

PRODUÇÃO DE EMULSIONANTES ATRAVÉS DA GLICERÓLISE DE ÓLEO DE BAGAÇO DE AZEITONA CATALISADA PELA LIPASE DA *CANDIDA RUGOSA* IMOBILIZADA EM ESPUMAS DE POLIURETANO

ANA CRISTINA VILAS BOAS CORREIA ¹
MARIA MANUELA REGALO FONSECA ²
MARIA SUZANA LEITÃO FERREIRA-DIAS ³

¹ Docente da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu e membro do CEER – Engenharia dos Biossistemas, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa – Portugal. (e-mail: anacorreia@esav.ipv.pt)

² Docente e membro do Centro de Engenharia Biológica e Química do Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa – Portugal. (e-mail: manuela.fonseca@ist.utl.pt)

³ Docente e membro do CEER – Engenharia dos Biossistemas, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa – Portugal. (e-mail: susanaf@isa.utl.pt)

Resumo

Os monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) são dos emulsionantes mais utilizados na indústria alimentar e farmacêutica.

Neste trabalho pretendeu-se selecionar preparações enzimáticas imobilizadas adequadas à biocatálise da glicerólise do óleo de bagaço de azeitona refinado em *n*-hexano para a produção de glicéridos parciais (MAG e DAG). Para tal, testaram-se duas preparações enzimáticas da *Candida rugosa* imobilizadas em espumas de poliuretano (Hypol) com diferentes aquafilicidade (FHP X4300 e FHP 2002).

A modelação e otimização da glicerólise foram efetuadas recorrendo à metodologia das superfícies de resposta. Os ensaios foram realizados em função da razão molar glicerol/triacilgliceróis e o valor da a_w inicial.

Os valores mais elevados de MAG (32%, m/m) e DAG (18%, m/m) foram obtidos quando a lipase se encontrava imobilizada em espuma de poliuretano FHP X4300.

Palavras-chave: monoacilgliceróis, diacilgliceróis, lipase, glicerólise, método de superfícies de resposta.

Abstract

In food and pharmaceutical industries, monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) are among the most important emulsifiers.

The aim of this study was to select adequate immobilized lipases to be used as catalysts for the glycerolysis of refined olive residue oil in *n*-hexane for the production of partial glycerides (MAG and DAG). The lipases from *Candida rugosa*, immobilized in two different biocompatible polyurethane foams (Hypol), with different aquaphilicities values, were tested (FHP X4300 e FHP 2002).

The modeling and optimization of glycerolysis was attempted via the Response Surface Methodology. The experiments were carried out as a function of the initial water activity (a_w) of the biocatalyst and the molar ratio glycerol/triglycerides.

The best MAG (32%, w/w) and DAG (18%, w/w) productions were achieved when the lipase was immobilized at FHP X4300 polyurethane foam.

Keywords: monoacylglycerols, diacylglycerols, lipase, glycerolysis, response surface methodology.

1. Introdução

Os alimentos que na sua constituição contêm gordura são geralmente emulsões (Becher, 1957). Uma emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em pelo menos um líquido imiscível disperso noutro sob a forma de gotículas. No entanto, este sistema apresenta uma grande instabilidade termodinâmica tendo tendência para regenerar as duas fases que lhe deram origem. Deste modo, a adição de agentes de superfície, como é o caso dos emulsionantes, vai diminuir essa tensão interfacial, promover a mistura homogênea e estabilizar as emulsões.

Os monoacilglicerois (MAG) e diacilglicerois (DAG), são dos emulsionantes mais utilizados na Indústria Alimentar (cerca de 70% da produção total) sendo amplamente utilizados na produção de margarinas, chocolates, gelados, molhos e massas (Fisher e Parker, 1988). Possuem ainda o estatuto GRAS (*Generally Recognized as Safe*, alimentos reconhecidos como seguros) atribuído pela FDA (*Food and Drugs Administration*, USA).

Quimicamente, os MAG e DAG são ésteres formados por ligação entre o glicerol e, um ou dois, ácidos gordos, respetivamente.

Ao nível industrial os MAG e DAG são obtidos por via química a partir da interesterificação dos triacilgliceróis (TAG) com glicerol (Gli) (glicerólise) na presença de catalisadores inorgânicos alcalinos a elevadas temperaturas (200-250°C) e pressões (5MPa) (Sonntag, 1982; Noureddini e Medikonduru, 1997). A via enzimática, com recurso a lipases como catalisadores, apresenta vantagens nomeadamente na redução dos efeitos poluentes, nos consumos de energia (condições moderadas de pressão e temperatura), na eliminação de reações secundárias indesejáveis e no aumento do rendimento (Armstrong e Yamazaki, 1986; Rosu *et al.*, 1997).

Os TAG, principais constituintes dos óleos e gorduras, são os substratos naturais das lipases e quimicamente são ésteres de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácidos gordos.

A reação da glicerólise catalisada por catalisadores químicos baseia-se nas seguintes reações em cadeia (Sonntag, 1982):



Logo, a reação global será:



O mecanismo geral da glicerólise por via enzimática consiste inicialmente na hidrólise de uma ligação éster no glicérido com libertação de ácido gordo livre, seguida da esterificação desse ácido gordo ao glicerol (Macrae, 1985; Goderis *et al.*, 1987; Heisler *et al.*, 1991; Zu-Yi e Ward, 1993; Ferreira-Dias e Fonseca, 1995).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) que atuam sobre a ligação éster de vários compostos e que se encontram amplamente na natureza, podendo ser obtidas a partir de várias fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases de origem microbianas apresentam, presentemente, uma enorme aplicabilidade (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998). As lipases não específicas, como é o caso da *Candida rugosa*, quebram as moléculas dos TAG produzindo ácidos gordos livres (AGL), Gli, MAG e DAG como produtos intermédios. A lipase da *Candida rugosa* tem sido utilizada industrialmente na produção de biodisel e modificações de óleos (Nandi *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2008).

A produção de emulsionantes por via enzimática só poderá competir com a via química se a lipase for imobilizada, de modo a permitir a sua reutilização ou utilização em reatores contínuos, com consequente redução dos custos do biocatalisador. Com a imobilização consegue-se ainda proteger a lipase da ação de alguns compostos inibitórios, pela criação dum micro ambiente propício à atividade enzimática (Persson *et al.*, 2002). A imobilização do biocatalisador pode ser efetuada recorrendo a métodos químicos, físicos ou por ambos, de modo que as moléculas da lipase fiquem retidas tornando-se insolúveis em meio aquoso.

Os poliuretanos têm sido muito utilizados como suportes enzimáticos nas reações em meio orgânico devido à sua resistência aos solventes orgânicos. Na imobilização em espumas de poliuretano a lipase fica retida na estrutura porosa da matriz por meio de ligações covalentes (Kennedy e Cabral, 1987). A lipase da *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano tem sido empregue, com grande sucesso, em reações de esterificação do ácido butírico com etanol (Pires-Cabral *et al.*, 2007), glicerólise e hidrólise do azeite (Ferreira-Dias e Fonseca, 1995; Balcao *et al.*, 1996).

O bagaço de azeitona é um subproduto da extração do azeite que pode conter ainda 8 a 12% (m/m) gordura (Uzzan, 1996) e que apresenta uma composição química muito semelhante à do azeite. Ambas as gorduras provêm da polpa da azeitona, sendo o azeite extraído por meios físicos, enquanto o óleo de bagaço de azeitona é obtido recorrendo a solventes orgânicos. A utilização do óleo de bagaço de azeitona na obtenção de produtos com maior valor acrescentado (como é o caso dos emulsionantes) poderá ser uma alternativa para a sua rentabilização.

Com este trabalho pretendeu-se modelar a reação de glicerólise de óleo de bagaço de azeitona refinado, em *n*-hexano, catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada em duas espumas de poliuretano de diferentes hidrofiliidades para a produção de compostos (MAG e DAG) com características emulsionantes.

2. Materiais e Métodos

Materiais: Óleo de Bagaço de Azeitona refinado, cedido por José Carvalho Coimbra, Portugal; lipase da *Candida rugosa* (lipase AY) oferta da Amano, Reino Unido; dois pré-polímeros de poliuretano de diferentes hidrofiliidades Hypol (FHP X4300 e FHP 2002, com aquafiliidades de 2,8 e 3,7, respetivamente) oferecidos pela Hampshire Chemical GmbH, Alemanha.

Imobilização: A lipase (350mg) foi imobilizada em espumas de poliuretano preparadas a partir de 0,4g e 0,6g de pré-polímero de FHP X4300 e FHP 2002, respetivamente (Ferreira-Dias *et al.*, 1999). As preparações foram utilizadas a diferentes valores de atividade da água (a_w), conseguidas por secagem em estufa sob pressão reduzida. A a_w foi avaliada, a

30°C, num higróscopo munido de sensor de humidade de cloreto de lítio, ROTRONIC HYGROSKOP DT (DMS-100H).

Reação de glicerólise: A lipase imobilizada nas espumas foi adicionada a 12 cm³ de um sistema reacional constituído por uma solução a 30% (m/v) de óleo de bagaço de azeitona refinado em *n*-hexano e quantidades variáveis de glicerol. Os ensaios decorreram em reatores cilíndricos (50 cm³) sob agitação magnética, a 30°C (temperatura inferior à do ponto de fusão dos MAG). Após 24 horas de reação foram retiradas amostras do meio orgânico onde se analisaram os TAG não consumidos e os produtos de glicerólise presentes.

Para a modelação da reação de glicerólise recorreu-se à metodologia das superfícies de resposta (RSM) que se baseia em delineamentos experimentais adequados de modo a abranger o máximo das situações possíveis com um pequeno número de ensaios selecionando as variáveis operatórias com efeito significativo na reação, modelar e otimizar as condições que maximizam a produção de MAG e DAG. Os ensaios foram realizados segundo uma matriz “Central Composite Rotatable” (CCDR) (Vuataz, 1986), em função da razão molar glicerol/triacilgliceróis (Gli/TAG) (0,5-2,0), e do valor de a_w inicial das espumas (FHP X4300: 0,37-0,91; FHP 2002: 0,24-0,91).

Métodos analíticos: Os DAG e TAG foram separados por cromatografia em camada fina e quantificados por cromatografia gasosa (GC) sob a forma de ésteres metílicos dos ácidos gordos constituintes (FAME) recorrendo a um GC CARLO ERBA modelo VEGA 6000 série 2, munido com uma coluna capilar SupelcoTM 2380 (60m de comprimento; 0,25mm de diâmetro interno; 0,20µm de espessura de filme), um injetor com divisão de fluxos e um detetor de ionização de chama (FID). O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio com uma pressão à entrada da coluna de 60kPa. O injetor e o FID encontravam-se a 250°C e a coluna sujeita a uma temperatura constante de 230°C. Os AGL, resultantes de eventual hidrólise dos glicéridos e do mecanismo de glicerólise enzimática, foram quantificados pelo método de Lowry e Tinsley (1976) modificado e os MAG foram calculados por via indireta (Ferreira-Dias e Fonseca, 1993).

3. Resultados e discussão

As produções de glicéridos parciais pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada nas espumas de poliuretano, a diferentes valores de a_w e Gli/TAG, encontram-se nas figuras 1 e 2 para os MAG e nas figuras 3 e 4 para os DAG.

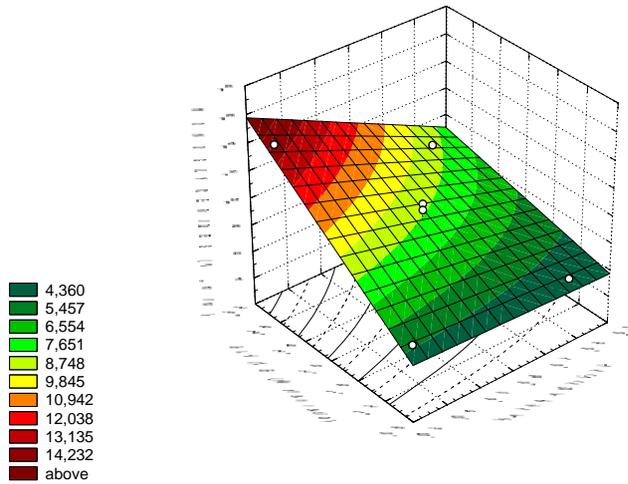


Fig. 1 - Superfícies de resposta ajustadas aos pontos experimentais da produção de monoacilgliceróis (MAG) durante a glicerólise do óleo de bagaço de azeitona em *n*-hexano catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada na espuma FHP 2002, em função da razão molar Gli/TAG e de a_w inicial das espumas.

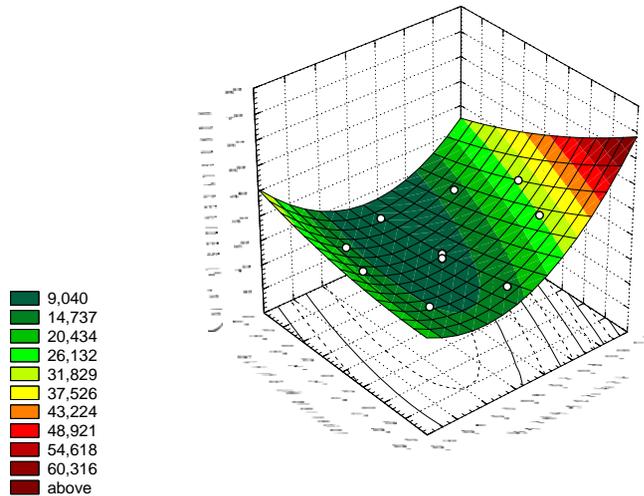


Fig. 2 - Superfícies de resposta ajustadas aos pontos experimentais da produção de monoacilgliceróis (MAG) durante a glicerólise do óleo de bagaço de azeitona em *n*-hexano catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada na espuma FHP X4300, em função da razão molar Gli/TAG e de a_w inicial das espumas.

Quando se utilizou a lipase em FHP X4300, as produções de MAG e DAG puderam ser descritas por modelos polinomiais de segunda ordem, correspondentes a uma superfície côncava (Fig. 2) e em sela (Fig. 4), respetivamente.

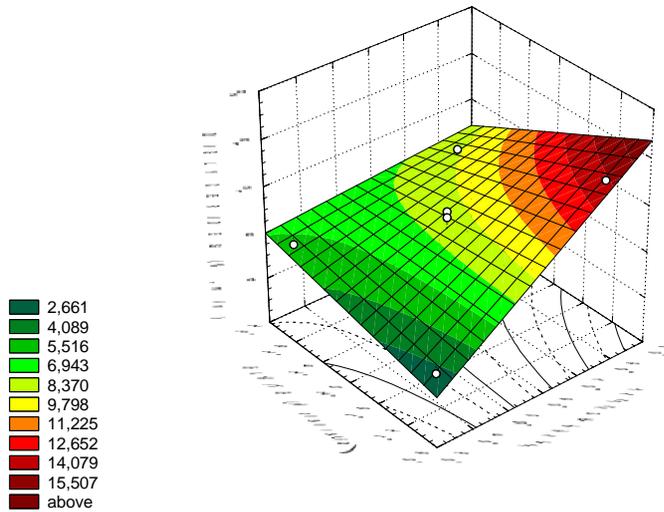


Fig. 3 - Superfícies de resposta ajustadas aos pontos experimentais da produção de diacilgliceróis (DAG) durante a glicerólise óleo de bagaço de azeitona em *n*-hexano catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada na espuma FHP 2002, em função da razão molar Gli/TAG e de a_w inicial das espumas.

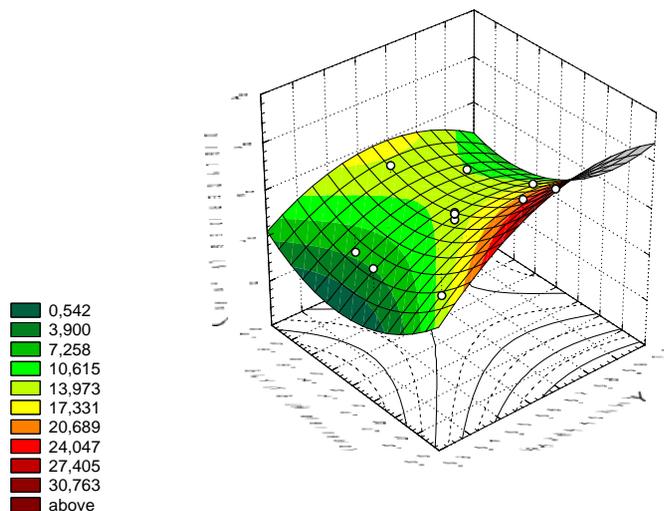


Fig. 4 - Superfícies de resposta ajustadas aos pontos experimentais da produção de diacilgliceróis (DAG) durante a glicerólise do óleo de bagaço de azeitona em *n*-hexano catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada na espuma FHP X4300, em função da razão molar Gli/TAG e de a_w inicial das espumas.

Com a lipase em FHP 2002, as conversões em MAG e DAG foram descritas por polinômios de primeira ordem (superfícies planas) (Fig. 1 e 3). A conversão em MAG observada com a lipase na espuma FHP X4300 (32%, m/m) foi superior à obtida com a lipase na FHP 2002 (14%, m/m). Essa diferença pode ser explicada pela diferença de valores de aquafilicidade das espumas pois, sendo o glicerol um composto hidrofílico, terá tendência para migrar preferencialmente para o interior da espuma de maior aquafilicidade (FHP 2002) (Ferreira-Dias e Fonseca, 1995). Tal poderá ocasionar no microambiente condições de inibição da lipase e/ou dificultar o acesso dos substratos hidrofóbicos, como é o caso do óleo de bagaço de azeitona.

Com a espuma FHP X4300, verifica-se um mínimo na produção de MAG para valores de a_w cerca de 0,5 (Fig.2). Abaixo e acima desse valor de a_w ocorreu um aumento da produção de MAG, que poderá resultar da predominância da reação de glicerólise para valores baixos e da reação de hidrólise para valores mais altos. Nos sistemas de a_w elevada as reações de esterificação são reprimidas e os MAG presentes provêm fundamentalmente da reação de hidrólise (Ferreira-Dias e Fonseca, 1995).

A maior produção de DAG, observada com a lipase imobilizada em FHP X4300 (fig. 4), coincidiu com o mínimo na produção de MAG (Fig. 2). É possível que, para valores intermédios de a_w a conversão de DAG em MAG seja um passo limitante da reação (compromisso entre a reação de hidrólise e a da glicerólise).

Nas duas preparações enzimáticas observou-se uma elevada produção de AGL (20%, m/m), para valores elevados de a_w e razões molares de Gli/TAG baixas.

4. Conclusão

A lipase da *Cândida rugosa* imobilizada nas espumas de poliuretano FHP X4300 foi a matriz que se mostrou mais adequada para a produção de MAG e DAG. Com esta preparação enzimática a uma a_w inicial de 0,83, conseguiu-se uma conversão de 62% (m/m) dos TAG, com produção de 32% (m/m) de MAG e 18% de DAG (m/m), após 24 horas de reação, quando a razão Gli/TAG foi de 1, enquanto que na preparação cuja lipase se encontrava imobilizada em FHP 2002, a conversão dos TAG foi apenas 36% (m/m).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armstrong, D. W., Yamazaki, H. (1986). Natural flavours production: A biotechnological approach. *Trends in Biotechnol.*, 4: 264-268.
- Balcao, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X. (1996). Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol.*, 18: 392-416.
- Becher, P. (1957). *Emulsions: Theory and Practice*. American Chemical Society Monograph, n.º 135, Reinhold, New York.

- Ferreira-Dias, S., da Fonseca, M. M. R. (1993). Enzymatic glycerolysis of olive oil: a reactional system with major analytical problems. *Biotechnol. Technol.*, 7 (7): 447-452.
- Ferreira-Dias, S., da Fonseca, M. M. R. (1995). Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: effect of water activity. *Bioprocess Eng.*, 12 (5): 327-337.
- Ferreira-Dias, S., Correia, A. C., Baptista, F. O. (1999). Activity and batch operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in different hydrophilic polyurethane foams during hydrolysis in a biphasic medium. *Bioprocess Eng.*, 21: 517-524.
- Fisher, L. R., Parker, N. S. (1988). Effect of surfactants on the interactions between emulsion droplets, In: E. Dickinson, G. Stainsby (Eds.). *Advances in Food Emulsions and Foams*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 45-90.
- Goderis, H. L., Ampe, G., Feyten, M. P., Fouwé, B. L., Guffens, W. M., Van Cauwenbergh, S. M., Tobback, P. P. (1987). Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnol. Bioeng.* 30 (2): 258-266.
- Heisler, A., Rabiller, C., Hublin, L. (1991). Lipase catalysed isomerisation of 1,2-(2,3)-diglyceride into 1,3-diglyceride. The crucial role of water. *Biotechnol. Lett.*, 13 (5): 327-332.
- Kazlauskas, R. J., Bornscheuer, U. T. (1998). Biotransformations with Lipases. In: H. J. Rhem, P. Stader (Eds.), *A Multi Comprehensive Treatise Biotechnology*, 8: 37-191.
- Kennedy, J. F., Cabral, J. M. S. (1987). Enzyme immobilization in biotechnology. In: H. J. Rhem, G. Reed (Eds.). *Enzyme Technology*, 7: 347-404.
- Lowry, R. R., Tinsley, I. J. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53 (7): 470-472.
- Macrae, A. R. (1985). Interesterification of fats and oils. In: J. Tramper, H.C. van der Plas, P. Linko (Eds.). *Biocatalysis in Organic Syntheses*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 195-208.
- Nandi, S., Gangopadhyay, S., Ghosh, S. (2005). Production of medium chain glycerides from coconut and palm kernel fatty acid distillates by lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb Technol.*, 36: 725-728.
- Nouredini, H., Medikonduru, V. (1997). Glycerolysis of Fats and Methyl Esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 (4): 419-425.
- Persson, M., Mladenoska, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. (2002). Preparation of lipases for use in organic solvents. *Enzyme Microb Technol.*, 31: 833-841.
- Pires-Cabral, P., da Fonseca, M. M. R., Ferreira-Dias, S. (2007). Modelling the production of ethyl butyrate catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams. *Biochem Eng J.*, 33 (5): 327-337.
- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y., Yamane, T. (1997). Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74: 148-158.
- Shao, P., Meng, X., He, J., Sun, P. (2008). Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. *Food Bioprod Process.*, 86: 283-289.
- Sonntag, N. O. V. (1982). Fat splitting, esterification, and interesterification, In: D. Swern (Ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, volume 2. 4th edition. John Wiley & Sons, pp. 97-173.
- Uzzan, A. (1996): Olive Oil, In: A. Karleskind and J. P. Wolff (Eds.). *Oils and Fats Manual – A Comprehensive Treatise. Properties, Production, Applications*. Intercept Ltd.: pp. 783-788.
- Vuataz, L. (1986). Response Surface Methodology, In: J. R. Piggott (Ed.). *Statistical Procedures in Food Research*. Elsevier Applied Science, London & New York, pp. 101-123.
- Zu-Yi, L., Ward, O. P. (1993). Stability of microbial lipase in alcoholysis of fish oil during repeated enzyme use. *Biotechnol. Lett.* 15 (4): 393-398.

Recebido: 10 de fevereiro de 2011.

Aceite: 20 de maio de 2011.