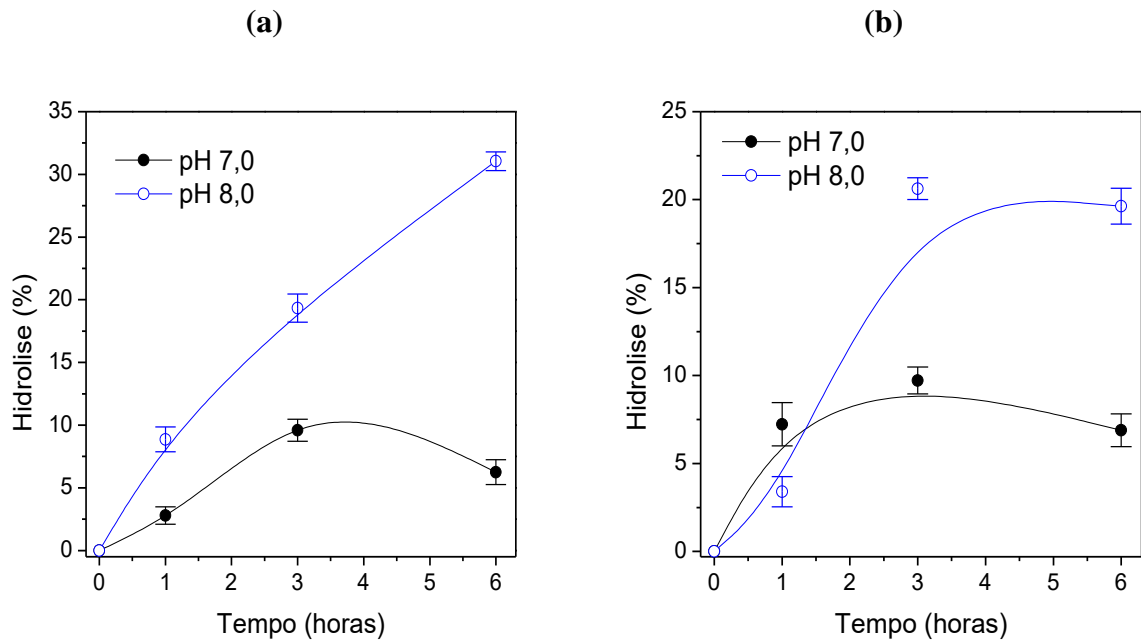


Figura 5.9 - Influência da temperatura e pH no progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de *P. citrinum* (a) T=37 °C (b) T=45 °C. Condições reacionais: emulsão a 25% com agente emulsificante, pH 7,0 e 8,0, 10% m/m biocatalisador, agitação em *shaker*.

Fonte: do autor.

Como pode ser observado na Figura 5.9 (a-b) o pH da emulsão influenciou fortemente nos resultados de hidrólise o óleo de soja. Para a reação realizada em pH 7,0 obteve-se a máxima conversão de apenas $9,6 \pm 0,87\%$ em uma temperatura de 37 °C e $9,72 \pm 0,76\%$ em de 45 °C, em três horas de reação. A reação realizada em pH 8,0 apresentou maiores conversões, alcançando níveis de $31,05 \pm 0,74\%$ seis horas de reação e $20,62 \pm 0,62\%$ em três horas de reação para as temperaturas de 37 e 45°C, respectivamente.

Ao avaliar a influência da temperatura, o progresso da reação tem comportamento semelhante em pH 7,0 para ambas as temperaturas testadas. No entanto, em pH 8,0, observa-se que os valores de hidrólise são similares até 3 horas de reação, porém após esse período há um decaimento desse valor para a reação a 45°C, em virtude de sua baixa estabilidade térmica.

Os resultados iniciais demonstram que as melhores condições de atuação das células livres na reação de hidrólise do óleo de soja foram em pH 8,0 e temperatura de 37°C.

5.4.2 Influência do tipo de agitação

Para reações de hidrólise, a qualidade da emulsão formada é de vital importância, já que a lipase atua na interface água e óleo. Nesse sentido, a presença de agentes emulsificantes e o tipo de agitação utilizada tem grande impacto no resultado final, pois pode contribuir positiva ou negativamente na estabilidade da emulsão.

As reações de hidrólise de óleos e gorduras mediada por lipases de diferentes fontes têm sido realizadas na presença de emulsificantes para aumentar a área interfacial óleo/água que, por sua vez, aumenta a atividade catalítica da enzima (TISS et al, 2002). Em escala industrial, a hidrólise de óleos e gorduras realizada sem a adição de agentes emulsificantes é economicamente mais atrativa porque reduz os custos do processo e permite fácil separação do produto de interesse (AVELAR et al, 2013).

Nesse aspecto, em busca da melhora da estabilidade da emulsão de óleo de soja, e conseqüentemente o aumento no grau de hidrólise pelas células livres, investigou-se a influência da agitação mecânica e da agitação em *shaker* na presença e na ausência de goma arábica nas reações de hidrólise do óleo de soja, empregando-se as condições estabelecidas anteriormente para o preparo do substrato. Os resultados estão descritos na Figura 5.10(a-b).

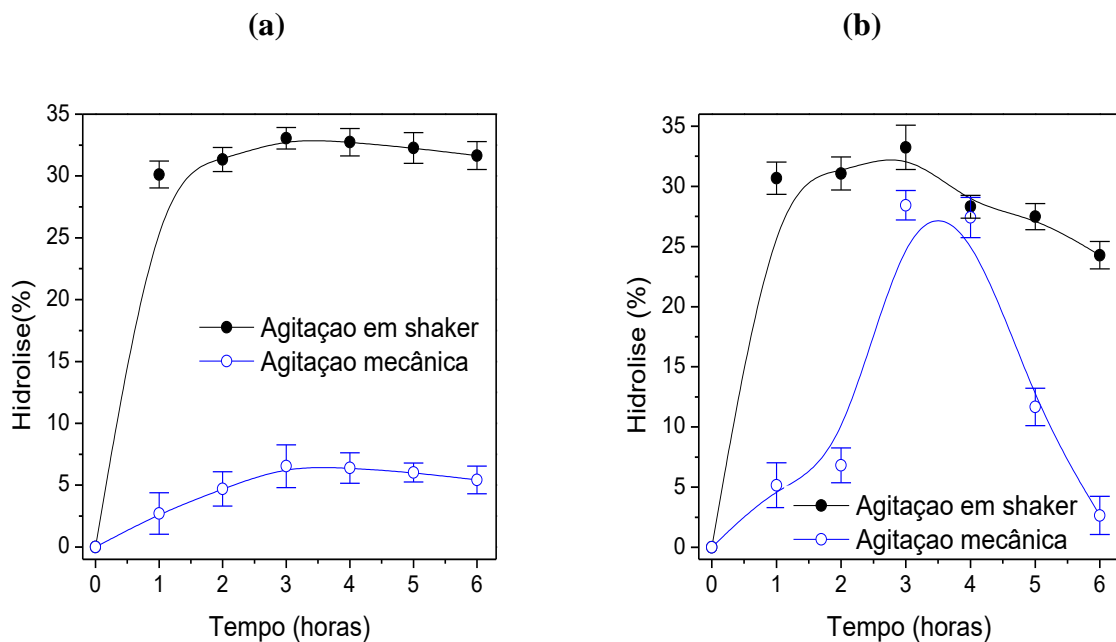


Figura 5.10 - Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja sob agitação mecânica e em *shaker* (a) na presença de agente emulsificante (b) na ausência de agente emulsificante. Condições reacionais: emulsão a 25%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador.

Fonte: do autor.

Na presença de agente emulsificante, a agitação mecânica foi ineficiente apresentando baixos graus de hidrólise quando comparados com os obtidos pela agitação em *shaker*, conforme revela a Figura 5.10(a). Enquanto em *shaker* as reações alcançaram níveis máximos de $32,7 \pm 1,11\%$ (4 horas) de hidrólise, a conversão em agitação mecânica com agente emulsificante foi de apenas $6,5 \pm 1,72\%$ (3 horas). Nota-se na Figura 5.10(b), que na ausência de agente emulsificante (goma arábica), a agitação mecânica forneceu resultados similares aos da agitação em *shaker*. Em 3 horas de reação, a agitação mecânica apresentou conversão máxima de $28,43 \pm 1,23\%$, e a agitação em *shaker* apresentou uma conversão de $33,24 \pm 1,84\%$. Em todos os ensaios, observou-se que nas primeiras 3 horas de reação houve uma boa homogeneização entre biocatalisador e substrato, porém após esse período a dispersão do biocatalisador no meio reacional ficou comprometida pela desestabilização da emulsão. Isso confirma a redução do grau de hidrólise evidenciada na Figura 5.10 (a-b) após 2 e 3 horas de reação.

Outros trabalhos relatam resultados semelhantes na ausência de emulsificantes. Wang et al., (1988) verificaram que a hidrólise do óleo de oliva catalisada pela lipase de *Candida rugosa* em um sistema emulsificado apenas por agitação mecânica apresentou taxas de hidrólise similares às obtidas nos sistemas reacionais contendo emulsificante. Para o sistema com agitação mecânica de 500 rpm foi alcançada uma conversão de 25% em 30 minutos de reação, valor muito próximo ao encontrado para o sistema contendo emulsificante, que foi de 27% em 30 minutos de reação.

5.4.3 Influência do solvente

O uso de solventes no meio reacional tem sido descrito como um fator responsável pelo aumento das taxas de hidrólise dos triacilgliceróis. Embora acarrete custos energéticos na etapa de separação e aumenta a porcentagem de resíduos nos produtos finais (CASTRO E KNUBOVETS, 2003), a utilização de solventes pode induzir modificações na estrutura enzimática, aumentando a eficiência catalítica, além de aumentar a estabilidade térmica das lipases que atuam como biocatalisadores na reação (HAZARIKA et al., 2002). Ainda, a utilização de solventes pode tornar a imobilização desnecessária, visto que a maioria das lipases são insolúveis em solventes orgânicos (ICHINOSE; KAMIYA; GOTO, 2005).

Deste modo, avaliou-se o uso de solventes orgânicos em substituição ao agente emulsificante na reação de hidrólise do óleo de soja sob agitação orbital de *shaker* na presença de células livres. Foram testados os solventes terc-butanol e hexano, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.11.

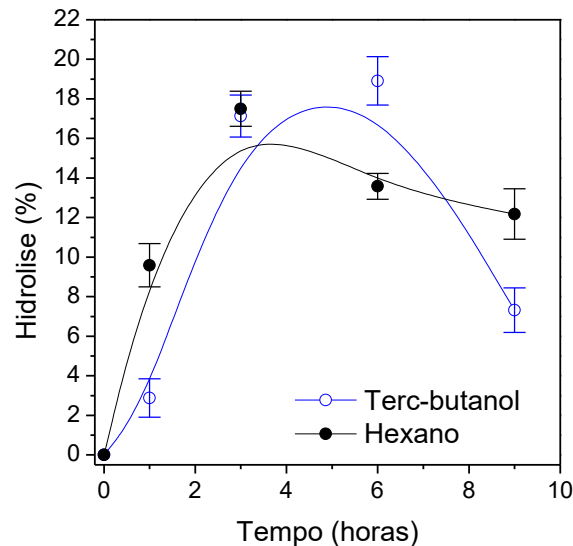


Figura 5.11 - Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de *P. citrinum* na presença de terc-butanol e hexano. Condições reacionais: emulsão a 25%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação em *shaker*, sem agente emulsificante.

Fonte: do autor.

A presença dos solventes na reação não foi eficiente para aumentar o grau de hidrólise do óleo de soja catalisado pelas células livres, conforme mostra a Figura 5.12. Para o hexano foi alcançado a conversão de $17,5 \pm 0,89\%$ em 3 horas de reação e para o terc-butanol, foi alcançado um grau máximo de $19 \pm 1,22\%$ em 6 horas de reação.

Em geral, os solventes hidrofóbicos são menos prejudiciais para as enzimas, já que possuem a água necessária para manter a estrutura do catalisador (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003). Solventes hidrofílicos tendem a retirar a água essencial da estrutura da proteína, conduzindo à perda da atividade enzimática (ROYON et al., 2007). Os baixos graus de hidrólise alcançados sugerem que ocorreu a inibição da atividade da enzima na presença de solventes, devido a uma diminuição da camada de hidratação presente perto do local ativo da enzima, o que ocasiona diminuição no desempenho de suas atividades (PEREIRA et al., 2001).

5.4.4 Otimização da hidrólise de óleo de soja

Para maximizar a porcentagem de hidrólise do óleo de soja pelas células livres de *P. citrinum*, foi empregado o delineamento experimental como ferramenta para estudar o efeito combinado das variáveis: (X_1) razão mássica óleo/tampão (12,9 – 25 % m/m) e (X_2) temperatura (26 – 48°C). Em todos os ensaios foi utilizado biocatalisador com atividade média de $156,23 \pm 1,09$ U/g. Os resultados obtidos no delineamento experimental para a avaliação do efeito das variáveis estudadas na porcentagem de hidrólise do óleo de soja estão ilustrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Matriz experimental para a hidrólise do óleo de soja catalisado pelas células livres de *P. citrinum*. Condições experimentais: 50 g de substrato, 10% m/m biocatalisador, tampão fosfato pH 7,0, 170 rpm e 3 horas de reação.

Ensaio	Variáveis codificadas (originais)		% Hidrólise
	Razão mássica Óleo/ tampão	Temperatura (°C)	
1	-1 (15)	-1 (29)	1,9
2	1 (25)	-1 (29)	6,16
3	-1 (15)	1 (45)	2,55
4	1 (25)	1 (45)	4,83
5	-1,414 (12,9)	0 (37)	7,72
6	1,414 (27,1)	0 (37)	6,86
7	0 (20)	-1,414 (26)	10,36
8	0 (20)	1,414 (48)	18,37
9	0 (20)	0 (37)	30,48
10	0 (20)	0 (37)	32,2
11	0 (20)	0 (37)	36,9

Fonte: do autor.

Os resultados da Tabela 5.2 mostram que os níveis de hidrólise alcançados foram afetados significativamente por ambas variáveis. As porcentagens de hidrólise alcançadas variam de 1,9 a 36,9% em 3 horas de reação. As maiores conversões alcançadas foram obtidas no ponto central ao se utilizar 20% de óleo a uma temperatura de 37°C (ensaio 9, 10 e 11).

A Tabela 5.3 reúne os dados da análise dos efeitos, estimativa de erro padrão e o teste t de Student's para as variáveis reais. A análise estatística dos resultados revelou o efeito significativo de ambas as variáveis quadráticas (X_1^2 e X_2^2) estatisticamente ($p < 0,05$) ao nível de 95% de confiança. No entanto, as variáveis lineares e a interação entre as variáveis não foram estatisticamente significativas ao mesmo nível de confiança.

Tabela 5.3 - Estimativa dos efeitos das variáveis, erros padrão e teste t de Student's t para os níveis de hidrólise do óleo de soja utilizando delineamento experimental composto rotacional.

Variável	Efeitos	Erro padrão	P
Média	33,1947	1,9187	0,0033*
X₁(linear)	1,3312	2,3501	0,6281
X₁(quadrático)	-29,3940	2,7975	0,0089*
X₂(linear)	2,6619	2,3501	0,3748
X₂(quadrático)	-22,3168	2,7975	0,0153*
X₁.X₂	-0,9900	3,3233	0,2979

*significativo ao nível de 95% de confiança: X₁ e X₂ representam as variáveis: razão mássica óleo/tampão e temperatura, respectivamente.

Fonte: do autor.

Cabe ressaltar que os principais efeitos estatísticos das variáveis quadráticas foram negativos. Neste aspecto, o efeito negativo da temperatura pode estar diretamente relacionado com a baixa estabilidade térmica das células de *P. citrinum*. Com relação ao efeito negativo da razão mássica, os resultados mostraram que menores quantidades de óleo provocam um aumento dos níveis de hidrólise.

A partir desses dados, foi possível compor o modelo estatístico incluindo os coeficientes correspondentes aos efeitos significativos como apresentado na Equação 5.3, em que Y: representa os índices de hidrólise (%); X₁² é o valor codificado da variável razão mássica e X₂² o valor codificado da variável temperatura. Os coeficientes relativos aos efeitos não significativos foram excluídos do modelo.

$$Y = 33,19 - 14,69 X_1^2 - 11,15 X_2^2 \quad (5.3)$$

A análise de variância do modelo foi avaliada pelo teste F (Tabela 5.4), que revelou que a regressão foi estatisticamente significativa ao nível de 95% de probabilidade. Como o valor calculado de F para a regressão (24,65) é altamente significativo, e a porcentagem de variação explicada (R²) indicou que o modelo explica 91,35% da variabilidade experimental, podemos concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Desta forma, considerou-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrever os índices de hidrólise em função das variáveis estudadas (razão mássica e temperatura), o qual foi utilizado para gerar a superfície de resposta apresentada na Figura 5.13. Os valores preditos pelo modelo representado na superfície de resposta indicam que os

níveis de hidrólise são maximizados numa temperatura de 37°C e razão mássica óleo de soja/tampão em 20%.

Tabela 5.4 - Análise de variância (ANOVA) para a regressão do modelo que representa os níveis de hidrólise do óleo de soja utilizando o delineamento experimental composto rotacional.

Variáveis	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F	P	Fcalc
X_1	3,544	1	3,544	0,3209	0,6282	24,65
X_1^2	1219,275	1	1219,275	110,4003	0,0089*	
X_2	14,170	1	14,170	1,2830	0,3748	
X_2^2	702,830	1	702,830	63,6383	0,015*	
$X_1.X_2$	0,908	1	0,980	0,0887	0,7938	
Falta de ajuste	122,420	3	40,807	3,6949	0,2202	
Erro puro	22,088	2	11,044			
Cor total	1671,367	10				
R^2	0,91354					

$F_{3;7;0,05} = 4,35$.

Fonte: do autor.

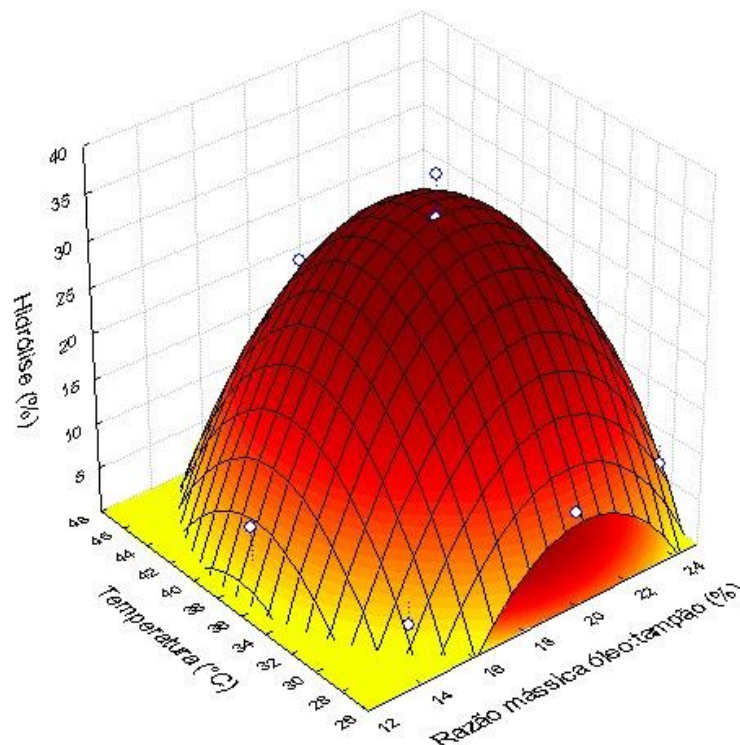


Figura 5.12 - Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático predito para a hidrólise enzimática do óleo de soja catalisado pelas células livres de *P. citrinum* em função da razão mássica (X_1) e temperatura (X_2).

Fonte: do autor.

Para validação do modelo matemático obtido, um ensaio adicional foi realizado nas condições previstas pelo modelo e constatou-se que a diferença entre o rendimento obtido experimentalmente e o rendimento teórico foi de 1,7%. O ensaio conduzido sob condições otimizadas alcançou valores maiores que o gerado pelo delineamento experimental, obtendo-se um índice de hidrólise de 38,6%. A Figura 5.13 ilustra os resultados obtidos, e revela que o perfil da reação de hidrólise foi similar ao perfil encontrado nos demais ensaios do planejamento.

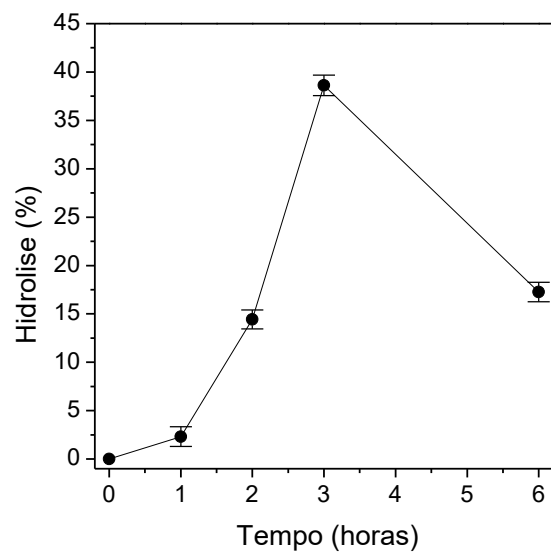


Figura 5.13 - Perfil cinético da reação de hidrólise do óleo de soja catalisada pelas células livres de *P. citrinum* nas condições previstas pelo modelo matemático (razão mássica óleo/tampão 20% a 37 °C. Condições reacionais: pH 7,0, 10% m/m biocatalisador, agitação em *shaker*, com agente emulsificante).

Fonte: do autor.

5.4.5 Efeito do ultrassom

A combinação da irradiação de ondas ultrassônicas e agitação mecânica pode tornar o processo de hidrólise mais eficiente, aumentando a difusão de substratos para os sítios ativos da enzima, resultando em elevadas conversões em menor tempo, uma vez que um dos efeitos físicos do ultrassom é melhor transferência de massa (BABICKZ, 2009).

Para avaliar o efeito do ultrassom nas reações de hidrólise do óleo de soja catalisada pela lipase do *P. citrinum*, foram efetuados ensaios nas condições otimizadas encontradas

(razão mássica óleo tampão 20%, 37°C, 10% biocatalisador), na presença e na ausência de agente emulsificante goma arábica, mantendo a agitação mecânica (1000 rpm).

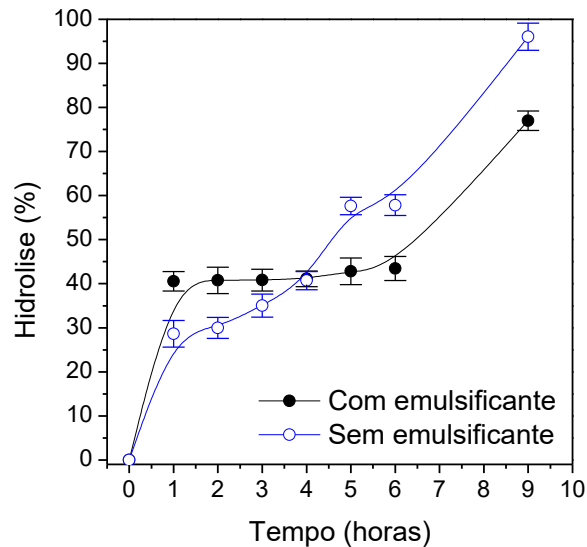


Figura 5.14 - Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras livres de *P. citrinum* em banho de ultrassom, na presença e na ausência de agente emulsificante. Condições reacionais: emulsão a 20%, pH 8,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação mecânica.

Fonte: do autor.

Verificou-se que o uso do ultrassom alterou nitidamente o meio, pois em poucos segundos a mistura tampão/óleo adquiriu aparência homogênea e opaca. Na figura 5.14 é possível observar que o uso de ultrassom interferiu consideravelmente nas reações de hidrólise enzimática do óleo de soja. As curvas apresentaram comportamento distinto em relação à reação não irradiada por ultrassom, destacando o desempenho mais elevado para as reações conduzidas sob ultrassom. Além disso, é notório que foram alcançadas maiores conversões para a reação na ausência de agente emulsificante.

Com o tempo reacional de 9 horas, o valor máximo de conversão atingido pela lipase na reação livre de agente emulsificante foi de $96 \pm 3,07\%$, enquanto que no sistema na presença de goma arábica, uma conversão máxima de $77 \pm 2,21\%$ foi alcançada. Já as reações realizadas em *shaker* apresentou máxima conversão de apenas 38,6% em 3 horas de reação, apresentando queda nas conversões alcançadas após decorrido esse período.

Os resultados obtidos estão de acordo com avaliações similares da literatura como o trabalho de Liu et al. (2008), onde os pesquisadores concluíram que na hidrólise do óleo de soja em sistema livre de solvente os rendimentos das reações foram aumentados em 94% (1 h), 64% (2 h), 58% (3 h), 41% (4 h) e 34% (5 h) a mais do que nas condições de agitação em

banho termostático, devido ao ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima (LIU et al., 2008).

As maiores conversões ocorreram na ausência de agente emulsificante, pelo fato de que o uso de ultrassom no sistema água/óleo pode gerar emulsões estáveis mesmo sem o uso de emulsificantes, devido à ocorrência de fenômenos no meio que promovem uma efetiva agitação e dispersão de fases em sistemas heterogêneos (KWIATKOWSKA et al., 2011; CHANDRALAPA et al., 2012). O uso associado do ultrassom com a agitação mecânica fornece uma boa estabilização da emulsão, acarretando elevados graus de hidrólise.

O óleo de soja e seu respectivo produto de hidrólise foram analisados por cromatografia em fase gasosa, gerando os cromatogramas mostrados na Figura 5.16, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Composição dos concentrados de ácidos graxos obtidos nos hidrolisados do óleo de soja empregando a lipase de *P. citrinum*.

Agente emulsificante	Grau de hidrólise (%)	Ácidos graxos (%)				
		Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	Linolênico (C18:3)
Ausência	96 ± 3,07	10,93	4,35	35,93	42,38	4,72
Presença	77 ± 2,21	9,25	3,53	24,34	31,94	3,45

Fonte: Do autor.

A lipase foi capaz de converter o óleo de soja em seus respectivos ácidos graxos, tanto na presença como na ausência de agente emulsificante. Como pode ser observado na Tabela 5.5, o produto hidrolisado foi composto predominantemente por ácidos graxos poli-insaturados, sendo obtido os maiores valores para os ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). Para a reação na presença de agente emulsificante o meio hidrolisado foi de 72,51% enriquecido por aproximadamente 44% de ácido linoleico e 33,5% ácido oleico. Na ausência de agente emulsificante, a lipase liberou maior quantidade de ácidos ômega (98,3%), sendo 43% de ácido linoleico e 36,5% de ácido oleico. Esse fato pode ser explicado levando em consideração que sistemas livres de agente emulsificante formam emulsões mais estáveis, o que garantiu melhor atuação da lipase ligada ao micélio na interface água/óleo.

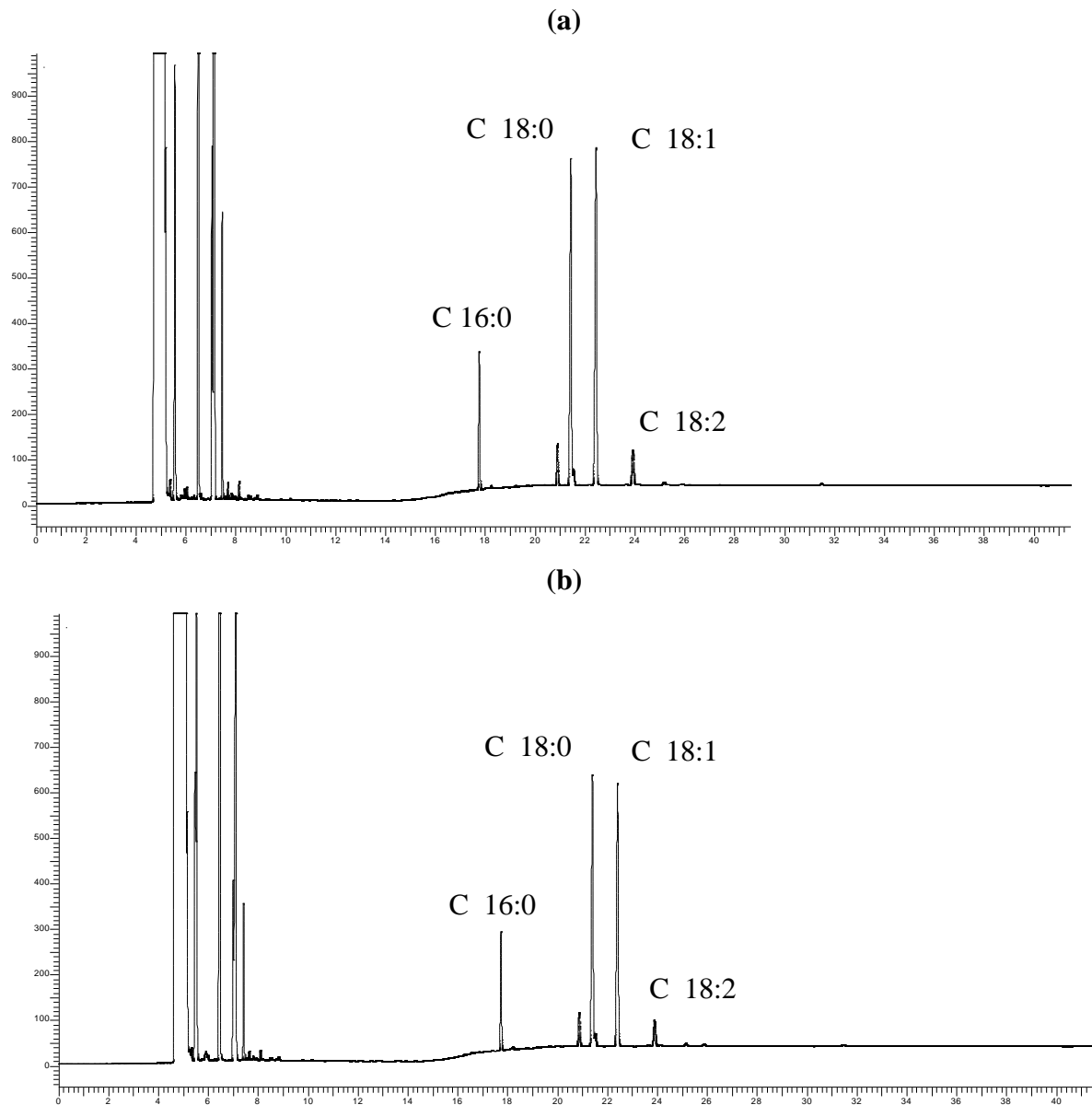


Figura 5.15 - Cromatogramas gerados nas análises dos hidrolisados de óleo de soja (a) na ausência de agente emulsificante (b) na presença de agente emulsificante.

Fonte: do autor.

5.5 Hidrólise de diferentes óleos vegetais

Até o presente momento, os estudos sobre o potencial catalítico das células íntegras de *P. citrinum* foram direcionados para a hidrólise do óleo de soja. Definidas as melhores condições operacionais com o óleo de soja, a próxima etapa do trabalho consistiu em avaliar a potencialidade catalítica das células em diferentes óleos vegetais com composição variada de

ácidos graxos. Foram utilizados os óleos refinados de oliva, girassol e canola, cujas composições em ácidos graxos estão descritas na Tabela 5.6, juntamente com o óleo de soja.

Tabela 5.6 - Composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.

Óleo	Composição em ácidos graxos (% em massa)					Referência
	Palmítico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)	Linolênico (C18:3)	
Oliva	14,6	-	75,4	10	-	Pinto et al, 2005
Girassol	6,4	2,9	17,7	72,9	-	Dermibas et al, 2008
Canola	3,5	0,9	54,1	22,3	-	Pinto et al, 2005
Soja	9,8	2,9	18,3	44,7	4,72	Do autor

Fonte: Do autor.

Os ensaios foram realizados nas condições otimizadas para a hidrólise, empregando 20% (m/v) de óleo, não emulsificados com goma arábica, tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0, em banho de ultrassom acoplado a agitação mecânica de 1000rpm.

A Tabela 5.7 apresenta os graus de hidrólise alcançados utilizando óleo de oliva, girassol e canola, por um período de 6 e 9 horas.

Tabela 5.7 - Grau de hidrólise alcançado na reação de diferentes óleos vegetais utilizando a lipase de *P. citrinum*.

Óleo vegetal	Ácido graxo majoritário	Grau de hidrólise (%)	
		6h	9h
Soja (controle)	C18:2	73,9 ± 1,23	96,00 ± 3,07
Oliva	C18:1	62,6 ± 4,70	84,33 ± 2,78
Canola	C18:1	68,53 ± 3,5	89,87 ± 2,23
Girassol	C18:2	74,26 ± 3,76	93,51 ± 2,51

Fonte: do autor.

Os resultados obtidos indicam que a lipase de *P. citrinum* foi capaz de hidrolisar os triacilgliceróis presentes nos óleos vegetais testados. Foram alcançadas maiores conversões em 9 horas de reação para todos os óleos empregados.

Observa-se que para todos os óleos testados, altas conversões foram alcançadas. Dentre estes, a lipase mostrou-se mais efetiva na hidrólise do óleo de girassol, alcançando uma conversão de 93,5% em 9 horas de reação, resultado bem próximo ao encontrado na

hidrólise do óleo de soja (96%). A semelhança nos graus de hidrólise obtidos pode ser explicada pelo fato de que os óleos de girassol e soja apresentam composição semelhante e possuem o ácido linoleico (C18:2) como ácido graxo majoritário em sua composição. Tais resultados demonstram a seletividade da lipase ligada ao micélio de *P. citrinum* por óleos compostos por elevadas proporções de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o ácido oleico (C18:1), presente em grande quantidade nos óleos de oliva e canola, e o ácido linoleico (C18:2) presente nos óleos de girassol e de soja.

Os resultados aqui alcançados corroboram com as avaliações similares do trabalho de Marotti (2016), em que foi observado elevados graus de hidrólise (variando de 67 a 80%) para os óleos de coco e canola, quando submetidos à hidrólise enzimática em ultrassom empregando diferentes espécies da lipase do gênero *Penicillium*.

5.6 Células imobilizadas

Algumas aplicações de lipases ligadas ao micélio podem requerer o uso na forma imobilizada em suporte adequado. Biocatalisadores imobilizados são úteis para condução de reações em reatores de leito fixo operando em fluxo contínuo. Dessa forma, experimentos adicionais foram conduzidos visando investigar o potencial catalítico das células íntegras imobilizadas na reação de hidrólise do óleo de soja, com objetivo de avaliar a influência da imobilização na atividade final de hidrólise. As células íntegras imobilizadas em espumas de poliuretano apresentaram atividade lipolítica média de $35,87 \pm 0,98$ U/g e concentração média de biomassa de $7,45 \pm 0,67$ g/L.

A Figura 5.16 apresenta a evolução da hidrólise enzimática do óleo de soja ao longo de 24h e indica que as células de *P. citrinum* imobilizadas foram eficientes na hidrólise do óleo de soja, alcançando grau de hidrólise máximo de $55,7 \pm 1,56\%$ em 12 h de reação, não sendo observada reversibilidade da reação por um período adicional de 12h.

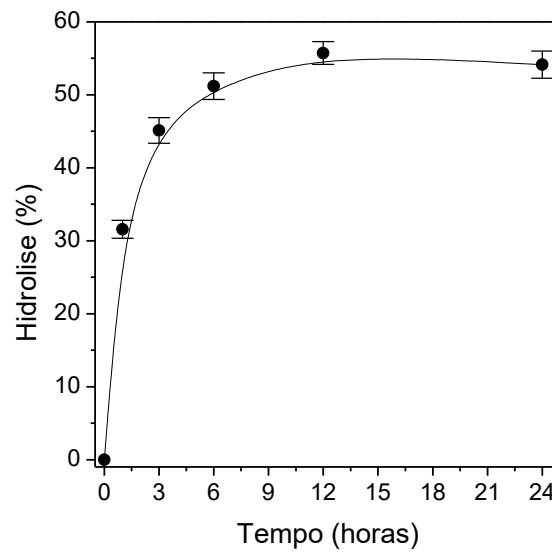


Figura 5.16 - Progresso da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando células íntegras de *P. citrinum* immobilizadas em poliuretano. Condições reacionais: pH 7,0, 37°C, 10% m/m biocatalisador, agitação em *shaker*, com agente emulsificante.

Fonte: do autor.

A partir dos dados expostos, constata-se a potencialidade das células íntegras de *P. citrinum*, seja na forma livre ou immobilizada, em hidrolisar com eficiência óleos vegetais que contém em sua composição ácidos graxos de cadeia longa, como o óleo de soja. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados com o aquecimento não convencional em banho ultrassônico, em uma tentativa de se obter melhores resultados, assim como ocorreu para as células livres.

6 CONCLUSÕES

Tendo como perspectiva a utilização das células íntegras de *P. citrinum* na modificação de óleos e gorduras, um estudo das reações de hidrólise do óleo de soja sob diferentes condições foi realizado, empregando as células íntegras de *P. citrinum* livre e imobilizada. Os resultados obtidos neste trabalho foram considerados satisfatórios e nesse conjunto de dados pode-se concluir que:

- a) As propriedades bioquímicas e cinéticas da lipase livre e imobilizadas foram determinadas. As células livres revelaram os valores de $k_D = 1,06 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, $t_{1/2} = 1,81 h$, e parâmetros cinéticos $K_M = 136,51 mM$ e $V_{max} = 267,33 U/g$. As células imobilizadas, apresentaram os valores de $k_D = 8,62 \cdot 10^{-5} h^{-1}$, $t_{1/2} = 2,23 h$, e as constantes cinéticas $K_M = 158,10 mM$ e $V_{max} = 123,24 U/g$,
- b) Os resultados iniciais demonstraram que as melhores condições de atuação das células livres na reação de hidrólise do óleo de soja foram em pH 8,0 e temperatura de 37°C;
- c) Valores semelhantes de grau de hidrólise entre a agitação em *shaker* e a agitação mecânica na ausência de agente emulsificante sugerem que uma agitação vigorosa, neste caso de 1000 rpm, dispensa o uso de emulsificantes e fornece uma boa estabilização da emulsão;
- d) A presença dos solventes na reação de hidrólise não foi eficiente para aumentar o grau de hidrólise do óleo de soja catalisado pelas células livres;
- e) Os resultados fornecidos pelo delineamento experimental indicaram que os níveis de hidrólise são maximizados numa temperatura de 37°C e razão mássica óleo de soja/ tampão em 20%, utilizando o biocatalisador em sua forma livre;
- f) A utilização da irradiação de ondas ultrassônicas favoreceu a obtenção de elevados graus de hidrólise. Foram alcançadas conversões de 96% no sistema livre de agente emulsificante em 9 horas de reação, contra uma conversão máxima de apenas 38,6% em 3 horas de reação utilizando a agitação em *shaker*;
- g) Os resultados obtidos por cromatografia gasosa do produto hidrolisado sugerem que a lipase foi capaz de liberar para o meio os ácidos graxos correspondentes á composição química do óleo de soja, sendo em sua maioria ácidos graxos

insaturados, (ácido oleico e linoleico), demonstrando a aplicabilidade desta lipase para produção de ácidos graxos essenciais;

- h) Utilizando diferentes óleos vegetais verificou-se maior especificidade da lipase por óleos compostos por elevadas proporções de ácidos insaturados de cadeia longa, como o ácido oleico, presente em grande quantidade nos óleos de oliva e canola, e o ácido linoleico presente nos óleos de girassol e de soja;
- i) Ao utilizar células íntegras de *P. citrinum* imobilizadas em espumas de poliuretano, foi obtido grau de hidrólise máximo de 55,7% em 12 h de reação sob agitação convencional, não sendo observada reversibilidade da reação por um período adicional de 12h;
- j) Os resultados descritos nesse trabalho indicam que a lipase proveniente das células íntegras de *P. citrinum* pode ser considerada uma fonte promissora de lipase ligada ao micélio, podendo ser aplicada com relativa eficiência em reações de hidrólise de óleos vegetais insaturados.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes etapas:

- a) Explorar o potencial das células íntegras de *P. citrinum* em fontes não convencionais de aquecimento e agitação na hidrólise de óleos vegetais de composição rica em ácidos graxos de cadeia longa e insaturadas;
- b) Investigar outras cepas produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais.

REFERÊNCIAS

AARTHY, M. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.

ABDELMOEZ, W.; MOSTAFA, N. A.; MUSTAFA, A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. **Journal of Cleaner Production**, v.59, n.15, p. 290-297, 2013.

ANABOM, C. D. et al. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. **Biomed Research Internacional**, v. 2014, 11 p., 2014.

ANDRADE, G. S. S. et al. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 37, n. 12, p. 2539–2548, 2014.

ANDRADE, Grazielle S. S. et al. Screening, immobilization and utilization of whole cell biocatalysts to mediate the ethanolysis of babassu oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 84, p. 183-188, 2012.

ARAÚJO, M. E. M. B. et al. Synthesis of structured triacylglycerols enriched in n-3 fatty acids by immobilized microbial lipase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1016-1013, 2016.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington 15th ed., p.369-406, 2003.

AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452-458, 2013.

AWADALLAK, J. A. et al. Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. **Ultrason Sonochem**, v. 20, n. 4, p. 1002-1007, 2013.

AWADALLAK, J. A. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol**. 2012. 69f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo, 2012.

BABICZ, I. et al. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation, **Ultrasonics Sonochemistry**, v.17, n. 1, p.4-6, 2010.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Enzyme-Mediated modification of milkfat. In KUO, T. M; GARDNER, H. W. **Lipid Biotechnology**. United States America: Marcel Dekker, 2012.

BAN, K. et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 1, p. 39-43, 2001.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom: Influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v.15, n. 4, p.302-316,1992.

BATISTELLA, L. et al. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed transesterification of soybean oil in organic solvent system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, n. 3, p.452-458, 2012.

BEUVE, R. S.; MORISON, K. R. Enzymatic hydrolysis of canola oil with hydrodynamic cavitation. **Chemical Engineering and Processing**, v.49, n. 10, p.1101–1106, 2010.

BEZBRADICA, D. et al. Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 71, n. 1, p. 31- 41, 2006.

BUENO, Tânia. **Obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2195-2210, 2006.

CANILHA, L.; CARVALHO, W. De; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ano 9, p. 48-57, 2006.

CASTRO, G. R.; KNUBOVETS, T. Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 23, n.3, p. 195–231, 2003.

CHAND, P. et al. Enhancing biodiesel production from soybean oil using ultrasonics. **Energy Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2010–2015, 2010.

CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing, **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, n. 5, p.975-983, 2012.

COLLA, L. M. et al. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461-467, 2016.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química nova**, v. 40, n.1, p. 85-96, 2017.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p.146-156, 2004.

DE ORY, I.; ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. **Process Biochemistry**, v.39, n. 5, p. 547–555, 2004.

DERMIRBAS, A. **Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines**. London: Springer Publishing Co; 2008.

DONG, H.; WANG, Y.; ZHENG, Y. Enantioselective hydrolysis of diethyl 3-hydroxyglutarate to ethyl (S)-3-hydroxyglutarate by immobilized *Candida Antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.66, n. 1-2, p 90-94, 2010.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase a shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109-119, 2008.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry**, 6th ed., Heidelberg: SpringerVerlag, 2011.

FARIA, L. A. **Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido**. 2010. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FEITEN, M. C. et al. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 83-85, 2014.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERNADEZ-LAHORE, H. M. et al. Purification and characterization of na acid protease from mesophilic *Mucor* sp. Solid-state cultures. **The Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 6, p. 599-605, 1999.

FREITAS, L. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1725–1731, 2007.

FUENTES, P. H. A. **Avaliação da qualidade de óleos de soja, canola, milho e girassol durante o armazenamento**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.5, p. 405-416, 2009.

FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; DUANT, J. Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus sp.* **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 5, p. 527-530, 1995.

GAMBARRA NETO, F. F. **Classificação de óleos vegetais utilizando voltametria de onda quadrada e métodos quimiométricos**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

GHOSH, S., BHATTACHARYYA, D.K. Utilization of acid oils in making valuable fatty products by microbial lipase technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 12, p. 1541-1544, 1995.

GLÜCK, T.; ALTER P. Marine omega-3 highly unsaturated fatty acids: from mechanisms to clinical implications in heart failure and arrhythmias. **Vascular Pharmacology**, v. 82, p. 11-19, 2016.

GOMES, M.M.R. **Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo residual de peixe**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química - EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

GUPTA, S. Comparative study on hydrolysis of oils by lipase immobilized biocatalytic PS membranes using biphasic enzyme membrane reactor. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.4, n. 2, p.1797-1809, 2016.

GUTARRA, M. L. E. et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5249-5254, 2009.

HAMA, S. et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 328-333, 2006.

HAZARIKA, S. et al. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. **Chemical Engineering Journal**, v. 85, n. 1, p. 61-68, 2002.

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Encyclopedia of Microbiology**. Ed. 3, p. 385-392, 2009.

ICHINOSE, H.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Enzymatic redox cofactor regeneration in organic media: Functionalization and application of glycerol dehydrogenase and soluble transhydrogenase in reverse micelles. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1192-1197, 2005.

IFTIKHAR, T. et al. Maximization of intracellular lipase production in a lipase-overproducing mutant derivative of *Rhizopus oligosporus* DGM 31: a kinetic study. **Food Technology Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 402-412, 2008.

ISO 12966-2 (2011). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. International Organization for Standardization, Switzerland.

JIN, G. et al. Use of a whole-cell biocatalyst to produce biodiesel in a water-containing system. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 44, n. 1, p. 21-28, 2009.

KAMINI, N. R. et al. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v.92, n. 8, p. 1591-1601, 2014.

KILONZO, P.; MARGARITIS, A.; BERGOUGNOU, M. Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3662-3672, 2011.

KWIATKOWSKA, B. et al. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, v.29, n. 6, p. 768-780, 2011.

LERIN, L. A. et al. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, n. 12, p. 2381-2394, 2014

LI, W.; DU, W.; LIU, D.; YAO, Y. Study on factors influencing stability of whole cell during biodiesel production in solvent-free and *tert*-butanol system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 2, p. 111–115, 2008b.

LINFIELD, W. M. et al. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 191- 195, 1984a.

LIU, Y. et al. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n. 4, p.402- 407, 2008.

LIU, S. Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 11, p. 923-945, 2004.

LÖNING, J.-M.; HORST, C.; HOFFMANN, U. Investigations on the energy conversion in sonochemical processes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.9, n. 3, p.169–179, 2002.

MAROTTI, Braz de Souza. **Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação na hidrólise de óleos vegetais**. 2016. 98 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JAFELICCI JÚNIOR, M. J. O efeito do ultrassom em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MENDES, A. A. et al. Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase vegetal. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1164-1169, 2013.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. 2009. 194 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, Pedro C.; DE CASTRO, Heizir F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal Of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciência Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p.214-234, 2011.

MIRANDA, O. A. et al. Lipase production by Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**, v. 69, n. 2, p. 145-147, 1999.

MOE, W. M.; IRVINE, R. L. Polyurethane foam based biofilter media for toluene removal. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 11, p. 35-42, 2001.

MOHAMED, S. A. et al. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 642-648, 2011.

MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F. Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, n. 1, p. 94-101, 2008.

MUHADIK, N. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

PALOMO, J. M. et al. Purification, immobilization, hiperactivation and stabilization of lipase by selective adsorption on hydrophobic supports. In: GUIBAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Madrid: Humana Press, v. 22, p.143-152, 2006.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolites production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189-259, 2004.

PAPAMICHAEL, E. M. et al. Effective kinetic methods and tools in investigating the mechanism of action of specific hydrolases. In: EKINCI D. **Medicinal chemistry and drug design**. Croatia: INTECH open science, 2012, p. 235-274.

- PHUAH, E.T. et al. Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 91–97, 2012.
- PEREIRA, E. B. et al. Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa*: A Comparative Study of the Free and the Immobilized Enzyme on Porous Chitosan Beads. **Appl Biochem Biotechnol**, v.91/93, p.739-752, 2001.
- PINTO, A.C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.6, 2005.
- PITT, J. I.; HOCKING, Ailsa D. **Fungi and food spoilage**. 3 ed. Nova York: Springer, 2009.
- PRENTKI, M.; MADIRAJU, S. R. Glycerolipid free fatty acid cycle and islet b-cell function in health, obesity and diabetes. **Mol. Cell. Endocrinol**, v. 353, n. 1-2, p. 88–100, 2012.
- RATHUD, V. K.; PANDIT, Anirudha B. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. **Biochemical Engineering Journal**, v.47, n. 1, p. 93-99, 2009.
- REIS, P. et al. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237-250, 2009.
- RINALDI, R. et al. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p.1374-1380, 2007.
- RIGO, E. et al. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137, 2010.
- RODRIGUES, R. C.; AYUB, Marco A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, 2011.
- ROMERO, C. M.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Catalytic properties of mycelium-bound lipases from *Aspergillus niger* MYA 135. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 4, p. 861–866, 2007.
- ROYON, D. et al. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **BioresourTechnol**, v.98, n. 3, p.648-653, 2007.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- SALAH, R. B. et al. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.
- SALIHU, A. et al. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v.58, p. 36-44, 2012.

SAMSON, R. A.; FRISVAD J. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, n. 49, p. 1–260, 2004.

SANTOS, R. R. dos. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v.391, n. 1-2, p. 427-435, 2011.

SCRIMGEOUR, C. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 6^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SECUNDO, F. et al. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, v. 39, n. 1-4, p. 166-170, 2006.

SHAHID, E. M.; JAMAL, Y. Production of biodiesel: A technical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, n. 9, p. 4732-4745, 2011.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93-100, 2013.

SILVA, A. J. et al. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93-98, 2006.

SOARES, M. S. **Síntese e caracterização de espumas de poliuretano para imobilização de células íntegras e aplicação na síntese de biodiesel**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

SONG, T-J. et al. Low levels of plasma omega 3-polyunsaturated fatty acids are associated with cerebral small vessel diseases in acute ischemic stroke patients. **Nutrition Research**, v. 35, n. 5, p. 368-374, 2015.

SOTO-VACA, A. et al. Differential effect of 14 free Fatty acids in the expression of inflammation markers on human arterial coronary cells. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, n. 42, p. 10074–10079, 2013.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzym Microb Technol.**, v. 33, n.1, p.97-103, 2003.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 219-224, 2008.

THANH, L.T. et al. A two-step continuous ultrasound assisted production of biodiesel fuel from waste cooking oils: A practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel. **Bioresource Technology**, v.101, n. 14, p. 5394-5401, 2010.

TISS, A. et al. Interfacial binding and activity of lipase at the lipid-water interface: effects of gum Arabic and surface pressure. **Colloids Surf. B: Biointerfaces**, v. 26, n. 1-2, p. 135-145, 2002.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

VELJKOVIC, V. B, et al. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 2, 1193-1209, 2012.

VOLL, F.A.P. **Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma**. 2011. 142f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2011.

WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, Y. J. et al. Lipase- catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. **Biotechnol. Bioeng**, v. 31, n. 6, p.628- 633, 1988.

WANG, Y. et al. Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1(Lecistase Ultra). **Food chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1066-1072, 2010.

YAN, J. et al. Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7154–7158, 2011.

YU, D. et al. Ultrasonic irradiation with vibration for biodiesel production from soybean oil by Novozym 435. **Process Biochemistry**, v.45, n. 4, p.519-525, 2010.

ZHONG, N. et al. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 228-232, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Caracterização bioquímica e cinética das células livres de *P. citrinum*.

Tabela A1 - Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função do pH para as células íntegras livres de *P. citrinum*.

pH	Atividade Lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
6,0	115,19	48,51
6,5	179,23	75,48
7,0	199,38	83,97
7,5	222,17	93,57
8,0	237,44	100

Fonte: do autor.

Tabela A2 - Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função da temperatura para as células íntegras livres de *P. citrinum*

Temperatura (°C)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
30	126,88	73,83
37	163,67	95,23
40	168,18	97,85
45	171,86	100
50	157,95	91,91
55	122,09	71,04

Fonte: do autor.

Tabela A3 - Evolução da atividade residual das células livres de *P. citrinum* em diferentes tempos incubadas a 60°C.

Tempo (min)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
0	170,04	100
15	152,08	89,44
30	131,73	77,47
60	120,45	70,83
90	84,37	49,62
120	79,15	46,55
150	65,45	38,49

Fonte: do autor.

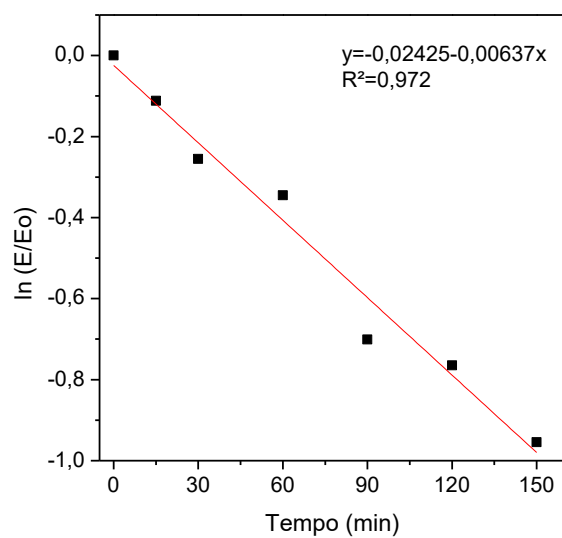


Figura A1 - Linearização para obtenção do k_D e $t_{1/2}$ das células livres de *P. citrinum*.

Fonte: do autor.

Tabela A4 - Evolução da atividade residual das células livres de *P. citrinum* em diferentes concentrações de ácidos graxos.

Concentração de ácido graxo (Mm)	Porcentagem de azeite de oliva (%)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
186	5	172,54	64,46
372	10	186,09	69,52
744	20	200,57	74,93
1488	40	226,58	84,64
1860	50	264,74	98,90
2232	60	267,68	100
2604	70	259,33	96,88

Fonte: do autor.

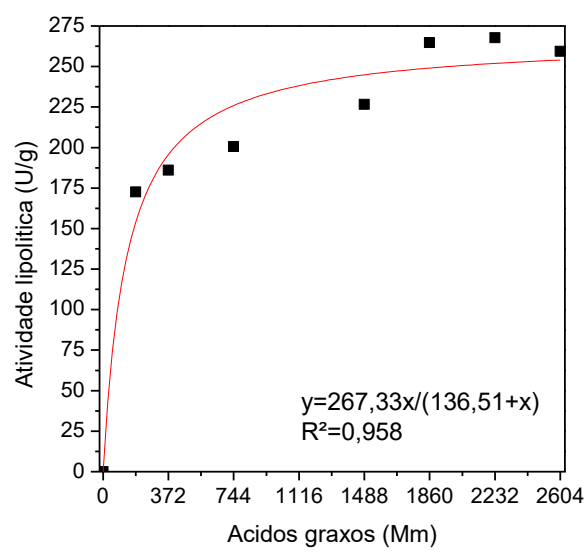


Figura A2 - Obtenção de k_M e $V_{m\acute{a}x}$ das células livres de *P. citrinum*.
Fonte: do autor.

APÊNDICE B - Caracterização bioquímica e cinética das células imobilizadas de *P. citrinum*.

Tabela B1 - Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função do pH para as células íntegras imobilizadas de *P. citrinum*

pH	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
6,0	70,98	32,09
6,5	80,09	36,22
7,0	107,44	48,58
7,5	147,04	66,49
8,0	221,14	100
8,5	196,24	88,74

Fonte: do autor.

Tabela B2 - Atividade lipolítica (U/g) e atividade relativa (%) em função da temperatura para as células íntegras imobilizadas de *P. citrinum*.

Temperatura (°C)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
30	83,72	74,42
37	94,27	83,80
40	112,49	100
45	87,16	77,48
50	86,51	76,90
55	81,29	72,26

Fonte: do autor.

Tabela B3 - Evolução da atividade residual das células imobilizadas de *P. citrinum* em diferentes tempos incubadas a 60°C.

Tempo (min)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
0	153,34	100
15	130,74	85,26
30	117,3	76,49
60	96,83	63,15
90	82,47	53,78
120	78,29	51,05
150	70,16	45,75

Fonte: do autor.

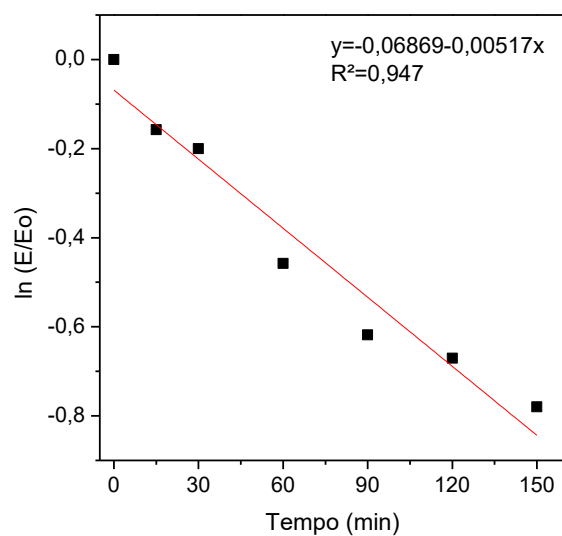


Figura B1 - Linearização para obtenção do k_D e $t_{1/2}$ das células imobilizadas de *P. citrinum*.
Fonte: do autor.

Tabela B4 - Evolução da atividade residual das células imobilizadas de *P. citrinum* em diferentes concentrações de ácidos graxos.

Concentração de ácido graxo (Mm)	Porcentagem de azeite de oliva (%)	Atividade lipolítica (U/g)	Atividade relativa (%)
186	5	68,02	57,14
372	10	86,16	72,38
558	15	95,55	80,27
744	20	100,73	84,62
1116	30	103,58	87,01
1488	40	114,11	95,86
1860	50	115,13	96,71
2232	60	119,04	100
2604	70	112,89	94,83

Fonte: do autor.

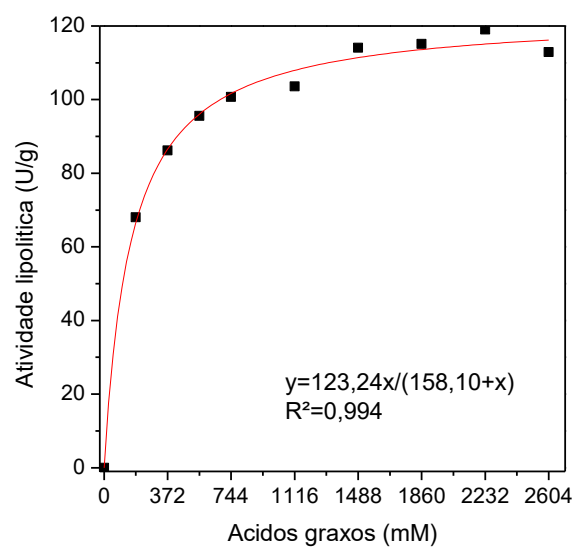


Figura B2 - Obtenção de K_m e V_{max} das células imobilizadas de *P. citrinum*.
Fonte: do autor.