

# **Tratamento enzimático para a valorização do óleo de bagaço de azeitona bruto: Produção de lípidos estruturados, biodiesel e 2-monoacilgliceróis**

**Ana Sofia Santos Caeiro Martins**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Coorientador: Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório

**Júri:**

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Professora adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria.

Doutora Natália Maria Ferreira Rebelo de Melo Osório, Professora adjunta da Escola Superior de Tecnologia do Barreiro do Instituto Politécnico de Setúbal.

À memória da minha avó Maria

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de expressar os meus agradecimentos aos que me apoiaram durante o meu percurso e contribuíram para a realização deste trabalho.

À União de Cooperativas Agrícolas do Sul - UCASUL - pela cedência de amostras de óleo de bagaço de azeitona bruto.

À Novozyme A/S, Dinamarca e ao grupo do Professor Francisco Valero de Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha pela cedência das lipases.

À minha orientadora Professora Suzana Ferreira Dias pelo conhecimento científico transmitido, pela disponibilidade e paciência, bem como a acessibilidade, simpatia e motivação que me concebeu.

À minha coorientadora Professora Natália Osório, pelo conhecimento científico transmitido, pelo apoio no laboratório e pela sua simpatia.

À técnica de laboratório Joana Granja pelo incansável apoio e disponibilidade durante o decorrer das análises de laboratório.

À Diana Faria e Catarina Lopes pela disponibilidade na resolução dos problemas relativos ao cromatógrafo gasoso.

Às minhas melhores amigas Laura Freitas e Catarina Perdigão pelo total apoio, pela motivação e pelo carinho.

Ao Jónatas Laranjeira pelo apoio constante, pela motivação e paciência.

Finalmente à minha família, em especial à minha mãe e à minha irmã, pelo incentivo constante, paciência e apoio ao longo de todo o meu percurso.

A todos o meu sincero Obrigada!

## Resumo

O presente estudo teve como objetivo principal valorizar o óleo de bagaço de azeitona bruto (OBAB) com acidez de 7% m/m, com teores elevados de produtos de oxidação ( $K_{232}$ :4,77 e  $K_{270}$ :2,06) e de clorofilas totais (374 mg feofitina a /kg de óleo) utilizando-o para produção, por catálise enzimática com lipases *sn*-1,3 seletiva, de lípidos estruturados dietéticos, com valor calórico reduzido (~ 5 kcal/g) e de ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) e 2-monoacilgliceróis (2-MAG). Os lípidos estruturados foram obtidos por acidólise OBAB com ácido caprílico (C8:0) ou interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (C8 Etil) razão molar óleo/ácido ou óleo/éster de 1:2 a 40°C e em meio livre de solvente. Testaram-se como biocatalisadores as lipases comerciais imobilizadas *sn*-1,3 regio-seletivas de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) e lipases de *Rhizopus oryzae* comercial (c-ROL) e não comercial (r-ROL) por nós imobilizadas em nanopartículas ferromagnéticas (MNP). A Lipozyme TL IM e a Lipozyme RM IM revelaram preferência por acidólise com C8:0, com rendimentos em novos TAG de 54% e de 60%, após 4h e 6h, respetivamente. O rendimento em novos TAG por interesterificação com C8 Etil catalisada pela Lipozyme TM IM foi de 42% ao fim de 48h e pela Lipozyme RM IM foi de 54% ao fim de 24h. Os ensaios de acidólise por c-ROL e r-ROL imobilizadas em MNP obtiveram um rendimento em novos TAG de apenas 14% e 20%, respetivamente.

O biodiesel e 2-MAG foram obtidos por transesterificação de OBAB com metanol catalisada pelas lipases Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, na ausência de solvente, com adição fracionada de metanol (razão molar óleo/álcool = 1:2), a 40°C durante 48h. Ambas as lipases testadas, permitiram obter um rendimento em FAME de 81% e de 20% de 2-MAG após 3h de reação.

**Palavras-Chave:** Óleo de bagaço de azeitona bruto, Nanopartículas ferromagnéticas, Lipase, Biodiesel, Lípidos estruturados.

## Abstract

The aim of this study was to value the crude olive pomace oil (OBAB) with an acidity of 7%, high contents of oxidation products ( $K_{232}$ : 4.77 and  $K_{270}$ :2.06) and chlorophyll pigments (374 mg feofitin a /kg oil) using it for the production of dietary structured lipids with reduced caloric value (~ 5 kcal/g) fatty acids methyl esters (biodiesel) and 2-monoacylglycerols (2-MAG) by enzymatic catalysis using *sn*-1,3 regioselective lipases. Structured lipids were obtained by acidolysis of OBAB with caprylic acid (C8:0) or by interesterification with ethyl octanoate (C8 Etil), in the absence of a solvent, at 40°C for 48 h, using a molar ratio oil/acid or oil/ester of 1:2. Commercial immobilized *sn*-1,3 regioselective lipases from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) and *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) and commercial (c-ROL) and noncommercial *Rhizopus oryzae* (r-ROL) were tested as biocatalysts. Both c-ROL and r-ROL were immobilized by us in magnetic nanoparticles (MNP). Lipozyme TL IM and Lipzyme RM IM showed preference for acidolysis of OBAB with C8:0, with yield in new TAG of 54% after 4h and 60% after 6h, respectively. New TAG yields obtained by interesterification with C8 Etil catalyzed by Lipozyme TM IM was 42% after 48h and 54% after 4h reaction, when Lipozyme RM IM was used. Acidolysis reactions catalyzed by c-ROL and r-ROL immobilized in MNP only yield of 14% and 20% in new TAG, respectively.

The production of biodiesel and 2-monoacylglycerols (2-MAG) were obtained by transesterification of OBAB with methanol catalyzed by Lipozyme TL IM and Lipozyme RM IM, in solvent-free media, using stepwise methanol addition (molar ratio of oil/alcohol of 1:2) at 40°C for 48h.

Yield in FAME of 81% and 20% of 2-MAG was observed with both lipases after 3h of alcoholysis.

**Keywords:** Olive pomace oil, Magnetic nanoparticles, Lipase, Biodiesel, Structured Lipids.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE QUADROS.....	IX
ABREVIATURAS .....	X
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS .....	2
<b>Objetivo principal:</b> .....	<b>2</b>
<b>Objetivos específicos:</b> .....	<b>3</b>
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
<b>3.1 Lípidos</b> .....	<b>4</b>
3.1.1 Triacilgliceróis.....	4
3.1.2 Ácidos gordos.....	5
3.1.3 Ácidos gordos – Ácidos gordos essenciais .....	7
3.1.4 Absorção e metabolismo lípidico.....	8
<b>3.2 Lípidos estruturados</b> .....	<b>9</b>
3.2.1 Catálise química.....	11
3.2.2 Catálise enzimática .....	11
3.2.2.1 Parâmetros que influenciam a catálise enzimática .....	13
3.2.2.2 Imobilização das enzimas.....	14
3.2.3 Produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico .....	15
<b>3.3 Biodiesel</b> .....	<b>17</b>

<b>3.4 Azeite e subprodutos</b> .....	<b>18</b>
3.4.1 Processo de Extração de Azeite .....	19
3.4.1.1 Sistema clássico .....	20
3.4.1.2 Sistema de 3 fases .....	20
3.4.1.3 Sistema de duas fases.....	21
<b>3.5 Resíduos e Subprodutos</b> .....	<b>21</b>
3.5.1 Águas rússas .....	22
3.5.2 Bagaço de azeitona húmido .....	22
<b>3.6 Valorização dos subprodutos</b> .....	<b>23</b>
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2.1 Caracterização do óleo de bagaço de azeitona</b> .....	<b>25</b>
4.2.1.1 Determinação da acidez .....	25
4.2.1.1.1 Materiais.....	25
4.2.1.1.2 Reagentes .....	26
4.2.1.1.3 Procedimento .....	26
4.2.1.2 Determinação de produtos de oxidação .....	26
4.2.1.2.1 Materiais e equipamentos .....	27
4.2.1.2.2 Reagentes .....	27
4.2.1.2.3 Procedimento .....	27
4.2.1.3 Clorofilas totais.....	28
4.2.1.3.1 Materiais e equipamento.....	28
4.2.1.3.2 Reagentes .....	28
4.2.1.3.3 Procedimento .....	28
4.2.1.4 Caracterização cromática .....	29
4.2.1.4.1 Materiais e equipamentos .....	29
4.2.1.4.2 Reagente.....	29
4.2.1.4.3 Procedimento .....	29
<b>4.2.2 Preparação dos biocatalisadores imobilizados em nanopartículas ferromagnéticas</b> .....	<b>31</b>
4.2.2.1 Síntese das nanopartículas ferromagnéticas.....	31
4.2.2.1.1 Materiais e equipamentos.....	31
4.2.2.1.2 Reagentes .....	31
4.2.2.1.3 Procedimento para a produção das nanopartículas ferromagnéticas.....	31
4.2.2.1.4 Procedimento para o revestimento das nanopartículas .....	32
4.2.2.1.4 Procedimento de imobilização das lipases nas MNP .....	33

<b>4.2.3. Caracterização dos biocatalisadores .....</b>	<b>34</b>
4.2.3.1 Atividade hidrolítica.....	34
4.2.3.1.1 Material e equipamento .....	34
4.2.3.1.2 Preparação de emulsão.....	34
4.2.3.1.3 Procedimento .....	34
4.2.3.2 Determinação de proteínas totais .....	35
4.2.3.2.1 Materiais e Métodos .....	35
4.2.3.2.2 Reagente.....	35
4.2.3.2.3 Procedimento .....	35
<b>4.2.4 Reações de acidólise e de interesterificação para produção de lípidos estruturados .....</b>	<b>36</b>
4.2.4.1 Materiais.....	36
4.2.4.2 Reagente.....	36
4.2.4.3 Procedimentos .....	36
<b>4.2.5 Produção de biodiesel (FAME) através da reação de transesterificação. ....</b>	<b>37</b>
4.2.5.1 Materiais e equipamento.....	37
4.2.5.2 Reagentes.....	37
4.2.5.3 Procedimento .....	37
<b>4.2.6 Derivatização e cromatografia gasosa .....</b>	<b>37</b>
4.2.6.1 Materiais e equipamentos .....	38
4.2.6.2 Reagentes.....	38
4.2.6.3 Procedimento .....	38
<b>4.2.7 Quantificação dos compostos.....</b>	<b>39</b>
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Caracterização do óleo de bagaço de azeitona .....</b>	<b>45</b>
5.1.1 Determinação da acidez e produtos de oxidação .....	45
5.1.2 Determinação de cor, caracterização cromática e teor de pigmentos clorofilinos.....	46
<b>5.2 Caracterização da imobilização.....</b>	<b>48</b>
5.2.1 Determinação da atividade hidrolítica .....	48
5.2.2 Determinação de proteínas totais .....	48
<b>5.3 Produção de lípidos estruturados por acidólise e interesterificação.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4 Utilização de lipases imobilizadas em MNP.....</b>	<b>53</b>
<b>5.5 Produção de biodiesel catalisada por lipases comerciais .....</b>	<b>54</b>
<b>VI. CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 57

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Esquematização da reação de acidólise ou de interesterificação, catalisada por lipase sn-1,3 regio-seletiva, do óleo de bagaço de azeitona com ácido caprílico ou com éster de ácido caprílico. ....	17
<b>Figura 2</b> – a) Representação do procedimento de produção das nanopartículas ferromagnéticas antes da admissão dos reagentes. b) Aparecimento de uma cor escura indica que a reação ocorreu. ....	32
<b>Figura 3</b> - Representação de decantação magnética das nanopartículas após revestimento...33	
<b>Figura 4</b> - Determinação da densidade das partículas de MNP revestidas. ....	33
<b>Figura 5</b> - Representação dos picos, no cromatograma, correspondentes ao ácido caprílico (C8:0), ácido oleico (C18:1), padrão interno monononadecanoína (PI Mono C19) e trioleína (OOO).....	40
<b>Figura 6</b> - Cromatograma relativos ao ensaio de acidólise de óleo de bagaço com ácido caprílico (C8:0) catalisada por Lipozyme TL IM, no tempo zero e após 4 horas. ....	42
<b>Figura 7</b> - Diagrama de cromaticidade C.I.E. ....	47
<b>Figura 8</b> - Curva de calibração que relaciona a concentração de proteína ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) com a absorvância a 595nm.....	49
<b>Figura 9</b> - Evolução do rendimento em novos TAG (%) de baixo valor calórico obtidos pela reação de acidólise com ácido caprílico (A) e interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (B), ao longo de 48h, catalisadas pelas enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, em meio sem solvente, a 40°C.....	51
<b>Figura 10</b> – Conversão de TAG (%) obtidos pela reação de acidólise com ácido caprílico (A) e interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (B), ao longo de 48h, catalisadas pelas enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM em meio sem solvente. ....	52
<b>Figura 11</b> - Evolução do rendimento em novos TAG (%) de baixo valor calórico obtidos pela reação de acidólise ao longo de 48h em meio sem solvente, catalisadas pelas enzimas imobilizadas em MNP não comercial r-ROL e comercial c-ROL.....	53
<b>Figura 12</b> - Cinética de transesterificação de óleo de bagaço de azeitona bruto com metanol catalisada pela enzima comercial Lipozyme TL IM (A) e pela enzima comercial Lipozyme RM IM (B). ....	54

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Composição em ácido gordos (%) do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o Regulamento (CE) nº1989/2003.....	24
<b>Quadro 2</b> - Valor de acidez e coeficientes de extinção específicos $K_{232}$ e $K_{270}$ da amostra de óleo de bagaço de azeitona bruto. ....	45
<b>Quadro 3</b> - Características cromáticas do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o sistema CIE e teor de pigmentos clorofilinos. ....	46
<b>Quadro 4</b> - Atividade hidrolítica da c-ROL e r-ROL imobilizadas em MNP e o rendimento de imobilização. ....	48
<b>Quadro 5</b> - Valores de proteína nas diferentes soluções e o rendimento de imobilização. ....	49

## Abreviaturas

**AG** - Ácidos gordos

**AGL** - Ácido gordo livre

**ALA** - Ácido alfa-linolénico (do inglês *α-linolenic acid*)

**APTES** - 3-aminopropiltriethoxissilano (do inglês *aminopropyltriethoxysilane*)

**a<sub>w</sub>** - Atividade da água

**CBO** - Carência química de oxigénio

**CLA** - Ácido linoléico conjugado (do inglês *conjugated linoleic acid*)

**CQO** - Carência química

**DAG** - Diacilgliceróis

**DHA** - Ácido docosahexaenoico (do inglês *docosahexaenoic acid*)

**EPA** - Ácido eicosapentaenóico (do inglês *eicosapentaenoic acid*)

**FAME** - Ésteres metílicos de ácidos gordos (do inglês *fatty acid methyl esters*)

**GLA** - Ácido gama-linolénico (do inglês *gamma linolenic acid*)

**HAP** - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

**HCl** - Ácido clorídrico

**LA** - Ácido linoléico (do inglês *linoleic acid*)

**LCFA** - Ácidos gordos de cadeia longa (do inglês *long chain fatty acid*)

**MAG** - Monoacilgliceróis

**MCFA** - Ácidos gordos de cadeia média (do inglês *medium chain fatty acid*)

**MNP** - Nanopartículas ferromagnéticas (do inglês *magnetic nanoparticles*)

**MUFA** - Ácidos gordos monoinsaturados (do inglês *monounsaturated fatty acid*)

**OBA** - Óleo de bagaço de azeitona

**OBAB** - Óleo de bagaço de azeitona bruto

**PGE1** - Prostaglandina E1

**PUFA** - Ácidos gordos polinsaturados (do inglês *polyunsaturated fatty acid*)

**SCFA** - Ácidos gordos de cadeia curta (do inglês *short chain fatty acid*)

**SFA** - Ácidos gordos saturados (do inglês *saturated fatty acid*)

**SL** - Lípidos estruturados (do inglês *structured lipids*)

**TAG** - Triacilgliceróis

**VLCFA** - Ácidos gordos de cadeia muito longa (do inglês *very long chain fatty acids*)

## I. Introdução

Atualmente é notória uma mudança no paradigma do setor alimentar, iniciando-se uma preocupação generalizada pelo impacto dos alimentos na saúde humana. Verifica-se uma consciencialização dos alimentos funcionais, isto é, alimentos cujas suas características apresentam um benefício para a saúde. Um dos alimentos é o azeite, o sumo extraído do fruto da oliveira, *Olea europea* L., caracterizado pelo elevado teor em ácido oleico, uma gordura insaturada que ajuda a contribuir para a manutenção de colesterol e a prevenção de doenças cardiovasculares (Carluccio *et al.*, 1999). Como consequência verifica-se o aumento de consumo de azeite e o aumento de interesse pelo setor alimentar e industrial em produzir azeite, atingindo um aumento de 40% de produção na última de década (Aggoun *et al.*, 2016).

Associado à produção de azeite está a formação de resíduos e subprodutos como as águas rússas e o bagaço de azeitona húmido, que ao serem indevidamente tratados apresentam um forte impacto negativo para o ecossistema. As águas rússas caracterizam-se pela água residual originada durante o processo de extração, que dependendo da tecnologia utilizada no processo, sistema contínuo de duas fases ou de três fases, a quantidade produzida é 3,6 L ou de 90,1 L por 100 kg de azeitona laborada, respetivamente (Di Giovacchino *et al.*, 2001). Este tipo de efluente apresenta uma elevada carga orgânica e um caráter ácido, que ao ser descarregado de forma descontrolada e sem tratamento promove o desequilíbrio ambiental, ameaçando a vida aquática e contaminação de cursos de água superficiais e subterrânea (Martins, 2016). O bagaço de azeitona consiste num resíduo sólido, dos lagares clássicos ou lagares descontínuos de três fases, ou semi-sólido, dos lagares contínuos de duas fases, sendo constituído maioritariamente pela polpa e película da azeitona, sementes - “caroço” - e alguma água de vegetação (Moral *et al.*, 2006). Em termos de composição, o bagaço de azeitona proveniente de lagares de duas fases caracteriza-se por ter elevada humidade devido à presença de água (55-70%), azeite retido na polpa (2,5-3,5%) e quantidades de lenhinha, celulose e matéria orgânica como proteínas, ácidos gordos livres, açúcares e pigmentos. A quantidade produzida deste subproduto também depende do tipo de sistema utilizado. Para o sistema de duas fases a quantidade média de bagaço obtida é de 74 kg por 100 kg de azeitonas e de 3 fases é de 54 kg por 100 kg de azeitona, respetivamente (Di Giovacchino *et al.*, 2001; Martins, 2016).

Deste modo a indústria de extração do azeite tem um enorme destaque na sustentabilidade ambiental, devido à quantidade e à dificuldade em tratar os

subprodutos e resíduos gerados (Caputo *et al.*, 2003). Este problema poderá refletir-se numa excelente oportunidade para as indústrias investirem em alternativas para valorizar os subprodutos gerados durante a extração de azeite, originando novos produtos com valor comercial.

A forma tradicional de valorização do bagaço de azeitona bruto, passa pela recuperação do óleo contido e a posterior utilização de bagaço seco extractado (após a recuperação do óleo), para alimentação animal e/ou como combustível das caldeiras, com o intuito de produzir vapor de água. É de salientar que as sementes contidas no bagaço têm um elevado poder calorífico, com valores entre os 14-18 MJ/kg (Caputo *et al.*, 2003), servindo frequentemente de combustível para as caldeiras dos lagares. A recuperação do óleo, no bagaço de azeitona húmido, consiste numa secagem prévia (para atingir 8% de humidade) seguida de uma extração com solvente - *n*-hexano. O *n*-hexano é um hidrocarboneto apolar que apresenta uma elevada seletividade para o material lipídico, permitindo assim a separação do óleo dos restantes compostos não lipídicos. Durante esta etapa obtém-se a micela que consiste na solução de óleo em *n*-hexano. O óleo bruto e o solvente orgânico são recuperados individualmente por destilação posterior (Sebadelhe, 2008).

O óleo de bagaço de azeitona bruto (OBAB) apresenta uma coloração escura devido à formação de compostos corados durante o processo de secagem do bagaço a temperaturas elevadas, e também pela capacidade de extracção destes compostos pelo solvente orgânico. Devido ao contacto com o *n*-hexano ocorre a extração de material insaponificável em quantidade considerável, bem como de ceras, esteróis totais, diálcoois triterpénicos como o eritrodíol e o uvaol, em quantidades muito superiores às existentes no azeite (Angerosa, 1997; Sebadelhe, 2008).

O óleo de bagaço só pode ser consumido após um processo de refinação e cerca de 90% do óleo de bagaço produzido, em Portugal, destina-se à exportação.

## **II. Objetivos**

### **Objetivo principal:**

O presente estudo tem como objetivo principal valorizar o óleo de bagaço de azeitona bruto utilizando-o diretamente para produção, por catálise enzimática com lipases *sn*-1,3 seletivas, de (i) lípidos estruturados dietéticos, com valor calórico reduzido (~ 5 kcal/g) por acidólise com ácido caprílico (C8:0) ou por interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (C8 Etil) e de (ii) ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel; FAME=*fatty acid methyl esters*) e 2-monoacilgliceróis (2-MAG) por transesterificação com metanol.

### Objetivos específicos:

- Caracterizar o óleo de bagaço de azeitona bruto em termos de acidez, produtos de oxidação, caracterização cromática e clorofilas totais. Esta caracterização é importante para perceber o estado químico em que se encontra a amostra de OBAB, o qual pode influenciar a atividade catalítica dos biocatalisadores utilizados;
- Produzir nanopartículas ferromagnéticas para utilizar como suportes de imobilização das lipases *sn*-1,3 seletivas de *Rhizopus oryzae* (ROL) comercial (c-ROL) e produzida pelo grupo do Professor Francisco Valero, da Universidade Autónoma de Barcelona (r-ROL). Estes biocatalisadores serão testados como alternativa às lipases comerciais imobilizadas, de elevado custo;
- Produzir lípidos estruturados do tipo MLM por acidólise de óleo de bagaço de azeitona bruto com ácido caprílico (C8:0) e por interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (C8 Etil) catalisadas por lipases comerciais (Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM) e pelas lipases c-ROL e r-ROL imobilizadas em nanopartículas ferromagnéticas, de modo a selecionar o melhor biocatalisador e sistema.
- Produzir biodiesel (FAME) através da reação de transesterificação do óleo de bagaço de azeitona bruto com metanol (MeOH) catalisada pelas lipases comerciais imobilizadas *sn*-1,3 seletivas;
- Obter 2-monoacilgliceróis (2-MAG), um emulsionante com interesse para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética, como subproduto da produção de biodiesel catalisada pelas lipases comerciais imobilizadas *sn*-1,3 seletivas;

### **III. Revisão bibliográfica**

#### **3.1 Lípidos**

Os lípidos são biomoléculas quimicamente diversas, abrangendo uma família heterogênea de biomoléculas complexas que apresentam uma característica comum que é a elevada insolubilidade na água, e em contrapartida, apresentam solubilidade em diversos solventes orgânicos (Nelson & Cox, 2008). Exemplo destas biomoléculas são os fosfolípidos, esteróis, esfingolípidos, ácidos gordos, pigmentos, vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K).

As suas funções biológicas são tão diversas como a sua complexidade química. São os principais elementos estruturais da bicamada nas células (fosfolípidos), desempenham funções de absorção da luz (pigmentos) e apresentam um elevado valor energético, tendo uma relação direta com o armazenamento de energia no organismo. Também são a principal fonte de ácidos gordos (AG) essenciais, como por exemplo ácido linoléico e ácido alfa-linolénico. Estes AG não são sintetizados pelo organismo humano sendo necessário adquiri-los através da dieta.

Podem ser classificados, com base na sua estrutura, como derivados, simples ou complexos.

i) Lípidos derivados são a base para a formação de moléculas mais complexas e correspondem aos ácidos gordos (AG), álcoois, hidrocarbonetos e esteróis, apresentando-se desta forma ou resultado da hidrólise de lípidos complexos.

ii) Lípidos simples são formados por ácidos gordos e álcoois, englobam os acilgliceróis (ésteres de ácidos gordos com glicerol), esteróis, ésteres e ceras.

iii) Lípidos complexos englobam os fosfolípidos, glicolípidos e esfingolípidos, tem na sua base, ácidos gordos, álcoois e fosfato.

##### **3.1.1 Triacilgliceróis**

Os triacilgliceróis (TAG) são lípidos simples, compostos por três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol através de uma ligação éster. Caso os três ácidos gordos sejam do mesmo tipo, são designados por triacilgliceróis simples e o nome designado é conforme o ácido gordo contido, por exemplo, tripalmitina e trioleína. Na natureza o mais comum é a presença de dois ou até três tipos diferentes de ácidos gordos a formar os TAG (Nelson & Cox, 2008). As propriedades físicas e químicas, metabolismo e propriedades nutricionais dos TAG dependem da composição dos ácidos gordos, do grau e da posição das insaturações.

Os óleos e gorduras são formados maioritariamente por (TAG) cerca de 95-99% (Chow, 2008; Ferreira-Dias, 2010). A diferença entre óleo e gordura consiste no estado físico à temperatura ambiente (20°C). Sendo considerados óleos quando se apresentam líquidos e gorduras quando sólidos.

Nos vertebrados ocorre o armazenamento dos TAG, no formato de gotículas de gordura, no tecido adiposo sendo posteriormente utilizados como fonte de energia. Nas plantas são armazenados como óleo, fornecendo energia e precursores biossintéticos durante a germinação das sementes. A vantagem de os organismos usarem os triacilgliceróis como fonte de energia, é que a hidrólise do mesmo produz mais energia por grama do que a hidrólise de glucose. Além disso, os TAG são hidrofóbicos e não precisam de ser hidratados, ou seja, o organismo não necessita de armazenar água para hidratação como ocorre no armazenamento de glicogénio (Lodish *et al.*, 2003; Nelson & Cox, 2008).

Através de reações de hidrólise, nos óleos e gorduras, pode ocorrer a presença, embora em quantidades menores, de diacilgliceróis (DAG), dois ácidos gordos ligados ao glicerol, monoacilgliceróis (MAG) um ácido gordo ligado ao glicerol, e ácidos gordos livres (AGL) (Ferreira-Dias, 2010).

### **3.1.2 Ácidos gordos**

Os ácidos gordos são compostos por ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia de hidrocarbonetos que pode variar entre 4 a 36 carbonos (C4 – C36) apresentando ligações duplas ou simples, entre os carbonos, que representam o grau de insaturação. As características físicas e/ou químicas específicas, como a solubilidade em água e o ponto de fusão, dos ácidos gordos (ou dos compostos que contêm) são determinadas pelo comprimento da cadeia e o grau de insaturação (Nelson & Cox, 2008). Quanto maior for a cadeia e menor ligações duplas, menor será a solubilidade em água e maior ponto de fusão.

Como referido os ácidos gordos são classificados conforme o comprimento da cadeia de carbonos e quanto ao grau de insaturação.

Quanto às ligações duplas ou simples na cadeia de carbonos, os ácidos gordos classificam-se em (EUFIC, 2014; Chow, 2008):

Ácidos gordos saturados (*Saturated Fatty Acid* – SFA) quando possuem apenas ligações simples;

Ácidos gordos monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acid* – MUFA) quando apresentam apenas uma ligação dupla;

Ácidos gordos polinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acid* – PUFA) quando possuem duas ou mais ligações.

Nos ácidos gordos insaturados (mono e polinsaturados) ainda há uma segunda classificação conforme a conformação *cis* ou *trans* das ligações duplas. Na conformação *cis* as moléculas de hidrogénio encontram-se ligadas no mesmo lado enquanto na *trans* encontram-se em lados opostos. A maior parte dos ácidos gordos insaturados contém conformação *cis* embora ocorra a existência de ácidos gordos *trans* de forma natural através da fermentação no rúmen de animais ruminantes ou de forma industrial através de processos de hidrogenação de óleos e gorduras (EUFIC, 2014; Chow, 2008; Nelson & Cox, 2008).

Em relação ao comprimento da cadeia e independente do grau de insaturações classificam-se em (EUFIC, 2014):

Ácidos gordos de cadeia curta (*Short Chain Fatty Acid* – SCFA) quando possuem entre dois a cinco carbonos na cadeia;

Ácidos gordos de cadeia média (*Medium Chain Fatty Acid* – MCFA) entre seis a doze carbonos na cadeia;

Ácidos gordos de cadeia longa (*Long Chain Fatty Acid* – LCFA) entre os treze e a vinte e um carbonos na cadeia;

Ácidos gordos de cadeia muito longa (*Very Long Chain Fatty Acids* - VLCFA) mais do que vinte e dois carbonos na cadeia.

Os ácidos gordos podem ser representados pela abreviatura x:y, onde x indica o número de átomos de carbono e y o número de ligações duplas. Além disso, existem duas formas de nomear os ácidos gordos, a) nomenclatura em que é atribuído o número 1 ao carbono do terminal carboxilo e alfa ( $\alpha$ ) ao seguinte carbono, neste caso as ligações duplas são representadas por delta ( $\Delta$ ) seguido por números que indicam as posições das ligações na cadeia de carbonos a partir do terminal carboxilo; b) nomenclatura alternativa, para os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) em que atribuí o número 1 ao carbono do terminal metil sendo este denominado por ómega ( $\omega$ ), as ligações duplas são indicadas a partir do carbono ómega (Nelson & Cox, 2008).

Atendendo a nomenclatura, os PUFA podem ser classificados em três famílias, a) ómega-3, apresentando a primeira ligação dupla no terceiro carbono a partir do terminal metil e incluem o ácido alfa-linolénico ( *$\alpha$ -linolenic acid* – ALA; 18:3n-3,) e os seus derivados, ácido eicosapentaenóico (*eicosapentaenoic acid* - EPA; 20:5n-3) e ácido

docosahexaenóico (*docosahexaenoic acid* - DHA; 22:6n-3), b) ómega-6, possuem a primeira ligação dupla no sexto carbono e incluem o ácido linoléico (*linoleic acid* – LA; 18:2n-6) e derivado araquidónico (*Arachidonic acid* - AA; 20:4n-6), ácido linoléico conjugado (*conjugated linoleic acid* – CLA) e ácido gama-linolénico (*gamma linolenic acid* – GLA), c) ómega-9, ácidos que têm a primeira ligação no nono carbono e incluem o ácido oleico.

### 3.1.3 Ácidos gordos essenciais

Os ácidos polinsaturados ómega-3 e ómega-6 desempenham um papel importante na nutrição humana, sendo considerados ácidos gordos essenciais, dado que não são sintetizados pelo organismo humano sendo necessário adquiri-los através da dieta.

A partir de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) podem sintetizar os seus derivados, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) contudo a taxa de conversão destes derivados é baixa, sendo importante consumir alimentos ricos nestes compostos. Os ácidos EPA e DHA encontram-se essencialmente em óleos de animais marinhos. Estudos indicam que estes ácidos essenciais têm benefícios na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro e hipertensão. Observações da população de Esquimós na Gronelândia indicam uma baixa tendência de doenças cardiovasculares associada ao elevado consumo de peixe (Chow, 2008; Carlier *et al.*, 1991). O DHA é ainda associado ao desenvolvimento do cérebro em crianças e do sistema nervoso, como o seu normal funcionamento em adultos. Um défice de DHA na dieta está associado a problemas na aprendizagem (Horrocks & Yeo, 1999).

O ácido linoléico conjugado (CLA), são misturas de isómeros geométricos e de posição do ácido linoléico que contêm ligações duplas (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 CLA) são produzidos através de uma biohidrogenação devido à presença de bactérias, como *Butyrivibrio fibrisolvens*, no rúmen de ruminantes (Parodi, 1994; Khanal & Olson, 2004; Chow, 2008) estando presentes no leite e na carne. Estudos indicam que o consumo deste ácido ómega-6 têm benefícios para a saúde, devido aos seus efeitos na redução de obesidade, anticarcinogénicos e antiateroscleróticos (Khanal & Olson, 2004).

O ácido gama-linolénico (GLA) pode ser produzido no organismo a partir do metabolismo do ácido linoléico (LA), devido a ação da enzima  $\Delta$ -6-desaturase, contudo a reação é lenta e pode ser inibida por fatores como o stress, tabaco ou défice de vitaminas e minerais na alimentação. O GLA consumido, presente em algumas plantas, é rapidamente transformado em ácido di-homo- $\lambda$ -linolénico (DGLA), que é incorporado e funciona como precursor do ácido 15-hidroxil-di-homo- $\lambda$ -linolénico e da prostaglandina

1 (PGE1) tendo efeitos antiinflamatórios e antitrombóticos (Horrobin, 1992; Kapoor & Huang, 2006).

Como referido anteriormente estes ácidos gordos desempenham um papel importante na nutrição humana, já que o organismo requer, mas não têm a capacidade de sintetizar. O consumo destes ácidos deverá ser numa proporção dietética ideal, entre 1:1 a 4:1, de ómega-6/ómega-3. Verifica-se que na população norte americana, o consumo chega à proporção 30:1, este desequilíbrio provoca o efeito contrário levando ao aumento de doenças cardiovasculares (Nelson & Cox, 2008; Chow, 2008). Contrariamente a dieta mediterrânea está associada a um baixo risco de doenças cardiovasculares, devido ao consumo de alimentos ricos em ómega-3 como por exemplo a sardinha, salmão e cavala.

### **3.1.4 Absorção e metabolismo lipídico**

A digestão e absorção dos lípidos é um processo complexo e de múltiplas etapas. A composição dos AG, a posição dos átomos de carbono e o grau de insaturações são responsáveis por diferentes propriedades físicas e químicas, que resultam em diferentes propriedades fisiológicas e consequentemente a distribuição dos AG pelo organismo é afetada.

A digestão inicia-se na boca, onde os alimentos são misturados com a lipase lingual e segue-se a hidrólise pela lipase gástrica no estômago. Ambas as enzimas hidrolisam SCFA na posição *sn*-3 produzindo assim diacilgliceróis e ácidos gordos livres. A maior parte dos SCFA são diretamente absorvidos no estômago e transportados para a circulação venosa e alguns AGL são transportados para o fluxo portal (Chow, 2008). A rápida absorção dos SCFA está relacionada com o facto destes ácidos serem voláteis, hidrossolúveis e de baixo peso molecular. Além destes fatores, os SCFA apresentam valor calórico baixo, o que é benéfico para o controlo de obesidade (Osborn & Akoh, 2002; Ferreira-Dias, 2010). Os SCFA encontram-se principalmente na gordura do leite bovino.

Os MCFA são hidrolisados pela lipase gástrica e transportados pela veia porta até ao fígado, dado ao seu tamanho e a elevada solubilidade comparada com os LCFA. No fígado os MCFA são rapidamente metabolizados, usados assim como fonte rápida de energia e como não sofre reesterificação em TAG, não são acumulados nos tecidos adiposos do organismo, o que é adequado para o controlo de obesidade. No entanto, os MCFA podem aumentar os níveis de colesterol no sangue (Osborn & Akoh, 2002; Ferreira-Dias, 2010) e não são fontes de ácidos gordos essenciais, o que não se deve restringir a dieta apenas de MCFA.

Os LCFA são transportados para o lúmen do intestino em micelas, devido à sua elevada hidrofobicidade não são transportados nem absorvidos na corrente sanguínea (Osborn & Akoh, 2002). No lúmen do intestino, os LCFA são hidrolisados rapidamente devido a existência do complexo lipase pancreática e colipase (que é ativada por tripsina), onde ocorre a libertação de ácidos gordos livre e 2-monoacilgliceróis (2-MAG) (Carlier *et al.*, 1991; Chow, 2008; Erlanson-Albertsson, 1983), posteriormente os 2-MAG sofrem reesterificação e formam novos TAG que são incorporados em *quilomicrons*, que são partículas formadas maioritariamente por TAG, fosfolípidos, colesterol livre e apolipoproteínas. Estas partículas são excretadas para o sistema linfático e posteriormente transportadas para a veia cava superior, onde entram para a corrente sanguínea. Alguns TAG, presentes nos *quilomicrons* sofrem hidrólise devido há presença da lipoproteína lipase, libertada pelas células endoteliais capilares, libertando-se os AGL e 2-MAG, que são absorvidos pelo tecido periférico ou seguem para o fígado (Chow, 2008).

### 3.2 Lípidos estruturados

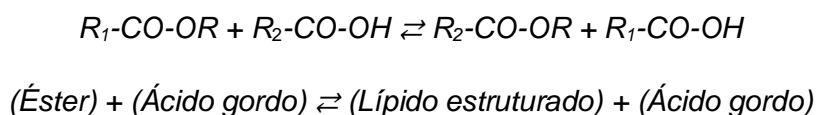
Dietas desequilibradas com elevado consumo de gorduras saturadas e o sedentarismo, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Gunstone, 2008). Para combater esta tendência, tem havido um aumento da procura de gorduras “naturais” e mais saudáveis, surgindo os lípidos estruturados (*Structured Lipids* - SL). Consistem em TAG que sofrem modificações na sua composição natural, através da: i) reestruturação da composição e/ou da distribuição posicional (*sn*-1,2,3) de AG já existentes no esqueleto do glicerol, ii) incorporação de novos ácidos gordos (Osborn & Akoh, 2002) com recursos a métodos químicos (catálise química) ou enzimáticos (catálise enzimática) (Smith, 2015; Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

Ao ocorrer estas transformações específicas consequentemente ocorre alterações nas propriedades físico-químicas, apresentando vantagens nutricionais e dietéticas (Smith, 2015) uma vez que as propriedades funcionais e nutricionais dos lípidos dependem da relação AG saturados e insaturados, do comprimento das cadeias e da distribuição (Nunes *et al.*, 2011). De modo geral as modificações dos TAG têm como objetivo melhorar i) características físicas, tais como ponto de fusão específico, polimorfismo ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\beta'$ ), viscosidade e/ou ii) químicas, como a estabilidade oxidativa mas também iii) nutricionais, menor valor calórico 5-7 kcal/g, maior digestibilidade e absorção de AG a nível do intestino (Akoh, 1995; Fomuso & Akoh, 1997; Osborn & Akoh, 2002; Chow, 2008; Gunstone, 2008; Smith, 2015; Ferreira-Dias *et al.*, 2019).

Os principais grupos de SL conhecidos e com aplicação na indústria alimentar são: i) Sucedâneos de gordura de leite materno – *Human milk fat substitutes* (HMFS) do qual um dos exemplos conhecidos é a *INFAT®* da *Advanced Lipids*; ii) Sucedâneos de manteiga de cacau – *Cocoa butter equivalents* (CBE); iii) produção de gorduras de baixo valor calórico – *Low calorie and dietetic triacylglycerols*; iv) TAG enriquecidos com ácidos gordos de cadeia média ou com ácidos gordos essenciais. (Ferreira-Dias *et al.*, 2019),

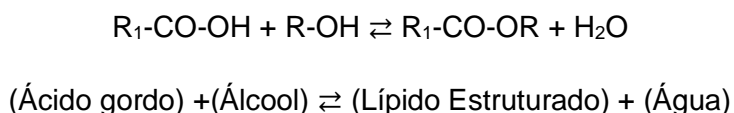
Como referido, para a obtenção dos SL, é necessário que ocorra modificações nos TAG, sendo possível através das seguintes reações e de acordo com o substrato usado:

i) Acidólise química ou enzimática, em que ocorre a troca de um éster e um ou uma mistura de AGL de modo a substituir os AG no éster original. Ocorre maioritariamente na produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico, com recurso a catálise enzimática.



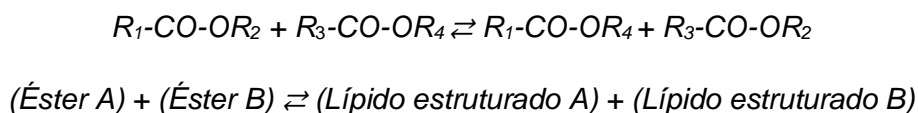
Equação 1.

ii) Esterificação traduz-se pela reação entre um álcool e um ácido gordo, originando um éster com libertação de água.



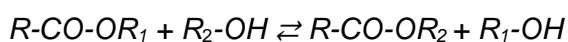
Equação 2.

iii) Interesterificação química ou enzimática, ocorre um rearranjo dos ácidos gordos no glicerol.



Equação 3.

iv) Transesterificação, consiste na reação entre um álcool (metanol, etanol e glicerol) com um éster para formar um diferente éster. A reação também se pode designar conforme o álcool usado, como por exemplo, metanólise.





Equação 4.

### 3.2.1 Catálise química

Como referido as modificações nos TAG para a produção de SL, podem ser obtidas através da catálise química com recurso à utilização de um catalisador químico não seletivo, sendo que a reação de interesterificação química é a mais usual.

O catalisador químico, como não apresenta seletividade a troca dos AG na molécula de glicerol dos TAG ocorre de forma aleatória, já que as ligações éster são hidrolisadas também de forma aleatória. A reação para decorrer necessita de temperaturas elevadas, pressões reduzidas e em condições anidras (Smith, 2015; Osborn & Akoh, 2002; Xu, 2000). As desvantagens associadas à catálise química são principalmente o elevado consumo energético durante a reação; produção de reações secundárias com formação de produtos secundários, com posterior necessidade de purificação para remover os subprodutos; contaminação dos produtos finais (Marangoni & Rousseau, 1995; Smith, 2015; Ferreira-Dias *et al.*, 2019)

A vantagem da catálise química apresenta-se com maior viabilidade económica, facilidade para aplicação em processos industriais e o custo dos catalisadores químicos é menor comparado com o das enzimas.

Exemplos de alguns lípidos estruturados, provenientes da catálise química, são: i) *Caprenin*® originalmente produzida por *Procter & Gamble*, consistia na interesterificação de ácido caprílico, cáprico e docosanóico (beénico) na molécula de glicerol, originando um SL com 5 kcal/g em vez do valor convencional das gorduras. Tinha como objetivo a substituição da manteiga de cacau para a produção de chocolates, atualmente não se encontra no mercado ii) *Benefat*® também conhecida por *Salatrim* desenvolvido por *Nabisco Foods Group* e licenciado para *Cultor Food Science*. Também é um SL com valor calórico baixo, que consiste numa mistura de SCFA e pelo menos um LCFA, interesterificados aleatoriamente na molécula de glicerol. Em 1995 a *Benefat*® foi introduzida em pepitas de chocolate por *Hershey Foods Corporation*. (Akoh, 1996; Chow, 2008; Xu, 2000; Osborn & Akoh, 2002).

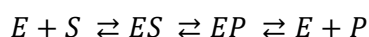
### 3.2.2 Catálise enzimática

As alterações na molécula dos TAG também podem seguir a via enzimática com recurso a enzimas.

As enzimas são proteínas, com exceção de um grupo específico, que têm a capacidade de acelerar a velocidade das reações energeticamente favoráveis ( $-\Delta G$ ), ao diminuir a energia de ativação da reação, sem que estas sejam consumidas (Nelson & Cox, 2008; Mohamad *et al.*, 2015).

A atividade catalítica das enzimas depende totalmente da integridade nativa das estruturas da proteína e algumas requerem cofatores, normalmente substâncias inorgânicas,  $Mg^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$ , e/ou coenzimas, como derivados de vitaminas, formando complexos enzimáticos designados por holoenzimas. Além da integridade da estrutura, a atividade enzimática também é influenciada por outros fatores, tal como, a temperatura, a atividade da água ( $a_w$ ), pH, presença de compostos inibidores (Osborn & Akoh, 2002).

A reação ocorre devido a existência de centro-ativos na enzima, que contêm resíduos de aminoácidos que ligam ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, no final obtêm-se a enzima e o produto. A reação enzimática pode ser descrita na seguinte equação.



Equação 5.

Em que E, S e P, representam a enzima, substrato e produto, respetivamente. ES e EP, representam o complexo formado entre enzima-substrato e enzima-produto, respetivamente. Como representado, a reação é bidirecional, já que a enzima pode catalisar a reação no sentido  $S \rightarrow P$ , como no sentido oposto  $P \rightarrow S$  (Lortie, 1997).

As enzimas são classificadas segundo o tipo de reação que catalisam, a classificação segue o sistema de nomenclatura E.C – *Enzyme Commission*, com os correspondentes números, sendo representado da seguinte forma:

E.C.

- i) primeiro número corresponde às classes das enzimas, havendo 6 classes;
- ii) segundo número corresponde à subclasse;
- iii) terceiro à sub-subclasse;
- iv) último corresponde ao número dentro da sub-subclasse.

As enzimas utilizadas para a modificação dos lípidos, designam-se por lipases, com o nome sistemático triacilglicerol acil-hidrolase, E.C. 3.1.1. 3., também conhecida por triacilglicerol lipases, pertencem à classe das hidrolases (E.C. 3), tendo a capacidade de hidrolisar a ligação éster (E.C. 3.1.) de ésteres carboxílicos (E.C. 3.1.1) numa

interface lípido/água (Ferreira-Dias *et al.*, 2019). Em meio com baixa  $a_w$ , as lipases têm também a capacidade de catalisar reações de interesterificação e esterificação, nesta última reação é necessário que ocorra a remoção da água libertada para aumentar o rendimento da reação (Osborn & Akoh, 2002).

As lipases podem ser classificadas em dois grupos, i) as que apresentam especificidade em relação às posições dos ácidos gordos – *sn*-1,3 regioespecífica – e ii) as que não apresentam especificidade em relação às posições e a troca dos AG na molécula de glicerol dos TAG ocorre de forma aleatória (Xu, 2000; Ferreira-Dias *et al.*, 2019; Marangoni & Rousseau, 1995).

A utilização destes biocatalisadores apresenta vantagens na produção de SL comparativamente à utilização dos catalisadores químicos. Apresentam alta i) regioseletividade (*sn*-1,3 regioesletiva), sendo que a troca dos AG na molécula TAG é conhecida e controlada; ii) as condições de reação são menos exigentes, utilização de pressão atmosférica e temperaturas inferiores a 70°C; iii) baixo consumo energético; iv) baixa formação de subprodutos com facilidade de purificação; v) obtenção de produtos que podem ser considerados como “naturais”, quando em meio livre de solvente, vi) as lipases não precisam de cofatores e vii) o número de operações é menor (Ferreira-Dias *et al.*, 2019). As desvantagens, na aplicação nas indústrias, estão associadas ao facto da possibilidade de inativação do biocatalisador, taxas de reação lentas e o elevado custo do biocatalisador, embora se possa compensar através da imobilização de enzimas reduzindo dessa forma os custos.

### **3.2.2.1 Parâmetros que influenciam a catálise enzimática**

A atividade enzimática é influenciada por vários fatores como o pH, intervalo de temperatura, concentração do substrato, presença de metais pesados, de produtos de oxidação dos lípidos e da atividade da água (Peterson *et al.*, 2007; Nelson & Cox, 2008). Estes fatores podem levar à inativação da enzima através da desnaturação (perda da conformação original da enzima), separação das subunidades ou agregação das enzimas (Polakovič & Bálež, 1998).

O valor de pH está diretamente relacionado com a origem das lipases. Lipases de origem bacteriana apresentam atividade enzimática a pH alcalino enquanto que as lipases de origem fúngica apresentam atividade a um pH ligeiramente ácido (Soumanou *et al.*, 2013).

A temperatura também está relacionada com a origem das lipases, organismos termófilos apresentam lipases cuja sua atividade enzimática ocorre a temperaturas

superiores a 80°C embora a maioria das lipases apresentam um intervalo de temperatura entre os 25°C e os 50°C, sendo as lipases de origem microbiana mais termoestáveis (Soumanou *et al.*, 2013; Nelson & Cox, 2008). O aumento de temperatura favorece a atividade da enzima até um valor ótimo, após esse valor, a taxa de desnaturação aumenta inativando-a de forma reversível ou irreversível (Malcata *et al.*, 1990). A imobilização das enzimas pode aumentar a estabilização térmica entre os 60 a 70° C das enzimas (Soumanou *et al.*, 2013). As lipases *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM) apresentam termorresistência após imobilização.

A ausência de água no meio provoca a inativação das enzimas, para que ocorra a reação é necessário que exista, no mínimo, quantidades vestigiais de água. O funcionamento das enzimas requer a presença de água para que o centro-ativo das enzimas fique disponível para o substrato (Soumanou *et al.*, 2013). Cada enzima tem exigências específicas em relação à quantidade de água no sistema para manterem a atividade enzimática.

### **3.2.2.2 Imobilização das enzimas**

A imobilização de enzimas consiste na fixação das enzimas em suportes, recorrendo à replicação do sistema presente nas membranas celulares. Apresenta-se como uma alternativa economicamente favorável comparativamente ao uso de enzimas solúveis, tendo como principais vantagens: i) facilidade na recuperação das enzimas e do produto; ii) reutilização das enzimas em sistemas descontínuos; iii) maior estabilização das enzimas em relação às alterações de temperatura, pH e impurezas iv) redução de reações secundárias sem produção de subprodutos; desta forma a imobilização permite a redução de custo (Krajewska, 2004; Mohamad *et al.*, 2015). Contudo, a imobilização pode apresentar alguns inconvenientes como a i) perda da atividade enzimática, devido a desnaturação ou mudanças conformacionais, durante o processo; ii) tempos de reações lentos; iii) estabilização enzimática diminuir; iv) impossibilidade de interação com o substrato dado ao centro-ativo se encontrar bloqueado (Mateo *et al.*, 2007; Chakraborty *et al.*, 2016; Krajewska, 2004).

Existem vários métodos para a imobilização, embora podem ser classificados de duas formas: físicos em que existem interações fracas, como as ligações de hidrogénio ou forças de *Van der Waals*, entre o suporte e a enzima e químicos onde ocorrem ligações covalentes. Nos físicos estão incluídos os métodos de i) microencapsulamento com suporte sólido ou líquido; ii) inclusão ou aprisionamento em gel; iii) adsorção numa matriz. Nos químicos estão os métodos de a) ligação covalente numa matriz; b)

*crosslinking* com um reagente de baixo peso molecular; c) *co-crosslinking* com substâncias neutras (Krajewska, 2004; Mohamad *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2016; Jegannathan *et al.*, 2008).

Estes métodos podem ser utilizados de forma individual ou uma combinação, dependendo da enzima a utilizar, da aplicação que se pretende e do suporte.

O método físico mais usual é a adsorção, em que consiste no contacto da enzima dissolvida com o suporte, por tempo determinado, ocorrendo a formação de ligações de baixa energia, como as forças *Van der Waal* entre a enzima e o suporte devido as diferenças de energia entre cada membrana (Mohamad *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2016; Mateo *et al.*, 2007). Este método apresenta-se vantajoso devido à facilidade de execução, perda de atividade enzimática baixa e a possibilidade de recuperação da enzima ou do suporte após a reação, sendo uma imobilização reversível. Geralmente é usado suportes sólidos porosos, devido à elevada superfície de contacto que permite elevada distribuição das enzimas e a criação de microambientes protetores às alterações do meio (Krajewska, 2004; Guisan, 2006).

Um dos suportes promissores são as nanopartículas magnéticas (*magnetic nanoparticles* – MNP) devido i) elevada área de superfície específica; ii) menor resistência à transferência de massa devido ao tamanho dos poros ser pequeno; iii) não apresenta toxicidade; iv) facilidade de separação através da aplicação de um campo magnético; v) reutilização (Wang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Alex *et al.*, 2014). A imobilização em MNP já é aplicada nas área de saúde, aplicadas no âmbito da imobilização de medicamentos, proteínas, enzimas e anticorpos (Guisan, 2006; Can *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2003; Tartaj *et al.*, 2003) sendo possível ser aplicado na área alimentar para a obtenção de lípidos estruturados.

### **3.2.3 Produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico**

Os lípidos estruturados de baixo valor calórico, consoante a posição e tipo de ácidos gordos presentes nos TAG podem agrupar-se em três tipos:

- i) TAG com ácidos gordos de cadeia curta (SCFA) nas posições externas *sn-1* e *sn-3* e um ácido gordo de cadeia longa (LCFA) na posição interna *sn-2*, conhecidos por TAG do tipo SLS;
- ii) TAG com ácidos gordos de cadeia média (MCFA) nas posições externas e ácido de cadeia longa na posição interna, designados por TAG do tipo MLM;

iii) TAG que apresentam apenas ácidos de cadeia média nas três posições, TAG do tipo MMM.

Os TAG do tipo MLM apresentam um valor calórico baixo 5-7kcal/g comparativamente com os lípidos convencionais (9kcal/g) (Akoh, 1996; Ferreira-Dias, 2010; Caballero *et al.*, 2014; Ferreira-Dias *et al.*, 2019). São rapidamente metabolizados pelo fígado, dado terem ácidos de cadeia média nas posições externas *sn*-1,3, que são metabolizados de forma diferente do que os ácidos gordo de cadeia longa (Smith, 2015; Finley *et al.*, 1994; Fomuso & Akoh, 1997; Caballero *et al.*, 2014) não são acumulados como gordura no corpo (Yankah & Akoh, 2000) e são fonte de ácidos gordos essenciais associados ao ácido gordo de cadeia longa que é rapidamente hidrolisado pela lipase pancreática e absorvido como 2-MAG (Xu, 2000; Smith, 2015).

A utilização destes lípidos pode ser uma alternativa a usar na indústria alimentar no combate à obesidade ou utilizada para aplicações de preparados alimentares para atender aos requisitos de energia de indivíduos que sofrem doenças ou condições metabólicas específicas (Akoh, 1996, Ferreira-Dias *et al.*, 2019, Chow, 2008).

A síntese destes TAG, pela via enzimática apresenta-se vantajoso dado ao facto da regioespecificidade (*sn*-1,3 regioesletiva) das lipases sendo que a troca dos AG na molécula TAG é conhecida e pode ocorrer em meio livre de solvente.

A produção dos TAG do tipo MLM pode ser conseguida através da i) acidólise de TAG com um ácido gordo livre ou uma mistura, de modo a substituir os AG originais ou ii) interesterificação de TAG com ácidos gordos etílicos ou metílicos (Huang & Akoh, 1996), ocorrendo um rearranjo dos AG, ambas as reações são catalisadas por lipases *sn*-1,3 específicas, mantendo o ácido gordo original na posição interna *sn*-2 (Ferreira-Dias, 2010). Estudos demonstraram efeitos positivos na incorporação de ácido caprílico (C8:0) e ácido cáprico (C10:0) em TAG com lipases *sn*-1,3 específicas, com óleos vegetais (Mota *et al.*, 2020; Kim & Akoh, 2006; Turan & Vural, 2006) ou com óleo de peixe (Feldes *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2004).

Na acidólise enzimática para a produção de lípidos estruturados ocorre a quebra da ligação de éster na molécula de ácido gordo no TAG seguido de uma esterificação de um novo ácido gordo, ocorrendo assim a substituição das moléculas de ácidos gordos originais de cadeia longa (L) por ácidos gordos de cadeia média (M). No caso da reação de interesterificação ocorre um rearranjo dos ácidos gordos. Ambas as reações podem ser catalisadas por lipases *sn*-1,3 seletivas, como as lipases comerciais Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e c-ROL e não comerciais r-ROL imobilizadas em MNP. A substituição dos ácidos gordos será efetuada nas posições *sn*-1 e *sn*-3 enquanto a posição *sn*-2 é ocupada pelo ácido gordo original (Figura 1). Durante esta reação ocorre a formação de produtos intermediários, como os DAG e os MAG.

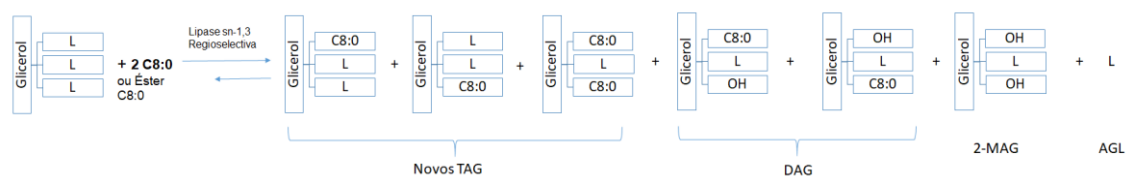


Figura 1 - Esquemática da reação de acidólise ou de interesterificação, catalisada por lipase sn-1,3 regio-seletiva, do óleo de bagaço de azeitona com ácido caprílico ou com éster de ácido caprílico.

### 3.3 Biodiesel

Além da obtenção de lípidos estruturados de baixo valor calórico, através da catálise enzimática, vários estudos (Rodrigues *et al.*, 2016; Aarthy *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2009; Yücel, 2011) demonstraram elevados rendimentos de obtenção de biodiesel com recurso ao uso de lipases em vez do catalisador químico.

O termo biodiesel consiste em ésteres metílicos de ácidos gordos (*Fatty acid methyl esters - FAME*) produzidos a partir de óleos de vegetais ou gordura de animais com qualidade para ser usado como combustível (Sebadelhe, 2008), tendo um crescente interesse dado a ser uma alternativa aos combustíveis fósseis. Apresenta vantagens como i) fonte de energia renovável, contribuindo para a redução do consumo de combustíveis fósseis; ii) biodegradável; iii) redução de emissões de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), partículas; iv) baixo risco de explosão (Sebadelhe, 2008; Rodrigues *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2010). As desvantagens associadas são o aumento das emissões de óxido de azoto (NO<sub>x</sub>), principalmente se o biodiesel estiver no estado puro (biodiesel 100%) e produção de glicerina (subproduto), que é introduzida no mercado a preços inferiores devido à elevada contaminação (Bajaj *et al.*, 2010).

Biodiesel é produzido através da reação de transesterificação de óleo com um álcool de cadeia curta para formar novos ésteres e glicerol. O álcool mais utilizado é o metanol devido ao seu baixo custo (Tan *et al.*, 2010; Sebadelhe, 2008; Gao *et al.*, 2009). Ao longo da reação há formação de produtos intermediários como os DAG e os MAG. Exemplos de matéria-prima para a produção de biodiesel são:

- i) óleos não alimentares provenientes da fritura industrial (Dizge *et al.*, 2009) ou subprodutos de processo extração de azeite, óleo de bagaço de azeitona bruto ou de plantas como a *Jatropha curcas* (Rodrigues *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2004)
- ii) óleo alimentar provenientes de sementes, como por exemplo óleo de girassol, colza, algodão (Xu *et al.*, 2003; Dizge *et al.*, 2009)

iii) gordura de animal, como o sebo e banha (Da Cunha *et al.*, 2009)

A síntese de biodiesel pode ser catalisada por via química alcalina ou ácida ou por via enzimática. No caso da via química apresenta vantagens como a rapidez da reação e rendimentos de obtenção altos. Contudo tem associado um i) consumo energético elevado; ii) dificuldades na recuperação do catalisador e do glicerol; iii) volume de efluente elevado; iii) reações indesejáveis de saponificação e de hidrólise (Rodrigues *et al.*, 2016; Bajaj *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010).

Referente à via enzimática, apresenta vantagens como i) condições de reação moderadas, pressão atmosférica e temperatura abaixo dos 60°C, levando a um baixo consumo energético (Rodrigues *et al.*, 2016) ii) utilizações de óleos não alimentares de elevada acidez; iii) geração de efluentes mínimos; iv) formação de 2-MAG, que pode ser utilizado como emulsionante para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (Gunstone, 1999); v) ausência de reações indesejáveis. O elevado custo das enzimas torna-se numa barreira para aplicação industriais, podendo ser ultrapassado através da imobilização das enzimas em suportes de baixo custo, permitindo assim a recuperação e reutilização das enzimas (Jegannathan *et al.*, 2008). Outro inconveniente da utilização das enzimas, é a possibilidade da inativação pelo álcool, como o metanol, ocorrendo uma inibição competitiva principalmente se a concentração do álcool for em excesso. No entanto, estudos indicam que adição progressiva de porções do álcool, sendo a estratégia mais comum para ultrapassar o problema (Jegannathan *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2010; Ruzich & Bassi, 2011).

### **3.4 Azeite e subprodutos**

Nas últimas décadas tem ocorrido um global interesse na utilização de azeite na dieta, não apenas por causa das características e do flavour único, mas também devido a estudo que demonstraram (Covas *et al.*, 2009; Schwingshackl *et al.*, 2017; Mateos *et al.*, 2019,) um forte papel no combate a doenças cardiovasculares, particularmente na doença cardíaca coronária, e outros benefícios, tornando assim o azeite um alimento funcional reconhecido.

De acordo com o Regulamento (EU) No. 1308/2013, os azeites designados como virgens são os azeites obtidos a partir do fruto de oliveira unicamente por processos mecânicos ou outros processos físicos, em condições que não alterem o produto e que não tenham sido submetidos a outros tratamentos além da lavagem, da decantação, da centrifugação ou da filtração, com exclusão dos azeites obtidos com solventes, com

adjuvantes de ação química ou bioquímica ou por processos de reesterificação, bem como de qualquer mistura com óleos de outra natureza.

Nos dias que correm, a produção de azeite permanece na bacia do mediterrâneo, sendo Espanha o maior produtor e exportador (301 400 toneladas, 52%), seguido por Itália (191 000 toneladas, 33%), Portugal (56 000 toneladas, 10%) e Grécia (20 600 toneladas, 4%). Cerca de 1/3 das exportações têm como destino os Estados Unidos da América, segundo dados da Eurostat referente ao ano 2018 (EU trade in olive oil, 2018). O que demonstra o aumento do consumo de azeite, e de interesse, em países não produtores, nem tradicionalmente consumidores (como é o caso dos países produtores).

A produção de azeite, em Portugal, tem um papel importante em termos socioeconómicos. A produção tem vindo a aumentar, devido à implementação de novos olivais intensivos e super-intensivos, prova do sucesso desta implementação ocorreu no ano 2013/2014 em que Portugal tornou-se autossuficiente. No ano 2017/2018 atingiu-se o máximo histórico de produção, 1,47 milhões de hectolitros (INE, 2019). Para o ano 2018 e segundo dados do INE, os produtores mais expressivos encontram-se em Trás-os-Montes e no Alentejo, onde obtiveram 164 945 hectolitros e 803 235 hectolitros, respetivamente, num total nacional de 1 094 433 hectolitros.

#### **3.4.1 Processo de Extração de Azeite**

A produção do azeite virgem pode ser dividida, de forma genérica, em diferentes etapas nomeadamente cultivo e colheita de azeitonas, preparação e obtenção do azeite e armazenamento e acondicionamento do produto.

Após colheita das azeitonas na fase ideal de maturação, os frutos são transportados para o lagar.

Existem 3 tipos de sistemas de extração, o sistema clássico (descontínuo), o sistema (contínuo) de 3 fases e de 2 fases.

Em todos os tipos de sistemas existem etapas comuns, que consistem na fase inicial do processo, a pesagem e descarga com o objetivo de remover os ramos e folhas, através de uma grelha. Segue-se a limpeza e lavagem com uma corrente de ar e água que separa as folhas e pedras (Aires, 2007). Nesta etapa surgem os primeiros resíduos, nomeadamente as folhas e ramos, que na maior parte dos casos serve como fertilizante ou permanecem no campo, originando um problema ambiental dado à libertação de compostos fitotóxicos para ecossistema.

O processo de extração, independentemente do tipo de sistema aplicado, consiste na destruição da parede celular dos frutos promovendo a libertação das gotas de óleo, que se encontram maioritariamente nos vacúolos das células vegetais, este processo designa-se por moenda, originando uma pasta moída. Esta pasta é submetida a um aquecimento e batimento lento e contínuo 20- 30 rpm durante 30 a 45 minutos (Clodoveo, 2014), sendo o processo designado por termobatedura. É nesta etapa que ocorre a separação água/azeite formando uma fase contínua oleosa, conhecido pelo fenómeno coalescência, (Clodoveo, 2014) consequentemente contribui para o aumento de rendimento (Aires, 2007).

#### **3.4.1.1 Sistema clássico**

No sistema de extração clássico, os frutos são moídos em moinhos de galgas, originando a pasta moída que é dispersa em capachos, por camadas, formando uma pilha. Segue-se a prensagem hidráulica que promove a separação da fase líquida (azeite e água) da fase sólida (bagaço) que permanece nos capachos e posteriormente removida (Aires, 2007; Martins, 2016). A fase líquida, também conhecida por mosto oleoso, segue para a fase seguinte que consiste na decantação e/ou centrifugação para ocorrer a separação do azeite da água devido às diferentes densidades.

Em termos de vantagens, este sistema produz azeite de alta qualidade dado que a pasta moída não é submetida a temperaturas altas, não requer obrigatoriamente a adição de água à massa de azeitona e tem um baixo consumo de energia (Martins, 2016). No entanto, as águas russas, composta por água usada na lavagem do fruto, água de vegetação, tem uma concentração elevada de carga orgânica. A qualidade do azeite está também relacionada com a higienização do lagar, já que poderá ocorrer contaminações de substâncias oxidadas num novo ciclo de extração levando à diminuição de qualidade. Além disso, requer muita mão de obra, dado ser um processo descontínuo (Aires, 2007; Martins, 2016)

#### **3.4.1.2 Sistema de 3 fases**

Sistema de extração de três fases substituiu, desde os anos 70 do século XX, o sistema clássico.

A massa já submetida à moenda (moinho de martelos) e à termobatedura, é direcionada para centrifugadora horizontal, também conhecida por *decanter*, constituída por um tambor cilindro-cónico com um parafuso sem-fim. Devido às diferentes densidades das frações, ocorre a separação da fração do bagaço da fase líquida (água e azeite). É nesta fase que se adiciona água (20-25 °C), tornando a massa mais fluida e desta forma

facilitando o processo de centrifugação, esta adição é realizada em proporção massa/água para não prejudicar o rendimento (Martins, 2016). Após a centrifugação horizontal, a fase líquida segue para uma centrífuga vertical onde ocorre a separação do azeite da água.

Comparativamente ao sistema clássico, o aparecimento deste sistema permitiu aumentar a capacidade de laboração, já que diminuiu os custos de mão-de-obra, com operações automatizadas e contínuas. Contudo apresenta elevados valores de investimento, maiores consumos de água e energia e produz uma quantidade consideravelmente elevada de água russa, 1,0 a 1,2 m<sup>3</sup> por tonelada de azeitona, o azeite extraído apresenta valores inferiores de antioxidantes devido à adição de água quente durante o processo.

#### **3.4.1.3 Sistema de duas fases**

Face à problemática das águas russas, foi desenvolvido nos anos 90 do século XX, o sistema contínuo de duas fases, conhecido por ser um sistema mais ecológico, que tem vindo a substituir os sistemas clássicos e contínuo de três fases.

A pasta moída e batida segue para um *decanter* onde ocorre a separação da fase líquida do bagaço, tal como no sistema de três fases, embora não ocorre a adição de água, ou seja, não há produção excessiva de águas residuais. A fase líquida segue para *decanter* verticais que separa o azeite da água de vegetação da azeitona, esta água é posteriormente adicionada ao bagaço tornando-o mais húmido (55 a 70% de humidade) (Martins, 2016).

A principal vantagem deste sistema é a reduzida produção de águas russas, cerca de 0,2 m<sup>3</sup> por tonelada de azeitona (Martins, 2016) comparativamente aos outros sistemas, tendo também benefícios a nível da qualidade do azeite extraído apresentando teores mais elevados de antioxidantes. Em termos de desvantagem apresenta maiores quantidades de bagaço de azeitona que os outros sistemas, tendo este um teor elevado de humidade, que é considerada uma dificuldade para os lagares.

### **3.5 Resíduos e Subprodutos**

Como referido anteriormente, associado à extração do azeite está a geração de quantidades consideráveis de resíduos e subprodutos. Estes subprodutos caracterizam-se por uma fase líquida - água russa - e uma fase sólida - bagaço de azeitona – no caso de se usar o sistema de três fases, e no caso do sistema de 2 fases apenas bagaço de azeitona húmido, devido à união das duas fases num só subproduto.

### **3.5.1 Águas russas**

As águas russas representam as águas residuais produzidas durante o processamento de extração (água de lavagem dos frutos, água de vegetação, etc.). A composição deste subproduto não é constante variando de acordo com a composição da água de vegetação, que está diretamente relacionado com a variedade, maturação e modo de cultura das azeitonas, do tipo de sistema de extração (clássica ou de 3 fases) e da duração de armazenamento, devido às alterações por organismos aeróbicos e/ou anaeróbicos (Niaounakis & Halvadakis, 2006).

Em geral apresentam uma cor escura, elevada carga orgânica (carência química, CQO, a 220 g/L e carência química de oxigénio, CBO, a 100 g/L), pH ácido e elevada quantidade de compostos fenólicos (0,5 – 24 g/l). Devido a estes compostos terem toxicidade e atividade antimicrobiana, diminuindo a atividade biológica (De Marco, 2007), tornam-se num potencial poluente se descarregado diretamente nos ecossistemas aquáticos sem tratamento prévio (Niaounakis & Halvadakis, 2006; Martins, 2016).

### **3.5.2 Bagaço de azeitona húmido**

O bagaço de azeitona húmido caracteriza-se por ser o subproduto final do sistema de extração de duas fases, constituído por polpa e epicarpo dos frutos, partes do caroço e do tegumento da azeitona triturados, além da água de vegetação (Moral *et al.*, 2006; Niaounakis & Halvadakis, 2006). Como no caso das águas russas, a caracterização do bagaço também varia com a variedade, estado de maturação, práticas de cultivo das azeitonas.

Em geral, caracteriza-se por ter um elevado teor de humidade devido à presença de água (55-70%), azeite retido na polpa (2,5-3,5%) e quantidades elevadas de lenhinha (Niaounakis & Halvadakis, 2006), celulose e matéria orgânica como proteínas, ácidos gordos livres, açúcares e pigmentos (Di Giovacchino *et al.*, 2001; Martins, 2016).

O elevado teor de humidade com a elevada quantidade de componentes orgânicos promove a formação de uma consistência difícil de transportar, armazenar e manusear. Na maioria dos casos, o bagaço de azeitona bruto é armazenado em “lagoas” em campo aberto (Niaounakis e Halvadakis, 2006). Além disso, a quantidade elevada de componentes orgânicos (lenhinha, açúcares, proteínas) diminui a atividade de microrganismos em degradar o bagaço, se usado para compostagem (Albuquerque *et al.*, 2004).

### 3.6 Valorização dos subprodutos

Uma das formas de valorização do bagaço de azeitona húmido já aplicada a nível industrial é a recuperação do óleo contido no bagaço através de um sistema de extração química recorrendo a um solvente – *n*-hexano. O *n*-hexano é um composto apolar que apresenta uma elevada seletividade para o material lipídico, permitindo assim a separação do óleo dos restantes compostos não lipídicos.

Este óleo após extraído segue para uma unidade industrial de refinação para ser refinado e posteriormente loteado com azeite virgem com intenção de ser comercializado como óleo de bagaço de azeitona e apto para consumo (Sebadelhe, 2008)

A extração inicia-se com uma secagem prévia do bagaço de azeitona (para atingir 8% de humidade) seguido por uma aspersão com o solvente, formando uma micela entre o *n*-hexano e o óleo, do qual são separados individualmente numa posterior destilação (Sebadelhe, 2008).

Após a destilação obtém-se o óleo de bagaço de azeitona bruto, definido como “o óleo obtido de bagaço de azeitona por tratamento com solvente ou por processos físicos, ou óleo correspondente, com exceção de certas características específicas a um azeite lampante, com exclusão dos óleos obtidos por reesterificação e de qualquer mistura com óleos de outra natureza, e cujas características estão conformes com as estabelecidas pela Comissão, nos termos do artigo 75c, nº2, previstas para esta categoria” (Regulamento (EU) No. 1308/2013).

No final do processo obtém-se o bagaço seco extratado, que é utilizado como combustível das caldeiras e/ou para alimentação animal. Os caroços também são utilizados para um sistema de cogeração de energia elétrica resultante do elevado poder calorífico com valores entre os 14-18 MJ/kg (Caputo *et al.*, 2003) ou vendidas em pallets.

O óleo de bagaço de azeitona bruto caracteriza-se por apresentar uma coloração escura, devido às altas temperaturas que o bagaço é submetido antes da extração por solvente (Gomes & Caponio, 1998). Durante a secagem do bagaço e devido ao facto de se atingir temperaturas elevadas, por volta dos 260 °C (Gomes & Caponio, 1997) pode ocorrer a formação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), contaminantes lipofílicos orgânicos, como resultado de uma incompleta combustão do conteúdo orgânico (Ergönül & Sánchez, 2013). Os HAP são compostos que ao serem assimilados pelo nosso organismo tornam-se cancerígenos. Ao serem detetados no óleo tornam-se problemáticos sendo necessário recorrer a uma purificação do óleo aquando a refinação do OBA para fins comerciais (Albuquerque *et al.*, 2004; Ergönül & Sánchez, 2013).

Subsequentemente à extração com solvente, o óleo de bagaço de azeitona bruto apresenta um teor de material insaponificável considerável e uma maior quantidade de ceras, esteróis totais, eritrodioleol e uvaol, comparativamente com o azeite (Angerosa, 1997; Sebadelhe, 2008).

Em termos de composição em ácidos gordos, o óleo de bagaço, é semelhante a o azeite e encontra-se descrita no quadro 1 conforme as indicações referidas no Regulamento (CE) nº1989/2003.

Tal como a acontece no azeite, o ácido gordo predominante no OBAB é o ácido oleico (C18:1) seguido pelo ácido palmítico e ácido linolénico.

*Quadro 1 - Composição em ácidos gordos (%) do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o Regulamento (CE) nº1989/2003.*

Nome	Fórmula	Teor de ácidos gordos (%)
n-Tetradecanóico (Ácido mirístico)	C14:0	≤0,05
n-Hexadecanóico (Ácido palmítico)	C16:0	7,5 - 20,0
9-Hexadecenóico (Ácido palmitoleico)	C16:1	0,3 - 3,5
n-Heptadecanóico (Ácido heptadecanóico)	C17:0	≤0,3
9-Heptadecenóico (Ácido heptadecenóico)	C17:1	0,3≤
n-Octadecanóico (Ácido esteárico)	C18:0	0,5 - 5,0
9-Octadecenóico (Ácido oleico)	C18:1	55,0 - 83,0
9-12-Octadecadienóico (Ácido linoleico)	C18:2	3,5 - 21,0
9,12,15-Octadecatrienóico (Ácido linolénico)	C18:3	≤1,0
n-Eicosanóico (Ácido araquídico)	C20:0	≤0,6
9-Eicosenóico (Ácido eicosenóico)	C20:1	≤0,4
n-Docosanóico (Ácido beénico)	C22:0	≤0,3
n-Tetracosanóico (Ácido lignocérico)	C24:0	≤0,2

Os ácidos gordos na sua forma livre são responsáveis pelo grau de acidez, dependendo da extensão da hidrólise dos triglicéridos. O bagaço de azeitona apresenta níveis elevados de acidez resultado do processo de extração, de apresentar um teor elevado de humidade e de permanecer armazenado durante um longo período de tempo (Gomes & Caponio, 1997; Sebadelhe, 2008).

O óleo de bagaço de azeitona bruto ao apresentar um perfil de ácidos gordos semelhante ao do azeite pode ser usado na produção de lípidos estruturados e de biodiesel, produtos de valor acrescentado valorizando um subproduto.

## **IV. Materiais e Métodos**

### **4.1 Materiais**

A amostra de óleo de bagaço de azeitona bruto foi cedida pela UCASUL - União de Cooperativas Agrícolas do Sul (Alvito), em novembro de 2019 e armazenada em local longe da exposição de luz solar.

As lipases comerciais Lipozyme RM IM (lipase *sn*-1,3 regio-seletiva) de *Rhizomucor miehei* imobilizadas em resina de troca iónica, Duolite A568, e Lipozyme TL IM (lipase *sn*-1,3 regio-seletiva) de *Thermomyces lanuginosus* imobilizadas em gel de sílica não compressível, foram gentilmente cedidas pela Novozyme A/S, Dinamarca.

A lipase recombinante comercial liofilizada de *Rhizopus oryzae* (c-ROL) foi adquirida na Sigma Chemical Co. Utilizou-se outra lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (r-ROL) que foi produzida pelo grupo do Prof. Francisco Valero de Universidade Autónoma de Barcelona, Espanha.

Os restantes materiais utilizados encontram-se descritos em cada metodologia utilizada.

### **4.2 Métodos**

#### **4.2.1 Caracterização do óleo de bagaço de azeitona**

##### **4.2.1.1 Determinação da acidez**

A determinação da acidez de um óleo ou gordura consiste na quantificação dos ácidos gordos livres presentes nos óleos, indicativo da qualidade dos óleos. Valores elevados de acidez podem indicar que o produto sofreu degradações hidrolíticas dos acilgliceróis que levam à formação de ácidos gordos livres de cadeia longa ou de cadeia curta por ações enzimática e/ou bacteriana.

Para efeito deste estudo, a determinação da acidez foi realizada segundo o Regulamento Delegado (UE) n.º 1830/2015 da Comissão Europeia, de 8 de julho de 2015. O processo consiste na dissolução da amostra de óleo de bagaço de azeitona numa mistura de solventes, seguido de uma titulação com uma solução de hidróxido de sódio e na presença de um indicador de neutrimetria. A acidez total expressa-se em percentagem mássica (% m/m) de ácido oleico, que é o ácido gordo maioritário do óleo de bagaço de azeitona.

##### **4.2.1.1.1 Materiais**

Amostra de OBAB, balão de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, pipetas volumétricas 10 mL de capacidade, material corrente de laboratório.

#### 4.2.1.1.2 Reagentes

Éter etílico *p.a.*, etanol absoluto ( $\geq 99,8\%$ ) *p.a.*, solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,01N, solução alcoólica de fenolftaleína a 2% (m/v).

#### 4.2.1.1.3 Procedimento

Primeiramente procedeu-se à preparação de uma solução de 200 mL de éter etílico e 200 mL de etanol numa relação de 1/1 em volume (v/v), a qual foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) e fenolftaleína.

Preparou-se uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) padronizada com uma concentração de 0,1 M.

A quantidade de amostra utilizada foi aproximadamente 1g de óleo de bagaço de azeitona bruto.

Dissolveu-se a amostra em 50 mL da solução éter etílico/etanol, seguido da titulação com ligeira agitação até à viragem do indicador, etapa que corresponde ao aparecimento de cor carmim da fenolftaleína.

A determinação da acidez (A) em percentagem mássica de ácido oleico foi determinada através da seguinte expressão:

$$A = V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m}$$

Equação 6.

em que:

V = volume consumido, expresso em mililitros de solução titulada de hidróxido de sódio.

c = concentração exacta, em moles por litro, da solução titulada de hidróxido de sódio utilizada, expressa em mol/L.

M = massa molar, em gramas por mole, do ácido adoptado para a expressão dos resultados (M ácido oleico = 282g/mol).

m = massa da toma de ensaio, expressa em g.

#### 4.2.1.2 Determinação de produtos de oxidação

A qualidade e o estado de conservação, e conseqüentemente os produtos de oxidação, podem ser avaliados através da análise por espectrofotometria na zona de comprimento de onda ultravioleta (Reg. Nº 1830/2015), segundo a lei de *Lambert-Beer*, que relaciona

a absorção de luz com a concentração da substância. Ao determinar-se o coeficiente de extinção específica, representado por  $K$ , nos comprimentos de onda específicos, leva à determinação do estado de conservação e dos produtos de oxidação.

Os produtos primários da oxidação dos ácidos gordos insaturados, absorvem um comprimento de onda (c.d.o) de 232 nm e os secundários, como os hidrocarbonetos, cetonas e aldeídos, absorvem a radiação num c.d.o entre 268 e 270 nm (Zschau, 2001).

#### 4.2.1.2.1 Materiais e equipamentos

Amostra de OBAB, filtros de seringa 0,25  $\mu\text{m}$  da LaborSpirit, balão volumétrico de 25 mL de capacidade, tinas de quartzo de espessura de 1 cm, material corrente de laboratório. Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis.

#### 4.2.1.2.2 Reagentes

2,2,4-Trimetilpentano (Iso-octano) 99,8% *p.a.*

#### 4.2.1.2.3 Procedimento

Segundo o regulamento N<sup>o</sup> 1830/2015, a amostra de OBAB a analisar deve estar isenta de impurezas em suspensão, pelo que se procedeu à sua filtração com filtros de seringa com poros de 0,25  $\mu\text{m}$ .

De seguida pesou-se para um balão volumétrico de 25 mL, 0,25 g da amostra previamente filtrada, completando o volume do balão com o solvente iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) e homogeneizou-se.

Procedeu-se à leitura no espectrofotómetro UNICAM UV/Vis, usando tinas de quartzo, com um percurso óptico de 1 cm e o iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) como referência, nos comprimentos de onda 232 nm, 268 nm, 270 nm, 272 nm, 274 nm.

Os coeficientes de extinção específica, nos diferentes comprimentos de onda, foram determinados pela seguinte expressão:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times s}$$

Equação 7.

em que:

$K_{\lambda}$  = extinção específica no comprimento de onda  $\lambda$ .

$E_{\lambda}$  = extinção medida no comprimento de onda  $\lambda$ .

C = concentração da solução em g/100 mL.

s = espessura da tina em centímetros (s=1 cm).

#### 4.2.1.3 Clorofilas totais

A análise da concentração dos pigmentos clorofilinos é considerada um indicador da qualidade de óleos. Durante a extração do óleo de bagaço os pigmentos são arrastados para o óleo devido à sua solubilidade no óleo e no solvente (Pokorny *et al.*, 1995). A sua determinação procede-se através do método de espectrofotometria, relacionando a absorção de luz da substância com a sua concentração (Lei *Lambert-Beer*). A determinação das clorofilas foi efetuada pelo método descrito em Pokorny *et al.*, (1995) para os óleos brutos.

##### 4.2.1.3.1 Materiais e equipamento

Amostra de OBAB, tina de espessura 5 mm, balão volumétrico de 5 mL, filtros de seringa 0,25 µm da LaborSpirit, material corrente de laboratório. Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis.

##### 4.2.1.3.2 Reagentes

*n*-hexano (≥95 %) *p.a* da Fisher Chemical.

##### 4.2.3.1.3 Procedimento

Antes da leitura no espectrofotómetro, procedeu-se à filtração do óleo de bagaço de azeitona, com filtros de seringa.

As leituras de absorvância da amostra de óleo foram realizadas em tinas de espessura de 5 mm, usando o ar como referência, nos comprimentos de onda 630 nm, 670 nm e 710 nm. Procedeu-se a duas leituras (com 3 repetições cada uma), sendo diluído com *n*-hexano numa relação de volume de 1:10 (v/v).

Os teores de clorofilas totais são expressos em mg de feofitina a por kg de óleo, sendo calculados pela expressão seguinte:

$$C = 345,3 \times (A_{670} - 0,5 \times A_{630} - 0,5 \times A_{710}) : L$$

Equação 8.

em que:

C = Concentração de pigmentos clorofilinos em mg de feofitina a em 1 kg de óleo.

A = Absorvância na respectivo comprimento de onda (nm).

L = Espessura da célula de quartzo (mm).

#### **4.2.1.4 Caracterização cromática**

A determinação da cor do óleo de bagaço foi determinada pelo método referido na Norma Portuguesa NP-937/1987, que segue o método triestimular, criado pela Comissão Internacional de Iluminação (*Commission International d'Éclairage*). Este sistema considera três cores primárias, os valores tricromáticos denominados X, Y, Z representativos de todas as cores do espectro visível (Bermejo *et al.*, 2014).

A cor foi determinada através da leitura espectrofotométrica a uma temperatura de 20°C, das transmitâncias do óleo nos comprimentos de onda 445, 495 e 560 e 625 nm.

##### **4.2.1.4.1 Materiais e equipamentos**

Amostra de OBAB, material corrente de laboratório, balão volumétrico de 5 mL, tina de espessura 1 mm. Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis.

##### **4.2.1.4.2 Reagente**

Tetracloroeto de carbono, *p.a* da Fisher Chemical.

##### **4.2.1.4.3 Procedimento**

A amostra de óleo de bagaço de azeitona bruto foi diluída com tetracloroeto de carbono numa relação de volume de 0,1/10 (v/v).

O tetracloroeto de carbono foi usado como referência, e a leitura realizada numa tina de quartzo de 1mm de percurso óptico

Procedeu-se ao cálculo dos valores tricromáticos (X, Y, Z) e das características cromáticas, sendo as seguintes (NP-937, 1987).

Coordenadas cromáticas (x, y): abcissa x e ordenada y do diagrama de cromaticidade correspondem à luz transmitida pelo óleo;

Transparência (Y%): corresponde à luz amarela, ou coordenada cromática amarela e é determinada pela percentagem de luz incidente;

Comprimento de onda dominante: corresponde ao comprimento de onda que predomina na luz transmitida pelo óleo;

Pureza ( $\sigma\%$ ): percentagem da luz com o comprimento de onda dominante. Mede o maior ou menor grau de monocromaticidade (100%) ou heterocromaticidade (0%);

Tangente  $\alpha$ : corresponde ao declive da reta que une as coordenadas cromáticas (y, x) no diagrama de cromaticidade.

As expressões utilizadas são as seguintes:

Valores tricromáticos

$$X = 19T_{445} + 38T_{560} + 13T_{595} + 28 T_{625},$$

$$Y = 21T_{495} + 62T_{560} + 17T_{625}$$

$$Z = 94T_{445} + 24T_{495}$$

Equação 9.

Coordenadas cromáticas

$$x = \frac{X}{X + Y + Z}$$

$$y = \frac{Y}{X + Y + Z}$$

Equação 10.

Tangente  $\alpha$

$$tg \alpha = \frac{x - 0,3163}{y - 0,3101}$$

Equação 11.

Pureza  $\sigma$

$$\sigma = [2,6767 (x + y) - 1,6767] \times 100$$

Equação 12.

## **4.2.2 Preparação dos biocatalisadores imobilizados em nanopartículas ferromagnéticas**

### **4.2.2.1 Síntese das nanopartículas ferromagnéticas**

A síntese das nanopartículas ferromagnética baseia-se na co-precipitação química, em que envolve a mistura de uma solução aquosa com iões  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , a qual após adição de uma base, origina a precipitação de *magnetite* (Henriques, 2017; Wang *et al.*, 2012). Dado ao facto destas partículas serem instáveis ao ar, sendo facilmente oxidadas, é necessário que a reação ocorra em ambiente de azoto prevenindo a oxidação da *magnetite* (Henriques, 2017; Maity & Agrawal, 2007). Após a formação de *magnetite* é necessário estabilizar as nanopartículas, através de revestimento com um agente protetor. No caso deste estudo, foi utilizado o 3-aminopropiltriethoxissilano (*aminopropyltriethoxysilane* – APTES), que altera a superfície das partículas aumentando a biocompatibilidade e fornece proteção contra a oxidação. Também foi adicionado uma solução de glutaraldeído tornando as partículas aptas para a ligação com as enzimas (Can *et al.*, 2009). A imobilização das enzimas procedeu-se segundo o método de adsorção, em que consiste no contacto da enzima dissolvida com o suporte.

#### **4.2.2.1.1 Materiais e equipamentos**

Balão de fundo cónico com 3 entradas, balão de fundo cónico com 2 entradas, material corrente de laboratório. Ultrassom Transsonic 700 Elma®, banho termostaticado Kotterman Labor Technik .

#### **4.2.2.1.2 Reagentes**

Ácido clorídrico (HCl) *p.a* , solução de amoníaco 25% (v/v), solução de APTES da Merck KGaA, solução aquosa de glutaraldeído (5%, v/v), solução tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,5), etanol absoluto ( $\geq 99,8\%$ ) da Fisher Chemical.

#### **4.2.2.1.3 Procedimento para a produção das nanopartículas ferromagnéticas**

A produção das nanopartículas ferromagnéticas (MNP) foi realizado de acordo com Mota *et al.*, (2020). Utilizou-se um balão de fundo cónico com três entradas: uma central onde se fez a admissão dos reagentes, uma lateral por onde se introduziu azoto de modo a expulsar o ar e criar um ambiente inerte e outra entrada lateral para a saída do ar (Figura 2a). Foi preparada uma solução com  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2 M) e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1 M) na proporção de 1:4, respetivamente, em água desionizada (50 mL). Seguiu-se a adição de gotas de ácido clorídrico (HCl) para baixar o pH a 1 e azoto. A solução foi colocada

num banho a 85°C em constante movimento, com a adição progressiva de 40 mL de solução de amoníaco (25%, v/v) durante 30 minutos. O aparecimento de uma cor muito escura na solução indica que a reação já ocorreu (Figura 2b).

Após este período as partículas formadas precipitadas foram lavadas várias vezes com água desionizada e separadas através da decantação magnética, seguido da secagem em estufa a 40°C.

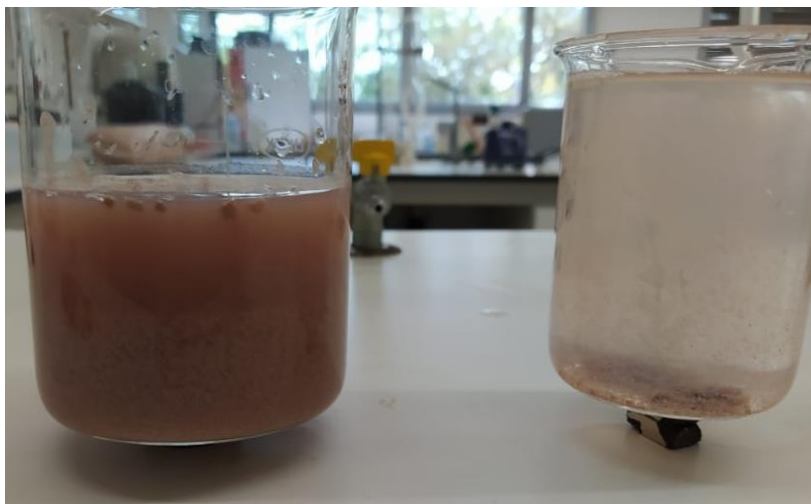
#### 4.2.2.1.4 Procedimento para o revestimento das nanopartículas

O revestimento das MNP seguiu o método segundo Mota *et al.*, (2020), com algumas modificações. Procedeu-se a pesagem de 1,5 g de MNP para um balão de reação com dupla entrada do qual foi adicionada uma solução de etanol e água destilada na proporção 1:1 (50 mL). Antes da adição a solução foi borbuhada com azoto para remoção do oxigénio dissolvido e a mistura permaneceu em atmosfera de azoto durante todo o procedimento. A mistura foi dispersa uniformemente com recurso ao ultrassom, em ciclos de 10s, durante 30 minutos. Foram adicionados 6 mL de APTES à mistura e colocado num banho a 40°C com agitação vai-e-vem, durante 2 h (120 rpm). De seguida foram adicionados 50 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (5%, v/v) e permaneceu no banho a 28°C, com agitação vai-e-vem a 120 rpm durante a noite

As MNP revestidas foram lavadas várias vezes com água desionizada e separadas através da decantação magnética, seguido da secagem em estufa a 30°C (Figura 3).



Figura 2 – a) Representação do procedimento de produção das nanopartículas ferromagnéticas antes da admissão dos reagentes. b) Aparecimento de uma cor escura indica que a reação ocorreu.



*Figura 3 - Representação de decantação magnética das nanopartículas após revestimento.*

A densidade das partículas de MNP revestidas foi estimada através do deslocamento de volume de água destilada presente numa proveta de 20 mL (Figura 4).



*Figura 4 - Determinação da densidade das partículas de MNP revestidas.*

#### **4.2.2.1.4 Procedimento de imobilização das lipases nas MNP**

A imobilização das lipases comercial (c-ROL) e não comercial (r-ROL) recombinantes *Rhizopus oryzae* nas MNP seguiu o método segundo Mota *et al.*, (2020) com modificações. Iniciou-se com a pesagem de 2 g de MNP que se adicionaram 20 mL da solução tampão (0,2 M, pH 7,5) contendo 0,5 g de ROL e colocado num banho a 28°C com agitação vai-e-vem, durante 4 h (65 rpm). As partículas imobilizadas foram lavadas três vezes com 40 mL da solução tampão e separadas por decantação magnética, seguido da secagem com recurso a um exsiccador. Após imobilização, os biocatalisadores foram guardados a 4°C até serem utilizados.

### 4.2.3. Caracterização dos biocatalisadores

#### 4.2.3.1 Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica das lipases imobilizadas em MNP após a imobilização é calculada pela diferença entre a atividade hidrolítica de solução-mãe e da solução sobrenadante recolhido após imobilização. A atividade hidrolítica é expressa em unidade de atividade hidrolítica (U) que consiste na quantidade de enzima necessária para libertar 1 micromole ( $\mu\text{mol}$ ) de ácido gordo livre por minuto. O rendimento da imobilização ( $\eta$ ), pode ser efetuado em termos de atividade hidrolítica, relacionando-se a atividade hidrolítica após imobilização (sobrenadante) com a atividade hidrolítica da solução enzimática inicial (solução-mãe).

$$\eta = \frac{\text{Atividade hidrolítica após imobilização}}{\text{Atividade hidrolítica enzimática inicial}} \times 100$$

Equação 13.

##### 4.2.3.1.1 Material e equipamento

Material corrente de laboratório. Reator cilíndricos de vidro de parede dupla (30 mL), placa de agitação magnética, ultraturrex T25 Basic da IKA Labortechnik, banho termostaticado JULABO GmbH.

##### 4.2.3.1.2 Preparação de emulsão

Azeite virgem extra, água destilada, goma arábica, solução-tampão 0,2 M, pH 7,5, etanol absoluto ( $\geq 99,8\%$ ) da Fisher Chemical, acetona ( $\geq 99,55$ ) da Sigma Aldrich.

##### 4.2.3.1.3 Procedimento

O procedimento realizou-se de acordo com Soares *et al.*, (1999) com modificações.

Dispensou-se aos poucos 3,5 g goma arábica em 50g de água destilada sob agitação, durante 10 minutos, na placa de agitação magnética. Ao fim deste tempo, adicionaram-se 50 g de azeite virgem extra permanecendo em agitação durante 5 minutos. Ao fim deste tempo, adicionaram-se 80 mL da solução-tampão de fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,5) e colocou-se a emulsão no ultraturrex T25 Basic da IKA Labortechnik durante 2 minutos para homogeneizar.

As reações de hidrólise ocorreram em reatores cilíndricos de vidro de parede dupla (30mL), onde circula água quente a 40°C, proveniente de um banho termoestaticado JulaboGmbH com recirculação. Em cada reator, colocaram-se 9 mL de emulsão de azeite estabilizado com goma arábica. Quando a emulsão atingiu os 40°C, adicionaram-

se 0,1 mL de solução-mãe (solução de lipase inicial) ou 1 mL de solução sobrenadante, recolhido após a imobilização.

Todas as reações de hidrólise com os vários tipos de amostra, tiveram uma duração de 10 minutos sob agitação e ao fim deste tempo, foram adicionados 20 mL da solução Etanol+Acetona (1:1. v/v), com o objetivo de parar a reação por inativação das lipases.

Após a paragem da reação, seguiu-se a titulação com solução padronizada de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M, para quantificar os ácidos gordos livres presentes na amostra, recorrendo-se ao uso de fenolftaleína como indicador. O procedimento foi realizado em triplicado para cada amostra e o ensaio em branco corresponde ao ensaio sem adição de enzima.

#### **4.2.3.2 Determinação de proteínas totais**

A determinação de proteínas totais presentes na solução-mãe, sobrenadante e soluções de lavagem seguiu o método de Bradford, que se baseia na capacidade do corante Coomassie brilliant blue G250 se ligar às proteínas (Zaia, 1998), mais precisamente aos resíduos de arginina das proteínas. Esta ligação é visualizada pelo aparecimento de cor azul e tem uma absorvância máxima no comprimento de onda 595 nm (Kruger, 2009).

O rendimento da imobilização pode ser efetuado em termos de teor de proteína imobilizada relacionando-se com a concentração de proteína imobilizada com a concentração da proteína na solução enzimática inicial (solução-mãe).

$$\eta = \frac{[\text{Proteína retida após a imobilização}]}{[\text{Proteína na solução enzimática inicial}]} \times 100$$

Equação 14.

##### **4.2.3.2.1 Materiais e Métodos**

Amostra de OBAB, tina de quartzo de espessura 1 cm, material corrente de laboratório. Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis.

##### **4.2.3.2.2 Reagente**

Solução de corante *Coomassie brilliant blue* G25, soro de albumina bovina (*Bovine Serum Albumine*, BSA) >96% da Sigma-Aldrich, solução-tampão 0,2 M, pH 7,5.

##### **4.2.3.2.3 Procedimento**

Primeiramente procedeu-se à preparação da solução de soro de albumina bovina (*Bovine Serum Albumine*, BSA) com o intuito de criar uma curva padrão. Pesou-se 0,022g de BSA e dissolveu-se em 20 mL de água destilada.

Em 6 tubos de ensaio colocaram-se 0 (Branco), 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{L}$  da solução BSA em cada tubo de ensaio e 100, 80, 60, 40, 20, 0  $\mu\text{L}$  de solução-tampão, respetivamente. No final, colocaram-se 5mL de solução *Coomassie brilliant blue* G250 em cada tubo e procedeu-se à leitura no Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis num comprimento de onda 595 nm, contra o branco de água destilada.

Para as amostras a analisar, procedeu-se a 3 repetições de cada amostra. Na análise da amostra solução mãe, colocaram-se 20  $\mu\text{L}$  da solução e 80  $\mu\text{L}$  de solução tampão. Nos tubos correspondentes à amostra de sobrenadante, colocaram-se 40  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 60  $\mu\text{L}$  de solução tampão. Para análise de teor de proteína nas soluções de lavagem, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$ . Em todos os tubos colocaram-se 5 mL de *Coomassie brilliant blue* G250 e procedeu-se à leitura no Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis num comprimento de onda 595 nm.

#### **4.2.4 Reações de acidólise e de interesterificação para produção de lípidos estruturados**

##### **4.2.4.1 Materiais**

Amostra de OBAB, balão de Erlenmeyer 50 mL, outro material corrente de laboratório, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e c-ROL comercial imobilizada em MNP e r-ROL não comercial imobilizada em MNP. Banho termostatizado Kotterman Labortechnik.

##### **4.2.4.2 Reagente**

Ácido n-octanóico ( $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ ; MM:144,21 g/mol) (> 98%) *p.a* da TCI Europe N.V., Bélgica, octanoato de etil (éster etílico de ácido caprílico ( $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_2$ ; MM 172,27 g/mol) (> 98%) *p.a* da TCI Europe N.V., Bélgica.

##### **4.2.4.3 Procedimentos**

Colocaram-se 9,78 g de óleo de bagaço de azeitona bruto, 3,18 g ácido caprílico ou 4,38 g éster etílico de ácido caprílico numa razão molar óleo/ácido ou óleo/éster de (1:2) num balão de erlenmeyer de 50 mL, que foi vedado com tampas de borrachas cobertas de alumínio para evitar oxidações e entrada de gotas de água, obtendo-se assim um volume total de 12,96 g. Os balões foram colocados em banho termostatizado a 40°C com agitação vai-e-vem (90 r.p.m). Foi removido 1 mL da solução (amostra no tempo 0, sem enzima), permanecendo um volume de 13 mL. De seguida adicionou-se 0,451 g da lipase comercial Lipozyme TL IM ou Lipozyme RM IM, obtendo-se uma carga enzimática de 5 % relativa à massa de óleo.

A duração dos ensaios foi de 48h, tendo sido retiradas amostras sucessivas de 0,5 mL de meio reaccional no tempo 2, 4, 6, 8 24, e 48h. Todas as amostras retiradas foram congeladas a -18°C para posterior análise por cromatografia gasosa.

Para os ensaios de acidólise com as enzimas imobilizadas c-ROL-MNP e r-ROL-MNP, as condições dos ensaios foram iguais, exceto as quantidades, que foram 6,52 g de óleo, 2,127 g de ácido caprílico e 1,8 g de lipase imobilizada. A elevada carga de ROL-MNP utilizada (27% relativamente ao óleo presente) nos ensaios, deve-se ao facto de as partículas de MNP revestidas apresentarem uma densidade ( $\rho=1,43$ ) de 4-5 vezes superior às das preparações comerciais Lipozyme RM IM ( $\rho=0,33$ ) e Lipozyme ( $\rho=0,4$ ) (Novozymes A/S)

#### **4.2.5 Produção de biodiesel (FAME) através da reação de transesterificação.**

Nos ensaios de transesterificação com metanol (metanólise) catalisado por lipases *sn*-1,3 regio-seletivas ocorre a reação do óleo com um álcool de cadeia curta, o metanol, para formar novos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e 2-MAG.

##### **4.2.5.1 Materiais e equipamento**

Amostra de OBAB, balão erlenmeyer de 50 mL, material corrente de laboratório, Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM. Banho termostaticado Kotterman Labortechnik.

##### **4.2.5.2 Reagentes**

Metanol ( $\geq 99,8\%$ ) *p.a.*, da Fisher Chemical

##### **4.2.5.3 Procedimento**

Colocaram-se 5,2 g óleo de bagaço de azeitona bruto, num balão erlenmeyer de 50mL, 0,45 g de enzima Lipozyme TL IM ou Lipozyme RM IM. Colocou-se a solução em banho a 40°C com agitação vai-e-vem (90 r.p.m). Como o metanol tem um efeito inativador da enzima, procedeu-se a 7 adições de 69  $\mu$ L de MeOH cada num total de 0,485 mL que corresponde à razão molar óleo/MeOH de 1:2. As adições foram posteriores a cada recolha de amostra de 200  $\mu$ L no tempo 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Todas as amostras retiradas foram congeladas para posterior análise.

#### **4.2.6 Derivatização e cromatografia gasosa**

O método para seguir a cinética das reações, através da quantificação de TAG iniciais, novos TAG, DAG, MAG, AGL ou FAME seguiram a norma europeia EN 14105: 2011 com modificações.

#### 4.2.6.1 Materiais e equipamentos

Balão volumétrico de 10 mL, balão de vidro periforme de 10mL, seringa, Hamilton de 100 µL . Rotavapor R-200 da Büchi Labortechnik, cromatógrafo gasoso capilar Agilent Technologies 7820A.

#### 4.2.6.2 Reagentes

*n*-hexano (≥ 95%) *p.a* da Fisher Chemical, tetrahidrofurano (≥ 99,9%) *p.a* da Sigma Aldrich, monononadecanoína (> 99%) da Larodan Fine Chemicals AB, piridina *p.a* da Fisher Chemical, N-metil-N-trimetil-silil-triflouracetamida (> 95%) da TCI Europe N.V., *n*-heptano (≥ 99,5%) *p.a* da Fisher Chemical, diclorometano *p.a* da Sigma Aldrich, metanol (≥ 99,8%) *p.a* da Fisher Chemical.

#### 4.2.6.3 Procedimento

Colocaram-se 0,05 g de amostra para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual se adicionou *n*-hexano até perfazer o volume do balão. De seguida, e após uma breve agitação, retirou-se 0,5 mL da solução para um balão de vidro periforme de 10mL, que foi colocado num evaporador rotativo, Rotavapor R-200 a baixas pressões (<120 mbar) com o objetivo de evaporar do solvente sem alteração da amostra, durante 10 minutos.

Após a obtenção do resíduo seco, adicionaram-se 400 µL de padrão interno (0,05 g monononadecanoína em 20 mL de tetrahidrofurano), 200 µL de piridina e 200 µL de N-metil-N-trimetil-silil-triflouracetamida (MSTA), procedeu-se à agitação no vortex e ao repouso das amostras à temperatura ambiente durante 15 minutos. Refere-se que MSTa foi adicionado com uma seringa Hamilton de 100 µL, a qual foi limpa 10 vezes, antes e depois da adição, com *n*-hexano e que todo o processo de adição dos reagentes deve ser realizado na Hotte.

Terminados os 15 minutos, adicionaram-se 4 mL de *n*-heptano ao balão e agitou-se no vortex. Transferiu-se uma parte para um vial, do qual apenas 1 µL foi analisado no cromatógrafo gasoso capilar, Agilent Technologies 7820A munido de injetor on-column. O gás de transporte (fase móvel) foi o hélio, com um caudal de 25mL/min, que transporta a amostra volatilizada através da coluna capilar Agilent J&W 123-5711 DB5ht (15 m x 0,32 mm, 0,10 µm). É nesta coluna que ocorre a separação dos diferentes componentes. Para que ocorra a separação são necessárias as seguintes condições do binómio tempo/temperatura: Temperatura de iniciação 50°C durante 1 minuto, aumento da temperatura a uma taxa de 15°C/min até aos 180°C que se mantêm durante 10 minutos. Após este tempo, a temperatura aumenta a uma taxa de 7°C/min até atingir os 230°C

que se mantêm durante 7 minutos. Por fim ocorre o aumento da temperatura até aos 370°C a uma taxa de 10°C/min mantendo-se esta temperatura durante 26 minutos.

Os compostos volatilizados abandonam a coluna cromatográfica através do hélio e são detetados pelo detetor por ionização de chama (*Flame Ionization Detector* - FID). A chama é alimentada por ar (300mL/min) e hidrogénio (30mL/min), promovendo a pirólise dos compostos libertando electrões que vão gerar eletricidade (devido a geração de uma diferença de potencial) que é proporcional à quantidade de composto analisado, isto é, quanto maior for a quantidade de composto analisado, maior será a geração de eletricidade através da chama. Este sinal eléctrico é representado em forma de picos no cromatograma final. Utiliza-se um gás inerte para o detetor, o azoto, com um caudal de 30 mL/min.

No que diz respeito ao cromatógrafo gasoso capilar, antes da leitura, é preciso verificar os níveis dos gases (Hidrogénio, Hélio e Azoto) e proceder a uma corrida cromatográfica com o solvente *n*-heptano para limpar a coluna. Entre a leitura de várias amostras o cromatógrafo procede à limpeza da seringa com duas soluções: Solução (A) mistura de solventes diclorometano com metanol, numa razão de 1:1 e a Solução (B) *n*-heptano.

#### **4.2.7 Quantificação dos compostos**

A obtenção dos cromatogramas, através da cromatografia gasosa, permite analisar cada composto, representado por um pico, sendo que a área é proporcional à quantidade de composto. Através do meio de comparação com padrões de referências com o respetivo tempo de retenção ( $t_r$ , em minutos) é possível determinar aos compostos de interesse presentes em cada amostra analisada. Os padrões de referência utilizados foram os seguintes:

- i) Octanoato de etil com  $t_r=4$  min;
- ii) Ácido caprílico com  $t_r=6$  min;
- iii) Ácido oleico  $t_r=12$  min;
- iv) Mononadecanoína  $t_r=18$ min;
- v) Trioleína com  $t_r=31$  min.

O padrão de referência de mononadecanoína foi considerado como padrão interno (PI Mono C19) (Figura 5).

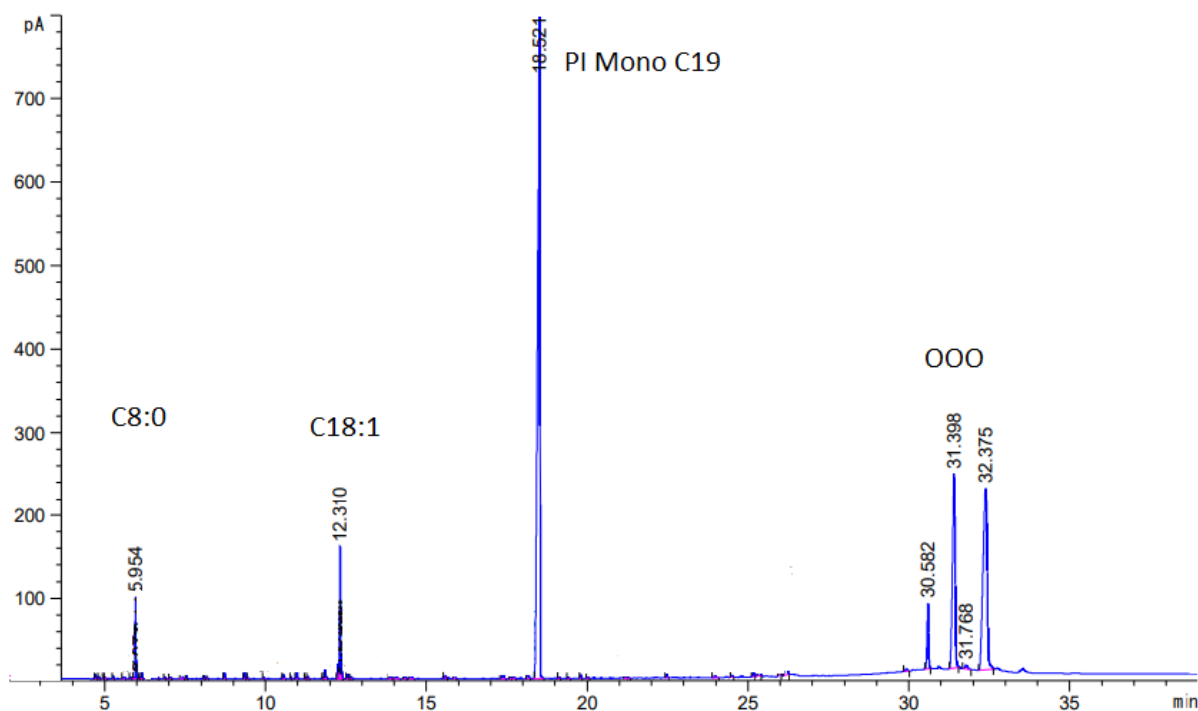


Figura 5 - Representação dos picos, no cromatograma, correspondentes ao ácido caprílico (C8:0), ácido oleico (C18:1), padrão interno monononadecanoína (PI Mono C19) e trioleína (OOO).

Para identificação dos compostos de interesse, seguiram-se os valores referidos na norma europeia EN 14105, abril de 2011, em que:

- i) AGL com tempo de retenção inferiores a 17 minuto;
- ii) FAME com tempo de retenção entre 11 min e 17,8 min;
- iii) MAG entre os 17,8 e 20 min;
- iv) DAG entre os 20 e 25min;
- v) TAG superiores a 25 min.

Para cada composto no cromatograma foi calculada a razão entre a área do pico do composto e a área do padrão interno (Equação 15).

$$X = \frac{A_{peak}(x)}{A(PI)}$$

Equação 15.

Em que,

$A_{peak}(x)$ : Área do pico do composto (x);

$A(PI)$ : Área do pico do padrão interno.

A quantificação de novos TAG foi expressa pelo rendimento (%) determinado através da relação entre o somatório da razão da área dos picos correspondentes aos novos TAG no tempo t e pela área do pico do PI com o somatório da razão da área dos picos de TAG iniciais, no tempo 0h (t0) (Equação 16).

$$\eta = \frac{\frac{\sum \frac{A_{\text{novosTAG}}(t)}{A(PI(t))}}{\sum \frac{A_{\text{peak}}(X(t))}{A(PI(t))}}}{\frac{\sum \frac{A_{TAG}(t0)}{A(PI(t0))}}{\sum \frac{A_{\text{peak}}(X(t0))}{A(PI(t0))}}} \times 100$$

Equação 16

Na figura 6 está representado os cromatogramas obtidos pela análise da amostra relativamente ao ensaio de acidólise de óleo de bagaço com ácido caprílico (C8:0) catalisada por Lipozyme TL IM, no tempo zero e após 4 horas.

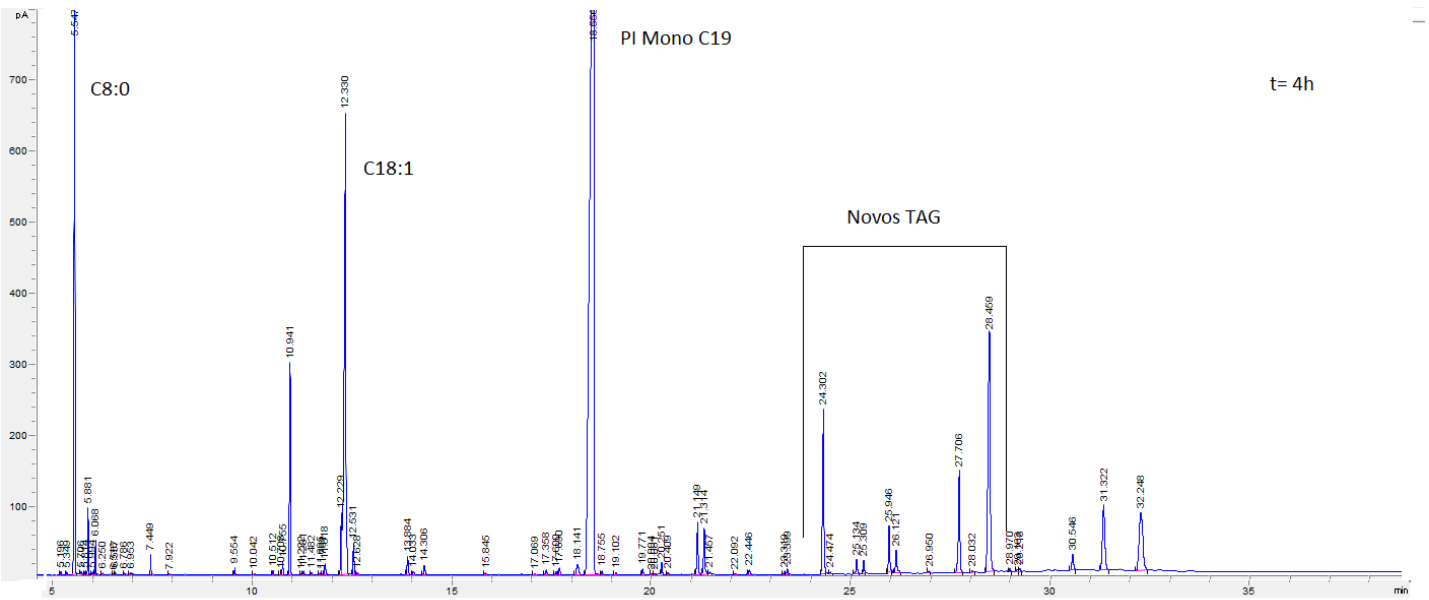
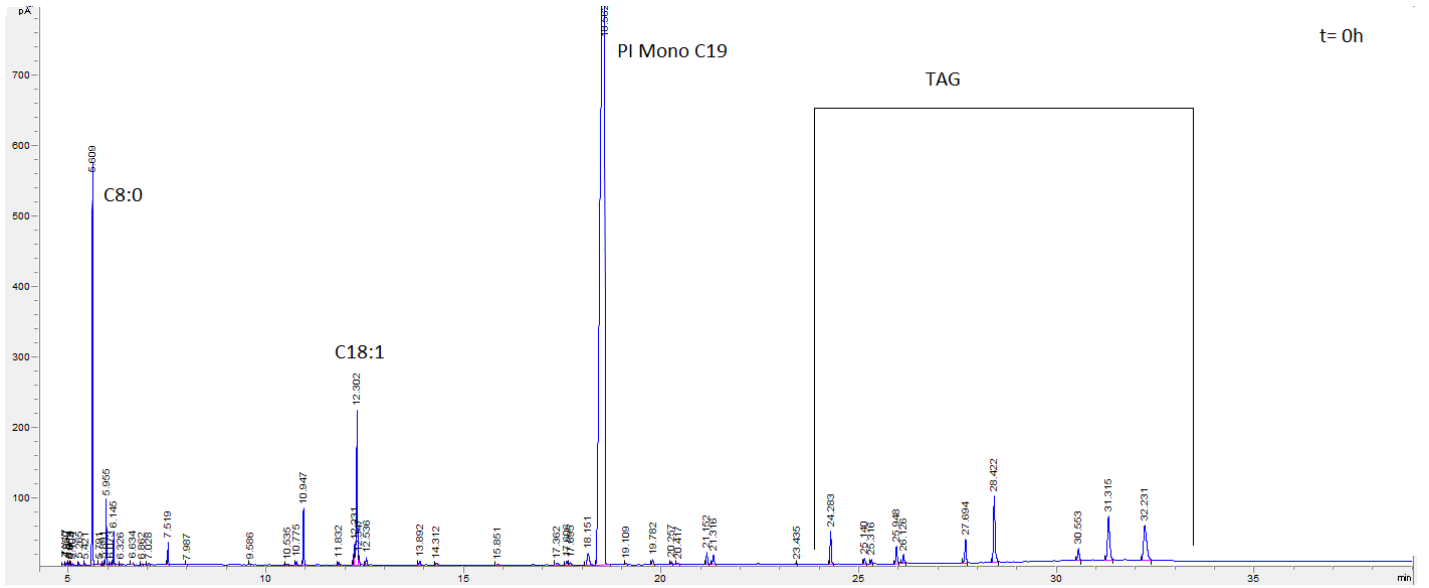


Figura 6 - Cromatograma relativos ao ensaio de acidólise de óleo de bagaço com ácido caprílico (C8:0) catalisada por Lipozyme TL IM, no tempo zero e após 4 horas.

Também foi determinado o grau de conversão de TAG (Equação 17) e do ácido caprílico (Equação 18) e do éster etílico de ácido caprílico, através das seguintes fórmulas:

Conversão TAG ( $X_{TAG}$ , %)

$$X_{TAG} = \frac{\frac{\sum \frac{A_{peak}(TAG(t_0))}{A(PI(t_0))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t_0))}{A(PI(t_0))}} - \frac{\sum \frac{A_{peak}(TAG(t))}{A(PI(t))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t))}{A(PI(t))}}}{\frac{\sum \frac{A_{peak}(TAGi(t_0))}{A(PI(t_0))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t_0))}{A(PI(t_0))}}} \times 100$$

Equação 17.

Conversão de ácido caprílico - C8:0 ( $X_{C8:0}$ , %)

$$X_{C8:0} = \frac{\frac{\sum \frac{A_{peak}(C8:0(t_0))}{A(PI(t_0))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t_0))}{A(PI(t_0))}} - \frac{\sum \frac{A_{peak}(C8:0(t))}{A(PI(t))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t))}{A(PI(t))}}}{\frac{\sum \frac{A_{peak}(C8:0(t_0))}{A(PI(t_0))}}{\sum \frac{A_{peak}(X(t_0))}{A(PI(t_0))}}} \times 100$$

Equação 18

A conversão do éster etílico de ácido caprílico foi calculada de igual forma ao do ácido caprílico.

Para a determinação dos FAME, procedeu-se ao balanço de massas dos compostos presentes no meio reacional no início e tempo t da reação de alcoólise. Assim quantificaram-se os MAG (Equação 19), DAG, AGL e TAG Residuais (Equação 20), ao longo do tempo através da razão de áreas.

Para os MAG utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ MAG}(t) = \frac{\sum \frac{\text{Apeak}(\text{MAG}(t))}{A(\text{PI}(t))}}{\sum \frac{\text{Apeak}(X(t))}{A(\text{PI}(t))}} \times 100$$

Equação 19.

Os DAG e AGL foram calculados de igual forma aos MAG, substituindo na equação 19 a área dos MAG (t) pelas dos DAG (t) ou AGL (t), respetivamente.

Os TAG residuais presentes ao longo do tempo foram calculados de seguinte forma:

$$\text{TAG Residuais}(t) = \frac{\left( \frac{\sum \frac{\text{Apeak}(\text{TAG}(t_0))}{A(\text{PI}(t_0))}}{\sum \frac{\text{Apeak}(X(t_0))}{A(\text{PI}(t_0))}} \right) \times \left( \frac{\sum \frac{\text{Apeak}(\text{TAG}(t))}{A(\text{PI}(t))}}{\sum \frac{\text{Apeak}(X(t))}{A(\text{PI}(t))}} \right)}{\sum \frac{\text{Apeak}(\text{TAG ini.}(t_0))}{\text{Apeak}(X(t_0))}}$$

Equação 20.

Para determinação dos FAME, procedeu-se com a seguinte equação.

$$\% \text{ FAME} = 100 - \text{TAG} - \text{DAG} - \text{MAG} - \text{AGL}$$

Equação 21.

## V. Resultados e discussão

### 5.1. Caracterização do óleo de bagaço de azeitona

#### 5.1.1 Determinação da acidez e produtos de oxidação

A determinação da acidez da amostra de óleo de bagaço de azeitona bruto seguiu o método referido no regulamento N<sup>o</sup> 1830/2015, efetuando-se 3 repetições da amostra OBAB, sem nenhum tratamento prévio. O quadro 2 apresenta os valores médio de acidez obtidos, expressos em percentagem mássica (% m/m) de ácido oleico.

*Quadro 2 - Valor de acidez e coeficientes de extinção específicos  $K_{232}$  e  $K_{270}$  da amostra de óleo de bagaço de azeitona bruto.*

Parâmetro	Valor médio	Desvio padrão
Acidez (% m/m de ácido oleico)	7,0	0,28
$K_{232}$	4,77	0,08
$K_{270}$	2,06	0,27

Segundo o regulamento N<sup>o</sup> 1830/2015, o óleo de bagaço de azeitona bruto não tem um limite de acidez definido dado ao facto de não ser um produto de consumo final, já o óleo de bagaço de azeitona refinado apresenta um limite de acidez inferior ou igual a 0,3%.

A acidez está diretamente relacionada com a qualidade dos óleos. Valores elevados de acidez indicam que durante o armazenamento de bagaço de azeitona, que contém 50-70% de humidade, antes da sua secagem e extração do óleo, ocorreu hidrólise por ação das lipases presentes.

A presença de produtos de oxidação foi avaliada através da espectrofotometria de UV, uma vez que os produtos primários de oxidação absorvem a luz num comprimento de onda (c.d.o) de 232 e os secundários num c.d.o entre 268 e 270 nm. O valor de  $K_{270}$  corresponde ao maior valor de extinção específica lido na gama dos valores de 270 nm.

O quadro 2 apresenta os valores médios dos coeficientes de extinção específica a 232 nm e na gama dos 270 nm.

O Regulamento N<sup>o</sup> 1830/2015 não estabelece limites para os coeficientes de extinção específica para o óleo de bagaço de azeitona bruto. Contudo, através dos dados obtidos é revelado que os coeficientes de extinção de 4,77 e 2,06, a 232 e 270nm

respetivamente, indicam a presença de grande quantidade de produtos de oxidação primários e secundários.

### 5.1.2 Determinação de cor, caracterização cromática e teor de pigmentos clorofilinos

Avaliação da cor e a caracterização cromática seguiu o sistema CIE e segundo a NP-937:1987. O quadro 3 apresenta as diferentes variáveis da caracterização cromática e o teor de pigmentos clorofilinos do óleo de bagaço de azeitona bruto.

*Quadro 3 - Características cromáticas do óleo de bagaço de azeitona bruto, segundo o sistema CIE e teor de pigmentos clorofilinos.*

Parâmetro	Valor médio	Desvio padrão
X	0,34	-
Y	0,35	-
Tangente $\alpha$	1,48	-
Pureza ( $\sigma$ %)	17,22	-
Comprimento de onda dominante ( $\lambda$ , nm)	573	-
Pigmentos clorofilinos (mg de feofitina a/Kg OBAB)	374	0,84

Os valores apresentados são a média de três repetições. As coordenadas cromáticas e a determinação do comprimento de onda dominante encontram-se representados no diagrama de cromaticidade x, y do sistema C.I.E (Figura 7).

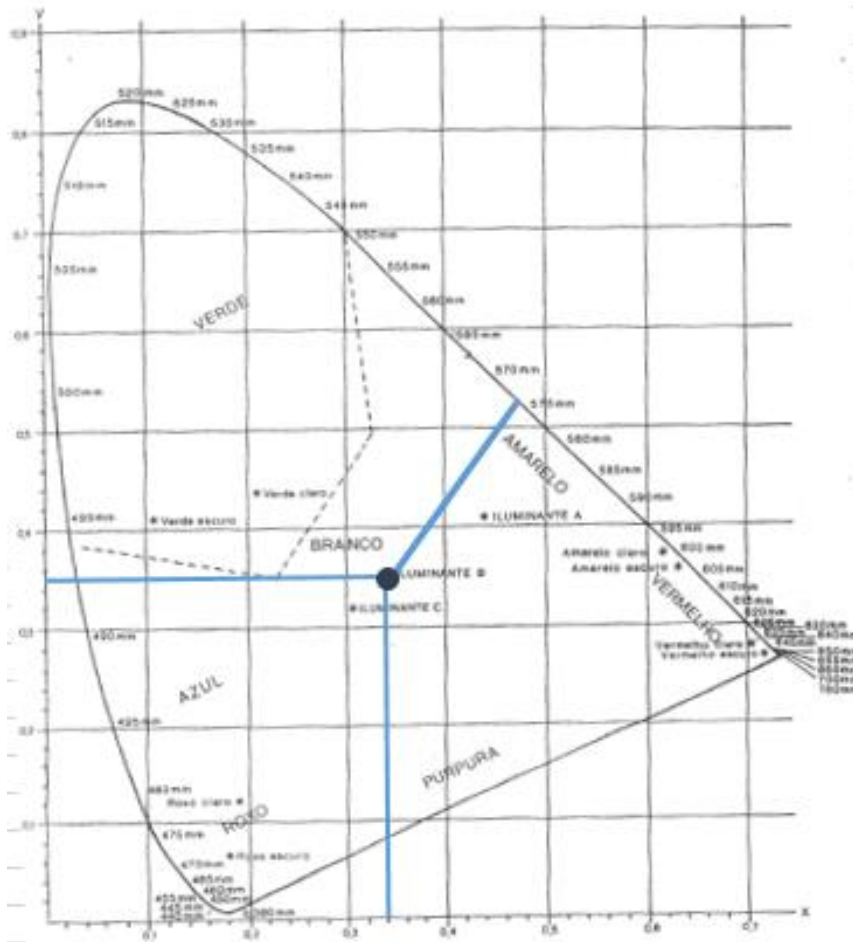


Figura 7 - Diagrama de cromaticidade C.I.E.

O comprimento de onda que predomina na luz transmitida pelo óleo é o 573 nm, que corresponde à zona do amarelo. A pureza ( $\sigma\%$ ) mede o maior ou menor grau de monocromaticidade (100%) ou heterocromaticidade (0%), sendo que o valor obtido foi de 17%, indicando assim um valor considerável de heterocromaticidade.

O teor de clorofila total foi determinado segundo o método descrito em Pokorny *et al.*, (1995), para óleos brutos relacionando a absorção de luz nos comprimentos de onda 630 nm, 670 nm e 710nm, com a sua concentração.

Os valores obtidos foram 342 mg de feofitina a por kg de óleo (Quadro 3).

Os pigmentos clorofilinos encontram-se nos cloroplastos, sendo solúveis em lípidos ou em solventes. Apresentam espectros de absorção nas zonas do azul e vermelho e de emissão na zona verde, sendo responsáveis pela coloração verde no óleo. Dado ao facto de serem solúveis em solventes, são facilmente arrastados durante a extração do óleo de bagaço.

Na legislação europeia não existem valores para o teor de clorofila total, embora no azeite, varia conforme a variedade, práticas culturais, estado de maturação do fruto, condições de armazenamento e processamento (Giuliani *et al.*, 2011).

## 5.2 Caracterização da imobilização

As lipases de *Rhizopus oryzae* de Sigma Chemical Co. (c-ROL) e produzida pelo grupo do Prof. Francisco Valero (r-ROL) foram imobilizadas em MNP.

### 5.2.1 Determinação da atividade hidrolítica

O rendimento da imobilização pode ser efetuado em termos de i) atividade hidrolítica ou ii) proteínas imobilizadas. O quadro 4 apresenta a média dos ensaios em triplicado da atividade hidrolítica da solução enzimática inicial, imobilizada e o rendimento da imobilização, obtido pela equação 13.

*Quadro 4 - Atividade hidrolítica da c-ROL e r-ROL imobilizadas em MNP e o rendimento de imobilização.*

<b>Lipase imobilizadas</b>	<b>Atividade hidrolítica da solução enzimática inicial (U/g)</b>	<b>Atividade hidrolítica na imobilizada (U/g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>c- ROL</b>	700	424	61
<b>r-ROL</b>	1493	1305	87

Comparando os valores de atividade obtidos com a c-ROL e a r-ROL, verifica-se que a enzima não comercial r-ROL apresenta uma atividade hidrolítica inicial que é o dobro da atividade de c-ROL. Além disso, o rendimento de imobilização de r-ROL em MNP, avaliado pela retenção de atividade hidrolítica, é superior ao observado para a c-ROL.

### 5.2.2 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais na solução inicial enzimática (solução-mãe), solução enzimática após a imobilização (sobrenadante) e solução-lavagens seguiu o método de Bradford. A capacidade do corante *Coomassie Brilliant blue G250* ao ligar-se aos resíduos de arginina das proteínas, formando um complexo, que absorve a luz a um comprimento de onda 595 nm, permite determinar a concentração da proteína na solução através da leitura espectralométrica. Para tal procedeu-se à construção de uma curva de calibração com soluções de concentração de BSA conhecida que permite explicar 99,49% dos dados da concentração de proteína. A curva de calibração obtida encontra-se representada na figura 8.

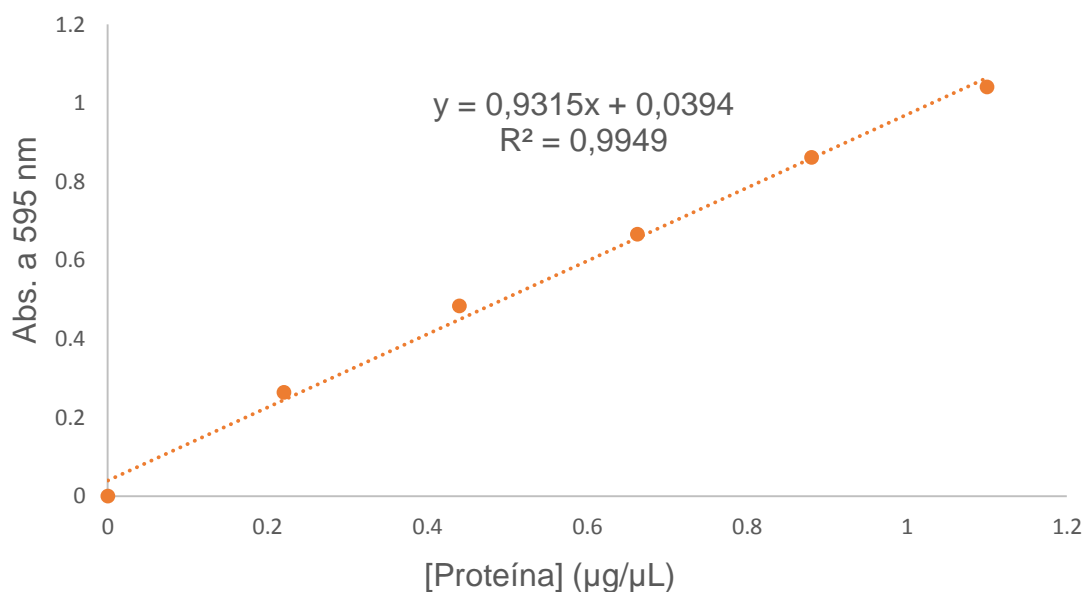


Figura 8 - Curva de calibração que relaciona a concentração de proteína (µg/µL) com a absorvância a 595nm.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância a 595nm de cada solução, foi possível determinar a concentração de proteína presente em cada solução. No quadro 5 apresentam-se os valores obtidos da i) proteína da solução-mãe; ii) proteína perdida, que consiste na quantidade de proteína da solução sobrenadante e da solução de lavagem; iii) proteína imobilizada que é o valor obtido pela diferença entre a proteína na solução-mãe e a proteína perdida e o rendimento obtido pela equação 14.

Quadro 5 - Valores de proteína nas diferentes soluções e o rendimento de imobilização.

Lipase imobilizadas	Proteína da solução-mãe (µg/µL)	Proteína perdida (µg/µL)	Proteína imobilizada (µg/µL)	Rendimento (%)
<b>c-ROL</b>	3,10	2,29	0,82	26,3
<b>r-ROL</b>	3,65	2,69	0,96	26,4

Para ambas as lipases, os rendimentos de imobilização em MNP calculados através da atividade hidrolítica são muito superiores aos calculados através da quantidade de proteína imobilizada. Tal pode ser explicado pelo facto de as proteínas imobilizadas

corresponderem às proteínas com atividade catalítica e não a outras proteínas presentes no extrato enzimático liofilizado.

A lipase comercial *R.oryzae* foi previamente imobilizada em MNP e utilizada como catalisador de produção de MLM por acidólise de OBAB com ácido cáprico (C10:0) ou interesterificação com éster etílico de ácido cáprico (C10 Etil) (Mota *et al.*, 2020). Nesse estudo, o rendimento de imobilização com base na atividade hidrolítica foi de 74,7%, superior ao obtido no presente trabalho, enquanto o rendimento de imobilização baseado no teor de proteína imobilizada foi de 68,3% valor bastante superior ao por nós obtido. É possível que a síntese de MNP feita nos laboratórios não permita um controle de todos os parâmetros levando à obtenção de partículas com diferentes dimensões e reatividade, o que pode explicar a variação observada na quantidade de proteína imobilizada por unidade de massa de MNP.

Esta situação foi também observada na imobilização de r-ROL na resina sintética Amberlite IRA96 (Costa *et al.*, 2018) em que o rendimento de imobilização calculado através da atividade hidrolítica foi de 64,7% enquanto o rendimento baseado na quantidade de proteína imobilizada foi apenas de 22,3%. Rodrigues *et al.*, (2015) verificaram comportamentos semelhantes quando imobilizaram a mesma lipase em diferentes resinas sintéticas.

### **5.3 Produção de lípidos estruturados por acidólise e interesterificação.**

A produção de lípidos estruturados do tipo MLM foi realizada por acidólise do OBAB com ácido caprílico ou por interesterificação com éster etílico de ácido de caprílico (C8 Etil). Os ensaios decorreram durante 48h, a 40°C, em que se testaram duas lipases comerciais imobilizadas (Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM) e duas preparações enzimáticas imobilizadas em MNP (c-ROL e r-ROL).

A figura 7 apresenta a evolução do rendimento em novos TAG, ao longo da reação, obtidos por acidólise (Figura 9-A) ou por interesterificação (Figura 9-B), catalisadas pelas lipases comerciais Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM.

O rendimento em novos TAG obtido por acidólise é semelhante com ambas as enzimas comerciais utilizadas (Figura 9-A). Verifica-se que ao utilizar a enzima comercial Lipozyme TL IM o equilíbrio foi atingido após as 4 horas de reação, com 54% de rendimento, este valor mantém-se estável até às 30 horas, seguido de um decréscimo. Relativamente à enzima comercial Lipozyme RM IM, ao fim das 6 horas é obtido 60% de rendimento e após as 24h de reação ocorre um decréscimo.

O decréscimo do rendimento de novos TAG pode ser explicado pelo facto da acidólise por via enzimática ser uma reação reversível, ocorrendo nos dois sentidos. Através da acidólise ocorre a hidrólise da ligação éster no TAG, seguido de esterificação de um novo ácido gordo, até se atingir o equilíbrio. Ao longo da reação há formação de produtos intermediários como os diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) (Mota *et. al.*, 2020).

Na figura 7-B verifica-se que o rendimento em novos TAG, obtido por interesterificação, é inferior ao obtido por acidólise (Figura 9-A) com as duas enzimas comerciais. Para a enzima comercial Lipozyme RM IM o máximo de rendimento obtido foi de 54% ao fim das 24 horas, ocorrendo de seguida um decréscimo. Com a enzima comercial Lipozyme TL IM o rendimento máximo foi de 42% ao fim de 48 horas de reação (Figura 9-B).

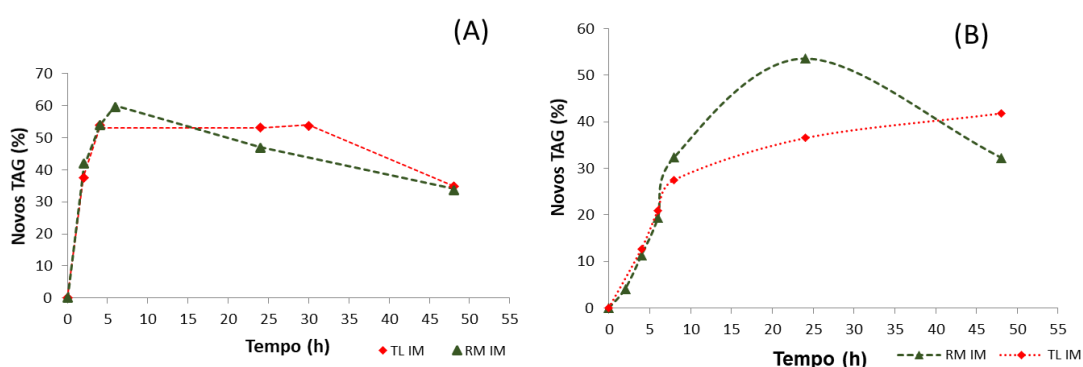


Figura 9 - Evolução do rendimento em novos TAG (%) de baixo valor calórico obtidos pela reação de acidólise com ácido caprílico (A) e interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (B), ao longo de 48h, catalisadas pelas enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, em meio sem solvente, a 40°C.

Mota *et al.*, (2020) apresentam valores de rendimento em novos TAG semelhantes ao obtido neste trabalho, com enzima Lipozyme TL IM, com 52% de rendimento em novos TAG obtido por interesterificação e 40% por acidólise, ao fim de 48 horas de reação.

Na figura 10 verifica-se que a conversão de TAG, por acidólise e por interesterificação, é sempre superior ao rendimento de novos TAG. A conversão dos TAG de óleo de bagaço de azeitona, é superior ao do rendimento dado ao facto dos TAG que são consumidos durante a reação também são usados para a formação de DAG e MAG e não apenas convertidos em novos TAG.

Na figura 10-A verifica-se que a conversão de TAG, por acidólise com ambas as enzimas comerciais Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM foi de 94%, ao fim de 6 e 48 horas de reação, respetivamente.

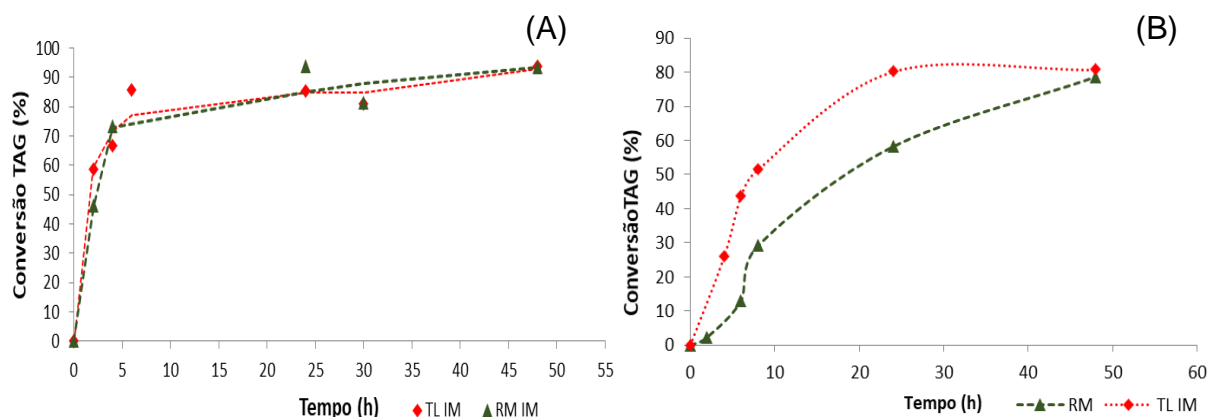


Figura 10 – Conversão de TAG (%) obtidos pela reação de acidólise com ácido caprílico (A) e interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (B), ao longo de 48h, catalisadas pelas enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM em meio sem solvente.

Em termos de conversão de TAG por interesterificação (Figura 10-B) com a enzima comercial Lipozyme RM IM foi obtido um valor de conversão de 79% e de 81% para a enzima Lipozyme TL IM, ambos ao fim de 48 horas.

Mota *et al.*, (2020) apresentam valores de conversão de TAG semelhantes ao obtido neste trabalho, com enzima Lipozyme TL IM, com 85% de conversão de TAG ao fim de 24h obtidos por interesterificação e 70% ao fim de 48h obtidos por acidólise.

Constata-se que a interesterificação com o éster etílico de ácido caprílico foi mais lenta comparativamente com a acidólise com o ácido caprílico, para ambas as lipases comerciais testadas.

#### 5.4 Utilização de lipases imobilizadas em MNP

As lipases comerciais de *Rhizopus oryzae* de Sigma Chemical Co. (c-ROL) e as lipases não comerciais, produzida pelo grupo do Prof. Francisco Valero (r-ROL) foram imobilizadas em MNP e utilizadas em ensaios de acidólise com ácido caprílico para a produção de lípidos estruturados. Os ensaios decorreram durante 48h, a 40°C.

A figura 11 apresenta a evolução do rendimento em novos TAG, ao longo da reação.

Verifica-se que o rendimento em novos TAG obtido por acidólise é semelhante em ambas as enzimas imobilizadas em MNP. Verifica-se que ao utilizar a r-ROL o rendimento em novos TAG foi de 20% e com a c-ROL o rendimento foi de 14%, ao fim de 48 horas de reação.

O rendimento em novos TAG com as enzimas imobilizadas r-ROL e c-ROL em MNP foi um valor bastante inferior comparado com o rendimento obtido com as enzimas comerciais Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM.

Mota *et al.*, (2020) apresentaram um valor bastante superior 51% de rendimento em novos TAG obtido com a enzima *Rhizopus oryzae* imobilizada em MNP.

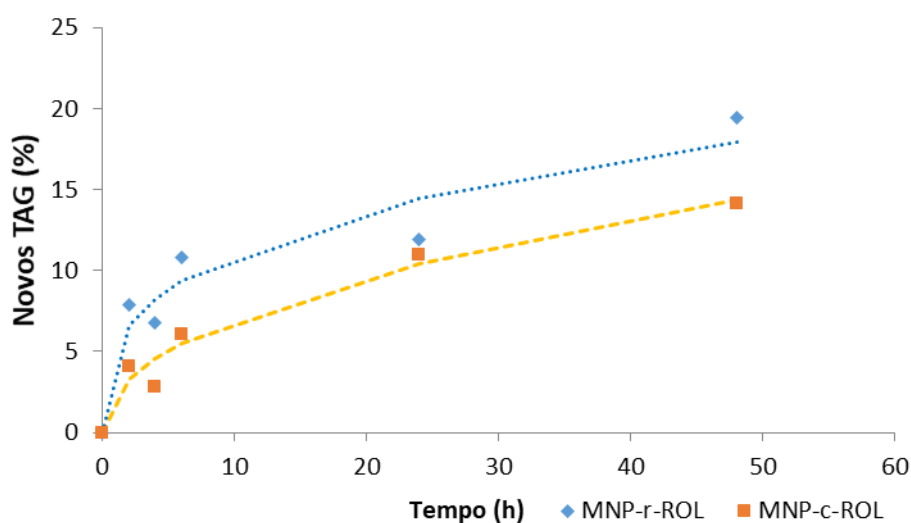


Figura 11 - Evolução do rendimento em novos TAG (%) de baixo valor calórico obtidos pela reação de acidólise ao longo de 48h em meio sem solvente, catalisadas pelas enzimas imobilizadas em MNP não comercial r-ROL e comercial c-ROL.

## 5.5 Produção de biodiesel catalisada por lipases comerciais

O óleo de bagaço de azeitona bruto foi utilizado na produção de ésteres metílicos de ácido gordos (FAME) para utilização como biodiesel por transesterificação com metanol, em meio sem solvente, a 40°C. Utilizaram-se preparações enzimáticas comerciais Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM como catalisadores.

A figura 12 representa a cinética de reação de alcoólise ao longo das 48h de reação. A Figura 12-A representa a reação de alcoólise catalisada pela enzima Lipozyme TL IM e a Figura 12-B a reação de alcoólise catalisada pela enzima Lipozyme RM IM.

Verifica-se que a reação ocorre de forma rápida, atingindo-se uma situação de quase-equilíbrio após 4h de reação com ambas os catalisadores. Após 3 horas de reação, o rendimento mássico de FAME foi de 81%. Ao longo da reação verifica-se a diminuição de TAG e a formação de 2-MAG atingindo um rendimento mássico de 20% com a lipase Lipozyme RM IM e de 22% com a lipase Lipozyme TM IM.

É de referir que estes valores de FAME e 2-MAG são obtidos indiretamente por balanço de massas e não molar.

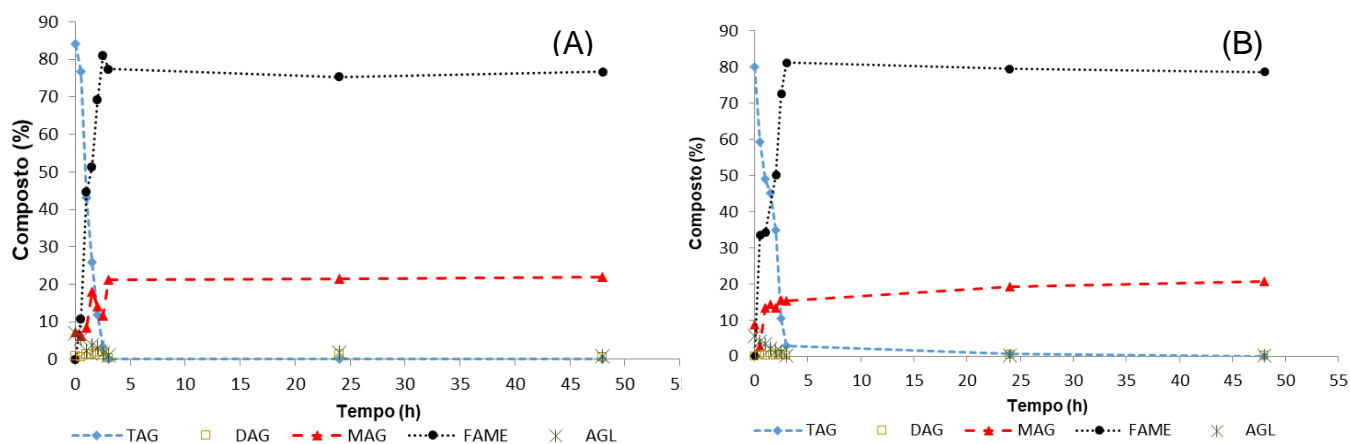


Figura 12 - Cinética de transesterificação de óleo de bagaço de azeitona bruto com metanol catalisada pela enzima comercial Lipozyme TL IM (A) e pela enzima comercial Lipozyme RM IM (B).

## VI. Conclusão

O presente estudo tem como objetivo principal a utilização do óleo de bagaço de azeitona bruto para a produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico e de biodiesel e 2- monoacilgliceróis (2-MAG) com o intuito de valorizar um subproduto da produção de azeite.

A produção de lípidos de baixo valor calórico foi realizada por acidólise de óleo de bagaço de azeitona bruto com ácido caprílico (C8:0) e por interesterificação com éster etílico de ácido caprílico (C8 Etil), catalisadas por lipases comerciais de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM). Os ensaios ocorreram em meio livre de solvente, durante 48 horas, a 40°C.

Ambas as lipases comerciais testadas revelaram preferência por acidólise com ácido caprílico.

Os ensaios de acidólise catalisados pela Lipozyme TL IM atingiram um rendimento em novos TAG de 54% após 4 horas de reação. Com a Lipozyme RM IM, o rendimento em novos TAG foi de 60% ao fim de 6 horas de acidólise. Nos ensaios de interesterificação catalisados pela lipase Lipozyme TL IM o rendimento em novos TAG foi de 42% ao fim de 48h e de 54% com a Lipozyme RM IM após 24 horas de reação.

Dado o elevado custo das enzimas ser uma barreira para aplicações industriais, procedeu-se à imobilização da lipase recombinante comercial liofilizada de *Rhizopus oryzae* (c-ROL) e da lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* (r-ROL) em nanopartículas ferromagnéticas (MNP) com o objetivo de pesquisar alternativas às enzimas comerciais reduzindo, dessa forma os custos de produção de lípidos estruturados.

O rendimento da imobilização em MNP foi determinado a partir da atividade hidrolítica e em termos de teor de proteína das lipases imobilizadas. Ambas as lipases imobilizadas, apresentaram rendimentos de imobilização em MNP calculados através da atividade hidrolítica muito superiores aos calculados através da quantidade de proteína imobilizada.

As lipases c-ROL e r-ROL imobilizadas em MNP apresentaram um rendimento de imobilização calculado através da atividade hidrolítica de 61% e de 87%, respetivamente. Em termos de rendimento de imobilização em proteína imobilizada foi bastante semelhante em ambas as lipases, com 26,3% para a lipase c-ROL e 26,4% para a lipase r-ROL.

O baixo rendimento de imobilização estimado a parti proteínas refletiu-se no rendimento em novos TAG nos ensaios de acidólise com as lipases imobilizadas, com valores de rendimento em novos TAG de 14% e de 20% com a c-ROL e r-ROL, respetivamente.

A síntese de MNP feita nos laboratórios não permite um controlo de todos os parâmetros levando à obtenção de partículas com diferentes dimensões e reatividade, o que pode explicar a baixa quantidade de proteína imobilizada por unidade de massa de MNP.

A produção de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) para utilização como biodiesel, foi realizada através da reação de transesterificação de óleo de bagaço de azeitona bruto com metanol, em meio sem solvente, a 40°C durante 48 horas, catalisadas pelas enzimas comerciais Lipozyme RM IM e Lipzyme TL IM. O rendimento mássico de FAME foi de 81% para ambas as enzimas ao fim de 3 horas de reação. O valor foi obtido indiretamente através de balanço de massa. Uma vez que se utilizaram lipases *sn*- seletivas como catalisadores da transesterificação, obteve-se 2-MAG e não glicerol, como subproduto da reação. Os MAG são compostos importantes como emulsionantes para as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. Os rendimentos mássicos e 2-MAG foram de 20% com a lipase Lipozyme RM IM e de 22% com a lipase Lipozyme TM IM.

Em suma é possível o aproveitamento de óleo de bagaço de azeitona bruto, sem tratamento prévio, para a produção de lípidos estruturados de baixo valor calórico, por catálise com lipases comerciais e com lipases imobilizadas, reduzindo os custos das matérias-primas.

O presente estudo cria possibilidades de futuros trabalhos, para quais são apontadas as seguintes:

- Continuação do estudo de aproveitamento de subprodutos para produção de lípidos estruturados e de biodiesel e 2-MAG, nomeadamente estudos de otimização das condições reacionais e de estabilidade operacional.
- Estudos de influência e controlo de variáveis para a síntese de MNP.

## VII. Referências Bibliográficas

- Aarthy, M., Saravanan, P., Gowthaman, M. K., Rose, C., & Kamini, N. R. (2014). Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. *Chemical engineering research and design*, 92(8), 1591-1601.
- Aggoun, M., Arhab, R., Cornu, A., Portelli, J., Barkat, M., & Graulet, B. (2016). Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process. *Food chemistry*, 209, 72-80.
- Aires, C. M. (2007). Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extracção de azeite em solos agrícolas. Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Pp 1-26.
- Akoh, C. C. (1996). New developments in low calorie fats and oils substitutes. *Journal of Food Lipids*, 3(4), 223-232.
- Akoh, C. C., & Huang, K.-h. (1995). Enzymatic Synthesis Of Structured Lipids: Transesterification Of Triolein And Caprylic Acid. *Journal Of Food Lipids*, 2(4), 219–230.
- Albuquerque, J. A., Gonzalvez, J., Garcia, D., & Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195–200.
- Alex, D., Mathew, A., & Sukumaran, R. K. (2014). Esterases immobilized on aminosilane modified magnetic nanoparticles as a catalyst for biotransformation reactions. *Bioresource technology*, 167, 547-550.
- Angerosa, F., Camera, L., Cumitini, S., Gleixner, G., & Reniero, F. (1997). Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(8), 3044-3048.
- Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14.
- Bermejo, S., Ventura, C., Ribeiro, M., Henriques, M., & Laranjeira, C. (2014). Óleos alimentares usados: caracterização físico-química para selecção de indicadores de degradação de qualidade e de melhores práticas laboratoriais disponíveis. Escola Superior Agrária de Santarém, Santarém, Portugal.

- Boskou, D. (2015). Olive oil: Properties and processing for use in food. In *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition* (pp. 3-38). Woodhead Publishing.
- Caballero, E., Soto, C., Olivares, A., & Altamirano, C. (2014). Potential use of avocado oil on structured lipids MLM-type production catalysed by commercial immobilized lipases. *Plos one*, 9(9), e107749.
- Can, K., Ozmen, M., & Ersoz, M. (2009). Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 154-159.
- Caputo, A. C., Scacchia, F., & Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23(2), 197-214.
- Carlier, H., Bernard, A., & Caselli, C. (1991). Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids. *Reproduction, Nutrition, Development*, 31(5), 475–500
- Carluccio, M. A., Massaro, M., Bonfrate, C., Siculella, L., Maffia, M., Nicolardi, G., & De Caterina, R. (1999). Oleic acid inhibits endothelial activation: a direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the Mediterranean diet. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(2), 220-228.
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S., & Drioli, E. (2016). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36(1), 43-58.
- Chow, C., (2008). *Fatty Acids In Foods And Their Health Implications*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, (pp. 1-10, 164-196, 443, 461-502)
- Clodoveo, M. L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future—An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 25(1), 13-23.
- Costa, C. M., Osório, N. M., Canet, A., Rivera, I., Sandoval, G., Valero, F., & Ferreira-Dias, S. (2018). Production of MLM Type Structured Lipids From Grapeseed Oil Catalyzed by Non-Commercial Lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*
- Covas, M.-I., Konstantinidou, V., & Fitó, M. (2009). Olive Oil and Cardiovascular Health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6), 477–482.
- Da Cunha, M. E., Krause, L. C., Moraes, M. S. A., Faccini, C. S., Jacques, R. A., Almeida, S. R., & Caramão, E. B. (2009). Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale. *Fuel Processing Technology*, 90(4), 570-575.

De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food chemistry*, 104(2), 858-867.

Di Giovacchino, L. (1991). Olive oil extraction by pressing, centrifugation and percolation: Effect of extraction methods on oil yields. *Olivae*, 36, 14-41..

Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surricchio, G., & Basti, C. (2001). Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European journal of lipid science and technology*, 103(5), 279-285.

Dizge, N., Aydiner, C., Imer, D. Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., & Keskinler, B. (2009). Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource technology*, 100(6), 1983-1991.

Ergönül, P. G., & Sánchez, S. (2013). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different types of olive and olive pomace oils produced in Turkey and Spain. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(9), 1078-1084.

Erlanson-Albertsson, C. (1983). The interaction between pancreatic lipase and colipase: a protein-protein interaction regulated by a lipid. *FEBS letters*, 162(2), 225-229.

EU trade in olive oil. Disponível em <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20191108-1#:~:text=Your%20key%20to%20European%20statistics&text=EU%20Member%20States%20exported%20over,total%20exports%20compared%20with%202013> (Visitado a 26 de Novembro 2020)

EUFIC, 2014 – What's in food – Disponível em <https://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/facts-on-fats-the-basics#:~:text=Fatty%20acids%20are%20classified%20according,more%20than%20one%20double%20bond> (Visitado a 26 de Setembro 2020)

Feltes, M. M., de Oliveira Pitol, L., Correia, J. G., Grimaldi, R., Block, J. M., & Ninow, J. L. (2009). Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. *Grasas y Aceites*, 60(2), 168-176.

Ferreira-Dias, S. (2010). Enzymatic production of functional fats. *Comprehensive Food Fermentation Biotechnology*, 2, 608-641.

- Ferreira-Dias, S., Osório, N. M., Rodrigues, J., & Tecelão, C. (2019). Structured Lipids for Foods. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 357–369). Elsevier.
- Finley, J. W., Klemann, L. P., Leveille, G. A., Otterburn, M. S., & Walchak, C. G. (1994). Caloric availability of SALATRIM in rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), 495–499.
- Fomuso, L. B., & Akoh, C. C. (1997). Enzymatic modification of triolein: Incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(3), 269-272.
- Gao, Y. Y., Chen, W. W., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., & Ruan, R. (2009). Optimization of transesterification conditions for the production of fatty acid methyl ester (FAME) from Chinese tallow kernel oil with surfactant-coated lipase. *Biomass and bioenergy*, 33(2), 277-282.
- Giuliani, A., Cerretani, L., & Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: Chemistry and occurrences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 678–690.
- Gomes, T., & Caponio, F. (1998). Evaluation of the State of Oxidation of Olive– Pomace Oils. Influence of the Refining Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 1137-1142.
- Gomes, T., Caponio, F. (1997) – Evaluation of the state of oxidation of crude olive-pommace oils. Influence of olive-pomace drying and oil extraction with solvent. *J. Agric. Food Chemistry*. 45: 1381-1384
- Guisan, J. M. (Ed.). (2006). *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology™*
- Gunstone, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. Review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1535–1549.
- Henriques, C. A. D. S. (2017). *Nanocompósitos Magnéticos incluindo Macrociclos Tetrapirrólicos-Aplicação em catálise oxidativa biomimética* (Doctoral dissertation, Universidade de Coimbra).
- Hinojosa, A. R., & Méndez, M. V. R. (2004). Orujos de dos fases almacenados en balsas. *Grasas y Aceites*, 55(3), 251–258.
- Horrobin, D. F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research*, 31(2), 163–194.

Horrocks, L. A., & Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological research*, 40(3), 211–225.

INE, 2019. Disponível em [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&userLoadSave=Load&userTableOrder=9286&tipoSelecao=1&contexto=pq&selTab=tab1&submitLoad=true&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&userLoadSave=Load&userTableOrder=9286&tipoSelecao=1&contexto=pq&selTab=tab1&submitLoad=true&xlang=pt) (Visitado 13 de Dezembro 2020)

Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., & Ravindra, P. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase—a critical review. *Critical reviews in biotechnology*, 28(4), 253-264.

Kapoor, R., & Huang, Y.-S. (2006). Gamma Linolenic Acid: An Antiinflammatory Omega-6 Fatty Acid. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(6), 531–534.

Khanal, R. C., & Olson, K. C. (2004). Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review. *Pakistan Journal of Nutrition*.

Kim, B. H., & Akoh, C. C. (2006). Characteristics of structured lipid prepared by lipase-catalyzed acidolysis of roasted sesame oil and caprylic acid in a bench-scale continuous packed bed reactor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(14), 5132-5141.

Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139.

Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook* (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A. and Matsudaira, P., (2003). *Molecular Cell Biology*. 5th ed. (pp.312-313), New York: W.H. Freeman and Company.

Lortie, R. (1997). *Enzyme catalyzed esterification*. *Biotechnology Advances*, 15(1), 1–15.

Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H. Y., Zhang, H. Q., & Gu, N. (2003). Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 212(2-3), 219-226.

Maity, D., & Agrawal, D. C. (2007). Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308(1), 46-55.

- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., & Amundson, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils-A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*.
- Marangoni, A. G., & Rousseau, D. (1995). Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends in Food Science & Technology*, 6(10), 329-335.
- Martins, D. A. O. (2016). Valorização de resíduos da indústria do azeite: análise do potencial da recuperação de antioxidantes e de água (Master's thesis).
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology*, 40(6), 1451-1463.
- Mateos, R., Sarria, B., & Bravo, L. (2019). *Nutritional and other health properties of olive pomace oil. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.
- Moral, P. S., & Méndez, M. V. R. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas y Aceites*, 57(1), 47-55.
- Moreno, P. G., Medina, A. R., Rubio, F. C., Camacho Páez, B., & Grima, E. M. (2004). Production of structured lipids by acidolysis of an EPA-enriched fish oil and caprylic acid in a packed bed reactor: analysis of three different operation modes. *Biotechnology progress*, 20(4), 1044-1052.
- Mota, D. A., Rajan, D., Heinzl, G. C., Osório, N. M., Gominho, J., Krause, L. C., & Ferreira-Dias, S. (2020). Production of low-calorie structured lipids from spent coffee grounds or olive pomace crude oils catalyzed by immobilized lipase in magnetic nanoparticles. *Bioresource Technology*, 123223.
- Nelson, D. and Cox, M., (2008). *Lehninger Principles Of Biochemistry*. 5th ed., (pp.183-188, 204, 343-349, 363).New York: W.H. Freeman and Company.
- NP-937, N. P. Gorduras e óleos comestíveis. Determinação da cor dos óleos e suas características cromáticas. (2aedição) (1987). Lisboa: IPQ.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., & Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993–998.

Osborn, H. T., & Akoh, C. C. (2002). *Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(3), 110–120.

Parodi, P. W. (1994). Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Australian Journal of Dairy Technology (Australia)*.

Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., & Eisenthal, R. (2007). The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochemical Journal*, 402(2), 331–337.

Pokorny, J., Kalinova, L., & Dyssele, P. (1995). Determination of chlorophyll pigments in crude vegetable oils: Results of a collaborative study and the standardized method (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1781-1787.

Polakovič, M., Vrabel, P., & Bálež, V. (1998). Approaches for improved identification of mechanisms of enzyme inactivation. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 15, pp. 77-82). Elsevier.

Regulamento (UE) N.º 1308/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de dezembro de 2013 que estabelece uma organização comum dos mercados dos produtos agrícolas e que revoga os Regulamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 103797/2001, (CE) n.º 1234/2007 do Conselho

Regulamento Delegado (UE) n.º 1830/2015 da Comissão, de 8 de julho de 2015, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L266

Rodrigues, J., Perrier, V., Lecomte, J., Dubreucq, E., & Ferreira-Dias, S. (2016). Biodiesel production from crude jatropha oil catalyzed by immobilized lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* in aqueous medium. *Bioresource Technology*, 218, 1224-1229.

Ruzich, N. I., & Bassi, A. S. (2011). Proposed kinetic mechanism of biodiesel production through lipase catalysed interesterification with a methyl acetate acyl acceptor and ionic liquid [BMIM][PF6] co-solvent. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 89(1), 166-170.

Schwingshackl, L., Lampousi, A.-M., Portillo, M. P., Romaguera, D., Hoffmann, G., & Boeing, H. (2017). Olive oil in the prevention and management of type 2 diabetes mellitus:

a systematic review and meta-analysis of cohort studies and intervention trials. *Nutrition & Diabetes*, 7(4), e262–e262.

Sebadelhe, C. S. M. (2008). Contribuição do sector do azeite para a produção de biodiesel (Doctoral dissertation).

Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2004). Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. *Energy & Fuels*, 18(1), 154-159.

Smith, K. W. (2015). Structured triacylglycerols: Properties and processing for use in food. In *Specialty oils and fats in food and nutrition* (pp. 207-218). Woodhead Publishing.

Soares, C. M., De Castro, H. F., De Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (1999). Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 745-757). Humana Press, Totowa, NJ.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology advances*, 28(5), 628-634.

Tartaj, P., del Puerto Morales, M., Veintemillas-Verdaguer, S., González-Carreño, T., & Serna, C. J. (2003). The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R182.

Turan, S., Karabulut, I., & Vural, H. (2006). Effects of reaction parameters on the incorporation of caprylic acid into soybean oil for production of structured lipids. *Journal of Food Lipids*, 13(3), 306-317.

Wang, J., Meng, G., Tao, K., Feng, M., Zhao, X., Li, Z., & Lu, J. R. (2012). Immobilization of lipases on alkyl silane modified magnetic nanoparticles: effect of alkyl chain length on enzyme activity. *Plos one*, 7(8), e43478.

Xu, X. (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European journal of lipid science and technology*, 102(4), 287-303.

Xu, Y., Du, W., Liu, D., & Zeng, J. (2003). A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology letters*, 25(15), 1239-1241.

Yankah, V. V., & Akoh, C. C. (2000). Lipase-catalyzed acidolysis of tristearin with oleic or caprylic acids to produce structured lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(5), 495-500.

Yu, C. Y., Huang, L. Y., Kuan, I., & Lee, S. L. (2013). Optimized production of biodiesel from waste cooking oil by lipase immobilized on magnetic nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 14(12), 24074-24086.

Yücel, Y. (2011). Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. *Bioresource technology*, 102(4), 3977-3980.

Zaia, D. A., Zaia, C. T. B., & Lichtig, J. (1998). Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. *Química Nova*, 21(6), 787-793.

Zschau, W. (2001). Bleaching of edible fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(8), 505–551.