



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maëva Christelle Ferreira Almeida

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
SAPONIFICAÇÃO DE ÓLEO ALIMENTAR
USADO PARA PREPARAÇÃO DE
DETERGENTES ECOLÓGICOS**

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Avançada e Industrial variante Desenvolvimento e Estratégia orientada pelo Professor Doutor Filipe João Cotovio Eufrásio Antunes e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Novembro de 2020

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Otimização do Processo de Saponificação de Óleo Alimentar Usado para Preparação de Detergentes Ecológicos

Maëva Christelle Ferreira Almeida

VOLUME 1

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Avançada e Industrial variante
Desenvolvimento e Estratégia orientada pelo Professor Doutor Filipe João Cotovio Eufrásio
Antunes e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra.

Novembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Num ano tão atípico como o de 2020, conseguir levar avante um projeto desta dimensão, com princípio, meio e fim, é uma enorme conquista e um grande motivo de orgulho. Foram vividas muitas incertezas, para além daquelas que um projeto científico por si só já impõe, muitas dores de cabeça, e posteriormente muita determinação e trabalho árduo para que tudo fosse possível. Muitas vezes, um projeto não depende inteiramente de nós, mas se soubermos dar o nosso melhor, ele terá sempre um brilho maior! Um projeto também não é tão grandioso, sem uma grande equipa por detrás, e por isso tenho alguns agradecimentos a fazer “à minha equipa”...

Ao Professor Doutor Filipe Antunes, quero agradecer pelas oportunidades e projetos inspiradores que me tem dado ao longo do meu percurso académico, e em especial por este projeto de tese.

Ao Doutor César Henriques, agradeço também pelas oportunidades e projetos ao longo do meu percurso académico. Foi um prazer contribuir um pouco mais para a EcoX.

Ao Doutor Hugo Filipe, à Mestre Margarida Esteves e à Mestre Cátia Esteves, agradeço pelo acompanhamento, dedicação, disponibilidade e todos os ensinamentos ao longo do projeto.

À Professora Doutora Dina Murtinho, agradeço pela disponibilidade e cedência de material essencial ao trabalho laboratorial.

Ao Grupo Colling, um obrigada pelo acolhimento, e um agradecimento especial ao meu turno de trabalho por toda a partilha e entajuda.

Ao Alexandre Silva, agradeço do fundo do coração toda a ajuda e apoio em prol deste projeto e também do meu estado emocional.

Aos amigos que Coimbra me deu e ao NEQ/AAC, agradeço por só restarem memórias felizes e termos crescido tanto uns com os outros.

À minha família, em especial ao meu pai, quero agradecer por acreditarem em mim e me terem proporcionado toda esta aventura que foi a Universidade de Coimbra!

Esta é “a minha equipa”, muito obrigada a todos, este projeto não seria o mesmo sem vocês!

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projeto “ ECOX, RECICLAGEM DE GORDURAS ALIMENTARES ATRAVÉS DA QUÍMICA VERDE” liderado pela empresa EcoXperience, S.A., em copromoção com Universidade de Coimbra e a Tecnocanto - Tecnologia De Sistemas E Equipamentos Industriais, LDA. Um projeto cofinanciado pelo CENTRO 2020 no âmbito do PT2020 através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), cujo NUP é CENTRO-01-0247-FEDER-033838

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
ÍNDICE	2
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABELAS.....	10
ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Impacto Mundial dos Óleos Alimentares Usados	20
1.2. Valorização de Óleo Alimentar Usado	22
1.2.1. Formas de Valorização do OAU.....	22
1.2.2. Enquadramento Legal	23
1.3. Óleos Alimentares em Estudo	26
1.4. Do OAU aos Surfactantes	32
1.5. Enzimas em Estudo	38
1.6. Dinâmica Molecular	41
1.7. Objetivos do Projeto	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1. Dinâmica Molecular	50
2.1.1. Sistemas usados	50
2.1.1.1. Descrição, composição e construção dos sistemas.....	50
2.1.2. Parametrização molecular	52

2.1.3.	Configuração das simulações	52
2.1.4.	Análise de dados	53
2.1.4.1.	Análise estrutural, RMSD e RMSF	53
2.1.4.2.	Processo de interação das proteínas com o óleo.....	53
2.1.4.3.	Visualização das trajetórias.....	54
2.1.4.4.	Análise das caixas de solvente usadas	54
2.2.	Componente Laboratorial	54
2.2.1.	Caracterização experimental dos óleos alimentares usados	54
2.2.1.1.	Índice de Acidez	55
2.2.1.2.	Índice de Saponificação.....	55
2.2.1.3.	Índice de Iodo.....	56
2.2.1.4.	Espectroscopia FTIR-ATR.....	56
2.2.1.5.	Espectroscopia UV-Visível	58
2.2.2.	Otimização da reação de hidrólise	59
2.2.2.1.	Estudos Cinéticos da Reação de Hidrólise.....	60
2.2.2.2.	Estudo de Condições de Referência para a Reação de Hidrólise	60
2.2.2.3.	Planeamento Factorial da Reação de Hidrólise.....	61
2.2.3.	Preparação e Caracterização dos Detergentes	63
2.2.3.1.	Preparação dos Detergentes.....	63
2.2.3.2.	pH.....	63
2.2.3.3.	Teste de Espuma	63
2.2.3.4.	Índice de Emulsificação	64
2.2.3.5.	Reologia.....	64
2.2.3.6.	Tensiometria	65
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1.	Dinâmica Molecular	70
3.1.1.	Sistemas TOG/Água.....	70
3.1.1.1.	Análise da estabilidade estrutural dos modelos das proteínas.....	70
3.1.1.2.	Caracterização do processo de ligação da proteína à interface óleo/água	72
3.1.1.3.	Caracterização dos resíduos mais importantes na interação das proteínas com o óleo 75	
3.1.1.4.	Caracterização dos ácidos gordos no processo de interação do centro ativo da proteína com o óleo	78
3.1.1.5.	Caracterização dos resíduos da proteína que contribuem para a interação dos triglicerídeos com o centro ativo da proteína	78
3.1.2.	Novos Sistemas Óleo/Água	79
3.1.2.1.	Caracterização e Validação das Novas Caixas de Óleo.....	79
3.1.2.2.	Análise da estabilidade estrutural das proteínas nos novos sistemas	81

3.1.2.3.	Caracterização do processo de ligação da proteína à interface óleo/água	85
3.1.2.4.	Caracterização dos resíduos mais importantes na interação das proteínas com o óleo 88	
3.1.2.5.	Caracterização dos triglicerídeos no processo de interação do centro ativo da proteína com o óleo	94
3.1.2.6.	Caracterização dos resíduos da proteína que contribuem para a interação dos triglicerídeos com o centro ativo da proteína	97
3.2.	Componente Laboratorial	98
3.2.1.	Caracterização experimental dos óleos usados	98
3.2.1.1.	Índice de Acidez	98
3.2.1.2.	Índice de Saponificação	99
3.2.1.3.	Índice de Iodo	101
3.2.1.4.	Espectroscopia FTIR-ATR	101
3.2.1.5.	Espectroscopia UV-Visível	103
3.2.2.	Otimização da Reação de Hidrólise	105
3.2.2.1.	Estudos Cinéticos da Reação de Hidrólise	106
3.2.2.2.	Estudo de Condições de Referência para a Reação de Hidrólise	106
3.2.2.3.	Planeamento Factorial da Reação de Hidrólise	108
3.2.3.	Caracterização dos Detergentes	114
3.2.3.1.	pH	115
3.2.3.2.	Teste de Espuma	116
3.2.3.3.	Índice de Emulsificação	117
3.2.3.4.	Reologia	118
3.2.3.5.	Tensiometria	119
4.	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	128

Índice de Figuras

Figura 1 - Consumo de óleos vegetais a nível mundial. Adaptado de https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/ ¹	26
Figura 2 - Reação de saponificação dos triglicerídeos.	32
Figura 3 - Representação esquemática da adição de surfactante a água em contacto com ar, até se atingir a concentração micelar crítica (CMC). Adaptado de Anika Hamberger & Katharina Landfester. ³⁸	34
Figura 4 - Agregados micelares consoante o seu grau de empacotamento (CPP): (a) Micela esférica; (b) Micela cilíndrica; (c) Vesícula; (d) Fase lamelar; (e) Micela reversa. Adaptado de Domenico Lombardo et al. ³⁹	35
Figura 5 – Esquematisação do processo de lavagem usando surfactantes. Adaptado de Bock K., Stache H.. ⁴⁰	36
Figura 6 - Reação enzimática de hidrólise usada no processo de saponificação.	37
Figura 7 - Mecanismo de ativação interfacial da lipase. A branco está representada uma interface lipídica, e a preto um lípido que viaja entre a interface e o meio aquoso. Esta imagem permite observar que a enzima assim que se liga à interface adota uma conformação específica para favorecer a sua atividade, e ao mesmo tempo que o seu centro ativo apenas tem afinidade para os lípidos da interface. Imagem adaptada de Gelb, M. <i>et al.</i> ⁴⁸	39
Figura 8 - Mecanismo de catálise da lipase. Adaptado de Reis, P. <i>et al.</i> ⁴⁹	40
Figura 9 - A imagem do lado esquerdo representa a proteína TLL na sua conformação aberta, sendo que a cor rosa representa o lid, e a cor amarela representa o trio catalítico. A figura do lado direito representa uma aproximação da zona do lid e trio catalítico da proteína TLL, demonstrando o movimento que o lid adota face às duas conformações da proteína: com o lid cinzento estamos perante a conformação fechada, e com o lid vermelho estamos perante a conformação aberta. Imagens adaptadas de https://www.rcsb.org/ e de Jakob Skjold-Jørgensen <i>et al.</i> ⁴⁶	40
Figura 10 - Três sequências de aminoácidos do lid das proteínas (entre os resíduos 82 e 98), a primeira (1EIN) e a terceira (Esterase) combinadas deram origem à segunda (1EIN_Hybrid). Adaptado de Willems, N., <i>et al.</i> ⁵¹	41
Figura 11 - Representação do mapeamento do modelo MARTINI para as moléculas de água (A) e para um lípido (B). Os círculos a azul transparente representam as esferas (beads) do mapeamento. Adaptado de Marrink, S. e Tieleman, D. ⁵⁵	43
Figura 12 - Exemplo de sistema bifásico óleo/água, em que a caixa de óleo é composta por moléculas de trioleína e a caixa de água por moléculas de água. Na interface que delimita a água e o óleo está a proteína 1EIN.	51
Figura 13 - Demonstração do funcionamento do equipamento de FTIR-ATR, em que um feixe infravermelho atravessa o cristal e atinge a amostra, gerando uma reflexão interna total, e	

de seguida sai pela extremidade oposta do cristal seguindo para o detetor do espectrofotómetro. Adaptado de https://covalentmetrology.com/atr-ftir/	57
Figura 14 – Demonstração do funcionamento de um espectrofotómetro UV-Vis. Adaptado de https://bit.ly/38NTF5O	58
Figura 15 - Ilustração do funcionamento do reómetro, mais propriamente do cone exercendo tensão e rotação sobre a amostra (a cor de laranja). Adaptado de https://bit.ly/3kCRoWC	65
Figura 16 - Esquematização do método do anel Du Noüy. Do lado direito o anel a submergir na amostra, do lado esquerdo a força exercida que leva à determinação da tensão superficial. Adaptado de https://bit.ly/31CVAO1	66
Figura 17 - Gráficos de RMSD e RMSF para os sistemas TOG/água com as proteínas 1DT3, 1EIN e 1EIN_Hybrid.	71
Figura 18 - Proteína 1EIN em 3D. A região dentro do círculo preto representa a região de resíduos próximos do 250. Imagem retirada de https://www.rcsb.org/structure/1EIN	72
Figura 19 - Distâncias (nm) da proteína ao centro de massa do óleo em função do tempo de simulação para cada sistema TOG/água.....	73
Figura 20 - Proteína 1EIN numa caixa bifásica óleo/água, à esquerda com o lid destacado, à direita com o vetor destacado correspondente ao lid.	73
Figura 21 - Exemplificação dos ângulos que o vetor pode adotar ao longo da simulação. .	74
Figura 22 - Ângulo formado pelo vetor da proteína e o eixo z da interface óleo/água em função do tempo de simulação para cada sistema em estudo.....	75
Figura 23 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com o óleo para cada sistema TOG/Água.....	76
Figura 24 - Gráfico-resumo dos resíduos mais importantes (que mais se repetem nos diferentes replicados) para cada sistema em estudo.	77
Figura 25 - Frequência de interação dos triglicéridos do óleo com o centro ativo (Bsite) da proteína nos diferentes sistemas TOG/Água.	78
Figura 26 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com os triglicéridos que mais interagiram com o centro ativo da proteína.....	79
Figura 27 - Exemplos de conformações moleculares da tripalmitina. A, B e C verificam-se no estado sólido ou gel, D verifica-se no estado líquido. Adaptado de Hall, A. ⁷⁵	80
Figura 28 - Comportamento do ângulo ES1-GLY-ES3 da tripalmitina e trioléina à temperatura de 25°C e 60°C.....	81
Figura 29 - RMSD e RMSF dos sistemas óleo de colza/água, óleo de girassol/água e óleo de palma/água com as proteínas 1EIN e 1EIN_Hybrid.	84
Figura 30 - Distância da proteína 1EIN_hybrid ao centro de massa do óleo ao longo do tempo.	85
Figura 31 - Distância da proteína 1EIN ao centro de massa do óleo ao longo do tempo. ...	86
Figura 32 - Ângulo formado pelo vetor da proteína e o eixo z da interface óleo/água em função do tempo de simulação para cada sistema em estudo.....	88

Figura 33 - Frequência de interação com o óleo dos resíduos da proteína para cada sistema em estudo.	90
Figura 34 - Gráfico-resumo dos resíduos mais importantes (que mais se repetem nos diferentes replicados) para cada sistema em estudo.	91
Figura 35 - Frequência de interação dos triglicerídeos do óleo com o centro ativo da proteína para cada sistema em estudo.	96
Figura 36 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com os triglicerídeos que mais interagiram com o centro ativo da proteína para cada sistema em estudo.	97
Figura 37 - Resultados do índice de acidez dos diferentes óleos virgens e submetidos a ciclos de frituras.	99
Figura 38 - Resultados do índice de saponificação dos diferentes óleos virgens e submetidos a frituras.	100
Figura 39 - Resultados do índice de iodo dos diferentes óleos virgens e submetidos a frituras.	101
Figura 40 - Espectros de FTIR-ATR dos diferentes óleos de colza, girassol e palma virgens e usados.	102
Figura 41 - Espectros de absorção UV-Vis normalizados, para o Óleo de Colza, Óleo de Girassol e Óleo de Palma virgem, submetidos a 3 ciclos de frituras e a 5 ciclos de frituras. ...	104
Figura 42 - Percentagem de dienos conjugados nas amostras de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados.	105
Figura 43 - Rendimento da reação de hidrólise ao longo do tempo durante 24 horas para o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. Condições de reação: proporção óleo/água 2:1 (peso total da reação de 80g), com uma concentração de SLE ₂ S de 0.07 mM, Lipex a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 60°C e velocidade de agitação de 1500 rpm.	106
Figura 44 - Efeito da proporção óleo/água, % de Lipex (em relação à massa de óleo), temperatura e velocidade de agitação na reação de hidrólise para o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. Condições padrão de reação: proporção óleo/água 2:1 (peso total da reação de 30g), com uma concentração de SLE ₂ S de 0.07 mM, Lipex a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 20°C para óleo de colza e óleo de girassol e 60°C para óleo de palma, velocidade de agitação de 1500 rpm, 5 horas.	108
Figura 45 - Gráficos de superfície de resposta, que mostram a interação mútua de quaisquer duas variáveis no rendimento da hidrólise do óleo de colza. (a) % Lipex e tempo de reação. (b) temperatura e tempo de reação. (c) proporção óleo/água e tempo de reação. (d) temperatura e % Lipex. (e) proporção óleo/água e % Lipex. (f) proporção óleo/água e temperatura.	111
Figura 46 - Rendimento nas condições ótimas selecionadas (5 horas, 8.75% m/v de Lipex em relação à massa de óleo, 60°C, proporção óleo/água 1.5, 1500 rpm, 0.07Mm de SLE ₂ S) da reação de hidrólise para cada óleo.	114
Figura 47 - Detergentes de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados, preparados em laboratório.	115

Figura 48 - Resultados obtidos para o teste da espuma para os detergentes do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados, e para um detergente comercial.	117
Figura 49 - Índice de emulsificação das formulações de detergente do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e do detergente do comercial, ao longo de 3 dias.	118
Figura 50 – Gráfico do lado esquerdo: resultados da viscosidade dos em função da tensão para os detergentes de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e para o detergente comercial. Gráfico do lado direito: ampliação da escala para os resultados dos detergentes de óleo de colza e girassol virgens e usados e para o detergente comercial.	119
Figura 51 - Resultados para a tensão superficial das soluções de concentração 1g/L das formulações de detergente do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e do detergente do chão comercial.	120

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Enquadramento legal dos OAU.	24
Tabela 2 - Composição dos óleos de palma, colza e girassol. Informação em conformidade com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. ³¹	30
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos óleos em estudo segundo o Decreto-Lei nº 106/2005.....	31
Tabela 4 - Constituição dos diferentes sistemas bifásicos.	51
Tabela 5 - Variáveis e factores usados no planeamento factorial.	61
Tabela 6 - Conjunto de experiências definido pelo Design Expert, para realização do planeamento factorial.	62
Tabela 7 - Caracterização dos resíduos mais importantes (identificados na Figura 24) quanto ao tipo de aminoácido.	77
Tabela 8 - Caracterização dos resíduos mais importantes (identificados na Figura 34) quanto ao tipo de aminoácido.	92
Tabela 9 - Reações do planeamento factorial e respectivos rendimentos.	109
Tabela 10 - Cenários de otimização obtidos através do software Design Expert.	112
Tabela 11 - pH final das formulações de detergente do chão preparadas e do detergente do chão comercial.	115



Abreviaturas

LDL – *Low Density Lipoproteins*;

OAU – Óleo(s) Alimentar(es) Usado(s);

RGGR – Regime Geral de Gestão de Resíduos;

e-GAR – Guias Eletrónicos de Acompanhamento de Resíduos;

SIRER – Sistema Integrado de Registo Eletrónico de Resíduos;

CMC – Concentração Micelar Crítica;

CPP – Factor de Empacotamento Crítico;

CMT – Temperatura Micelar Crítica;

HLB – Balanço Hidrofílico- Lipofílico;

HORECA – *Hotels, Restaurants and Catering*;

DM – Dinâmica Molecular;

CG – *Coarse Grained*;

TLL – *Thermomyces Lanuginosus Lipase*;

RMSD – *Root Mean Square Deviation*;

RMSF - *Root Mean Square Fluctuation*;

VMD – *Visual Molecular Dynamics*;

RMN – Ressonância Magnética Nuclear;

FTIR – *Fourier Transform InfraRed*;

ATR – *Attenuated Total Reflectance*;

SLES – *Sodium Laury Eter Sulfate*;

rpm – Rotações Por Minuto;

3D – 3 Dimensões;

TOG – Trioleína;

TPG – Tripalmitina;

TLG – Trilinoleína;

Resumo

Os óleos alimentares usados (OAU) quando descartados incorretamente, acabam por atingir o meio aquático e prejudicar os ecossistemas envolventes, tornando-se um grande problema ambiental. Já existem algumas formas de combater este problema através da valorização dos OAU, principalmente através da sua transformação em biodiesel.

Neste trabalho pretende-se valorizar o OAU, através de estudos de otimização do processo de saponificação, que posteriormente resultam na preparação de detergente do chão, com menor impacto ambiental que os detergentes convencionais conhecidos no mercado. Para este estudo, foram escolhidos o óleo de palma, óleo de colza e óleo de girassol, que são três dos óleos mais consumidos no mundo, e que até ao momento ainda não foram estudados com este propósito.

O projeto inclui duas componentes, uma computacional de dinâmica molecular e uma componente laboratorial. Em dinâmica molecular estudou-se o comportamento da enzima *Thermomyces Lanuginosus* (TLL) em sistemas bifásicos óleo/água que visam reproduzir a reação de hidrólise dos óleos em estudo. Estes estudos demonstraram que a proteína TLL tem um comportamento semelhante perante os diferentes óleos. A componente laboratorial consistiu numa caracterização dos óleos virgens e usados através do índice de acidez, saponificação, iodo e as espectroscopias de FTIR e UV-Vis. Posteriormente passou-se à otimização da reação de hidrólise através do planeamento factorial, e por fim a preparação e caracterização dos detergentes, através de pH, teste de espuma, índice de emulsificação, viscosidade e tensão superficial. Ao longo do trabalho laboratorial concluiu-se que os óleos virgens e usados são muito semelhantes em termos de propriedades fisico-químicas, e que os detergentes obtidos através destes óleos são muito semelhantes aos detergentes comerciais existentes no mercado, com a vantagem de serem mais ecológicos na sua preparação e com menor impacto ambiental após o seu descarte

Abstract

When incorrectly disposed, used cooking oils (UCO) end up reaching the aquatic environment and damaging the surrounding ecosystems, becoming a major environmental problem. There are already some solutions to combat this problem through the valorization of UCO, mainly through their transformation into biodiesel.

This work intends to study UCOs demonstrating its value through optimization studies of the saponification process, which later result in the preparation of detergent with less environmental impact than the synthetic detergents present in the market. Palm oil, rapeseed oil and sunflower oil were the oils elected for the matter of this study since they are among the most consumed oils in the world and haven't yet been studied for this purpose.

The project includes two components, a molecular dynamics component and a laboratory component. In molecular dynamics, the behavior of the enzyme *Thermomyces Lanuginosus* (TLL) was studied in two-phase oil/water systems that aim to reproduce the hydrolysis reaction of the oils under study. These studies have shown that the TLL protein behaves similarly to different oils. The laboratory component aimed to characterize the virgin and used oils, through the acid value, saponification index, iodine value and FTIR and UV-Vis spectroscopies, afterwards the optimization of the hydrolysis reaction through factorial planning. Finally, the detergents were prepared and characterized through pH, foam test, emulsification index, viscosity and surface tension. Throughout the laboratory work it was concluded that virgin and used oils are very similar in terms of physico-chemical properties, and that the detergents obtained through these oils are very similar to commercial detergents on the market, with the advantage of being more environmentally friendly in its manufacture and after its disposal.

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Impacto Mundial dos Óleos Alimentares Usados

Na sociedade atual, o consumo de óleos vegetais, é uma realidade que tem vindo a aumentar de ano para ano à escala global, sendo estes maioritariamente usados na indústria alimentar. Os óleos vegetais, como o nome indica são extraídos de plantas, e o seu consumo é considerado uma alternativa mais saudável à gordura animal. Uma vez que a gordura animal é rica em ácidos gordos saturados, que são associados a elevados níveis de colesterol LDL (“mau” colesterol), e os óleos vegetais contêm sobretudo ácidos gordos insaturados. Por esta razão, a indústria alimentar opta cada vez mais pela utilização dos óleos ou gorduras vegetais, pelo que neste último ano 2019/2020 foram consumidos 204,83 milhões de toneladas de óleo vegetal no mundo.¹ Portugal também não é exceção, o consumo de óleos vegetais faz parte da cultura do país e por isso é um parâmetro que tem vindo a ser constante ao longo dos anos, pelo que segundo o Instituto Nacional de Estatística, o último ano com registo estatístico é 2017 e contou com 229 milhares de toneladas consumidas de óleos e gorduras vegetais.²

Os óleos alimentares usados (OAU) são muitas vezes descartados para a rede de esgotos, o que acarreta diversos problemas tanto a nível ambiental como a nível económico. Uma vez nas tubagens da rede de esgotos os OAU acabam por se depositar e acumular na forma sólida, muitas vezes até com outros resíduos sanitários como por exemplo papel. Desta forma reduzem o diâmetro dos tubos da rede de esgotos, e isto pode desencadear em entupimentos seja a nível local como por exemplo o bloqueio de um cano de cozinha doméstico, ou a um nível mais profundo como por exemplo o entupimento do sistema de esgotos. Este problema tem outras consequências tais como, o transbordo das águas de esgotos, seja no domicílio ou na rua, que acaba por libertar substâncias nocivas para a saúde pública e ambiente, ou até a corrosão das tubagens sob condições anaeróbias (ausência de nitrato, sulfato e oxigénio para a decomposição de matéria orgânica da rede de esgotos, formando compostos orgânicos de menores dimensões) libertando gases com efeito de estufa. Para além disto, os OAU podem ainda passar pela rede de esgotos e chegar às ETAR causando sobrecarga no sistema, e até complicações adicionais se não forem eliminados nas primeiras etapas de tratamento. Todos estes problemas mencionados, levam a um aumento de custos de manutenção de todos os sistemas de esgoto e ETAR's. O projeto EU – RecOil, uma iniciativa da União Europeia apoiada pela Comissão Europeia por meio do Programa Energia Inteligente para a Europa, estimou que 25% dos custos de tratamento de esgoto se devem à presença de aglomerados de OAU.³

Em muitas cidades no mundo, nem toda a percentagem de águas de esgoto é tratada nas ETAR's, infelizmente, há uma parte que acaba por desaguar nos rios ou até no mar. Quando isto

acontece, o OAU que vem do esgoto, devido à sua baixa densidade em relação à água, acaba por se depositar na superfície dos mares e rios, levando a diversas consequências nos ecossistemas presentes. Segundo diversas organizações nomeadamente a Comissão Europeia e a Agência Portuguesa do Ambiente, 1 litro de óleo doméstico deitado no ralo da cozinha, chega a contaminar 1 milhão de litros de água.^{4,5}

Para além do óleo ser menos denso que a água, estes componentes são também imiscíveis, o que logo à partida leva à formação de uma camada de óleo na superfície da água. Esta camada dificulta a penetração de luz e oxigénio,⁶ reduzindo assim a fotossíntese das algas, que são não só as espécies basais da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, como também constituem, juntamente com os recifes de corais, a estrutura de habitats principalmente dos invertebrados marinhos. Existe um grande grau de variação em relação aos efeitos da exposição das algas e corais ao óleo. Muitas não resistem a esta interação, outras, as plantas adultas acabam por resistir e conseqüentemente assumem um crescimento desmedido em relação às restantes espécies. Resultando num grande aumento da sua estrutura e por consequência levam à perda de toda a biodiversidade original do local, provocando a morte de muitos invertebrados. Os peixes e os mamíferos marinhos também são espécies afetadas devido ao contacto físico com o óleo. A sua incapacidade de detetar a presença das manchas de óleo, leva ao consumo de alimentos contaminados, à adesão do óleo à pele/penas/escamas, olhos e às restantes partes sensíveis, à inalação de substâncias voláteis, entre outros. O que conseqüentemente pode desencadear inflamações das membranas pulmonares, congestões pulmonares, pneumonias, asfixias, problemas digestivos, originando grandes sequelas ou até mesmo a própria morte.⁷

As aves marinhas são provavelmente a espécie mais afetada com a poluição da água causada por óleo. O seu contacto com o óleo reveste as penas deste resíduo, o que provoca principalmente a inibição das habilidades de voo e de isolamento, ficando vulneráveis a predadores. Por outro lado, as aves, interrompem a sua atividade para se limpar ficando assim com fome e desnutridas, perdem capacidade de flutuar o que pode resultar em afogamento, e ainda ficam suscetíveis a lesões intestinais e intoxicação devido ao óleo ingerido durante a auto-limpeza. Para além disto, o óleo também pode levar ao entupimento das narinas e garganta resultando em asfixia.⁸

A vegetação típica das zonas costeiras aos meios aquáticos contaminados também sofre com a poluição causada pelo óleo, pois acaba por revestir as suas zonas respiratórias das raízes e caules, resultando no envenenamento e sufoco das plantas e conseqüente morte.⁷

A poluição causada pelo OAU é uma realidade atual e tem repercussões negativas tanto na natureza como a nível financeiro nas ETAR e sistemas de esgoto. Por esta razão o OAU não deve ser deitado para os sistemas de esgoto, mas sim valorizado e reciclado, tal como explicado na próxima secção.

1.2. Valorização de Óleo Alimentar Usado

1.2.1. Formas de Valorização do OAU

O óleo alimentar depois de usado, seja pelo sector doméstico, industrial ou de restauração, ainda mantém muitas características físico-químicas que permitem a sua reciclagem e valorização. As vantagens dos produtos industriais derivados de óleos vegetais vão ao encontro de vários princípios da química verde⁹, nomeadamente a necessidade de uso de matéria-prima renovável e a minimização de riscos devido a emissões de substâncias com a menor toxicidade possível. Devido à sua natureza de base vegetal os produtos formados a partir de óleo vegetal são frequentemente biodegradáveis. A grande procura por produtos ecológicos deve-se em grande parte à preocupação pelo esgotamento das reservas mundiais de combustíveis fósseis e aumento dos custos que lhes são associados, e à crescente preocupação com a poluição ambiental. Existem várias formas de valorização do OAU, originando todo um leque de aplicações, como por exemplo biodiesel, glicerina, sabão, PHAs (polihidroxicanoatos), biosurfactantes, compostos plastificantes, biogás, resina de impressão 3D, aglutinantes, lubrificantes, bioadsorventes e etc.^{10, 11, 12, 13}

A transformação de OAU em biodiesel, é a forma de valorização de OAU mais utilizada no mundo. O uso de óleos vegetais em motores a diesel é quase tão antigo quanto o próprio motor, pois Rudolf Diesel, o inventor deste motor, usou óleo de amendoim para demonstrações do seu motor numa exposição em Paris no ano de 1900.¹⁴ O uso de biodiesel é mais vantajoso quando comparado com os combustíveis fósseis derivados de petróleo. Cerca de 1000 litros de OAU permitem produzir entre 920 a 980 litros de biodiesel, cujos índices de emissão de dióxido de carbono podem chegar a menos de 80% em comparação com os efeitos do gasóleo.¹⁵

Analisando quimicamente, o biodiesel é composto por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos que podem ser produzidos a partir de diferentes fontes lipídicas, por transesterificação (reação com álcool na presença de uma base, ácido, enzima ou catalisador sólido). Atualmente, as reações de esterificação e transesterificação são as mais utilizadas para produzir biodiesel. Qualquer tipo de matéria-prima que contenha ácidos gordos livres e/ou triglicéridos, como óleo vegetal e gordura animal, pode ser convertido em biodiesel. No entanto, os produtos finais devem cumprir rigorosos padrões de qualidade antes de serem aceites como biodiesel (legislação em vigor). Os óleos vegetais mais comercializados, e por isso mais utilizados para produção de biodiesel, são óleo de soja, colza, palma, girassol, coco e linhaça.¹⁶

A produção de sabão também é uma forma de valorização de OAU, para tal é utilizada a reação de saponificação, também conhecida como processo a frio para fabricação de sabão, e consiste na hidrólise alcalina de triglicéridos, que como já foi dito, são os principais constituintes

dos óleos vegetais e gorduras animais, podendo reagir com uma base forte mineral como hidróxido de sódio, em meio aquoso, para produzir os sais de sódio dos ácidos gordos livres hidrolisados (sabão) e glicerol.¹⁷

Historicamente, a produção de sabão costumava ser um método para reutilizar gorduras animais, banha e sebo. Atualmente, a maioria das pessoas usa sabão industrial, no entanto, há um movimento crescente para aprimorar a produção artesanal de sabão de boa qualidade, tanto por ser considerado melhor para a pele e para a saúde em geral, quanto para reduzir a pegada hídrica e de carbono. Hoje em dia, é possível produzir sabões com diferentes características consoante o tipo de óleo utilizado e os aditivos adicionados.¹⁷

Tanto a reação de transesterificação no caso do biodiesel como a de saponificação no caso do sabão, têm como subprodutos o glicerol, também conhecido comercialmente como glicerina (produto comercial purificado que contém pelo menos 95% de glicerol). A glicerina purificada apresenta também um vasto leque de aplicações, sendo que a maior percentagem é na indústria cosmética e farmacêutica, no entanto também é usada na indústria alimentar, de resinas, de tabaco, de celulose, etc.¹⁸

A adição de resíduos orgânicos de alta resistência como óleos e gorduras, aumenta a produção de biogás a partir de digestores anaeróbios em instalações de tratamento de águas residuais, o que incentiva economicamente o uso de biogás para gerar eletricidade, energia térmica ou mecânica.¹⁹ Para além disto, os OAU também são úteis na área dos pesticidas. Os óleos vegetais virgens já são adicionados em pequenas frações a alguns pesticidas como adjuvantes, mas o uso de OAU permite a substituição dos óleos virgens e a valorização dos OAU. Os óleos reduzem a tensão superficial das gotas pulverizadas sobre a planta, aumentando a área de contacto. A sua utilização aumenta a facilidade de penetração do produto na cutícula da planta e, conseqüentemente, poderá diminuir a dose necessária dos compostos químicos activos.²⁰

Como foi demonstrado, os OAU são um resíduo com inúmeras potencialidades na sua valorização. O presente projeto científico incide na saponificação destes resíduos e transformação em diversos produtos de limpeza, um tema que será abordado mais em pormenor nas próximas secções.

1.2.2. Enquadramento Legal

Os OAU apenas recentemente começaram a ser vistos como uma matéria-prima valorizável, e por isso a legislação existente relativa à sua gestão também é relativamente recente. A Tabela 1 resume este enquadramento legal dos OAU.

Tabela 1 - Enquadramento legal dos OAU.

Legislação	Data	Definição
Portaria n° 335/97	16/05/1997	Transporte de OAU em território nacional.
Regulamento (CE) n° 1774/2002	03/10/2002	Controlo da epidemia Encefalopatia Espongiforme Bovina.
Regulamento (CE) n° 1013/2006	14/06/2006	Fiscalização e controlo das transferências de resíduos na Comunidade Europeia.
Decreto-Lei n° 178/2006	05/09/2006	Regime Geral de Gestão de Resíduos.
Decreto-Lei n° 183/2009	10/08/2009	Regime jurídico da deposição de resíduos em aterro.
Decreto-Lei n° 267/2009	29/09/2009	Regime de gestão dos óleos alimentares usados.
Decreto-Lei n° 33/2017	23/03/2017	Assegura a execução do Regulamento (CE) n° 1069/2009.
Portaria n° 145/2017	26/04/2017	Regras aplicáveis ao transporte de resíduos em território nacional.
Despacho 8442/2017	26/09/2017	Aprova as guias de acompanhamento de subprodutos animais e produtos derivados.

A 16 de maio de 1997 foi publicada no Diário da República Portuguesa a Portaria n° 335/97 que fixa as regras a que fica sujeito o transporte de resíduos dentro do território nacional. Nessa altura, a principal utilização de OAU era para ração animal, no entanto, mais tarde com o surgimento da epidemia Encefalopatia Espongiforme Bovina (também conhecida como doença das vacas loucas), levou à implementação de novas medidas por parte do Parlamento Europeu com o Regulamento (CE) n° 1774/2002, nomeadamente a proibição da alimentação de uma espécie animal com proteínas derivadas da transformação dos corpos ou partes de corpos de animais da mesma espécie, por apresentar um risco de propagação da doença, incluindo assim os OAU (devido aos restos de comida no óleo).

A 14 de junho de 2006, entrou em vigor o Regulamento (CE) n° 1013/2006 relativo à fiscalização e ao controlo das transferências de resíduos no interior, à entrada e à saída da

Comunidade Europeia, tendo já esta legislação sofrido diversas alterações substanciais desde 1993, data de publicação do regulamento original. No mesmo ano, a 5 de setembro, entrou em vigor através do Decreto-Lei nº 178/2006, o Regime Geral de Gestão de Resíduos (RGGR) que é aplicável à prevenção, produção e gestão de resíduos. O RGGR surgiu com a crescente necessidade de valorizar estes resíduos, definindo assim o seu encaminhamento, transporte, reporte de informação (à Agência Portuguesa do Ambiente) e tratamento para os setores industrial, hotelaria e restauração, no caso do setor doméstico, esta gestão fica a cargo do município.

Em 2009 entrou em vigor o Decreto-Lei nº 183/2009 que estabelece o regime jurídico da deposição de resíduos em aterro, as características técnicas e os requisitos a observar na conceção, licenciamento, construção, exploração, encerramento e pós-encerramento de aterros (diploma aterros). Mais tarde, ainda em 2009, surgiu o Decreto-Lei nº 267/2009, de 29 de setembro, que aprova o regime de gestão dos óleos alimentares usados (diploma OAU) provenientes dos setores doméstico, da Hotelaria, Restauração e Catering (HORECA) e do setor industrial. Este diploma acresce ao RGGR para dinamizar o setor dos OAU criando um conjunto de normas que visam quer a implementação de circuitos de recolha selectiva, o seu correcto transporte, tratamento e valorização, por operadores devidamente licenciados para o efeito, quer a rastreabilidade e quantificação de OAU. Para além disto, este regime jurídico dá um especial enfoque à recolha de OAU no sector doméstico, atribuindo um papel de relevo aos municípios e estabelecendo objectivos concretos para a constituição de redes municipais de recolha selectiva. São ainda destacadas algumas proibições importantes para a sociedade em geral:

- A introdução de OAU ou de substâncias recuperadas de OAU na cadeia alimentar;
- A descarga de OAU nos sistemas de drenagem, individuais ou colectivos, de águas residuais;
- A deposição em aterro de OAU, nos termos do regime jurídico da deposição de resíduos em aterro;
- A mistura de OAU com substâncias ou resíduos perigosos;
- A realização de operações de gestão de OAU por entidades não licenciadas nos termos do Decreto-Lei n.º 178/2006, de 5 de Setembro;
- A utilização, como combustível em veículos, de OAU que não cumpram os requisitos técnicos aplicáveis aos biocombustíveis previstos no Decreto-Lei n.º 62/2006, de 21 de Março.

Em 2017 entrou em vigor o Decreto-Lei nº 33/2017, a Portaria nº 145/2017 e o Despacho 8442/2017. O Decreto-Lei n.º 33/2017 assegura a execução e garante o cumprimento das

disposições do Regulamento (CE) n.º 1069/2009, que define as regras sanitárias relativas a subprodutos animais e produtos derivados não destinados ao consumo humano e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1774/2002. A Portaria n.º 145/2017 define as regras aplicáveis ao transporte rodoviário, ferroviário, fluvial, marítimo e aéreo de resíduos em território nacional e cria as guias eletrónicas de acompanhamento de resíduos (e-GAR), a emitir no Sistema Integrado de Registo Eletrónico de Resíduos (SIRER). O Despacho 8442/2017 do Diretor-geral de Alimentação e Veterinária, que cria a guia de acompanhamento de subprodutos animais e produtos derivados do Decreto-Lei n.º 33/2017.

Toda a informação presente nesta secção está em conformidade com a Nota Técnica relativa à gestão de OAU, elaborada conjuntamente pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária e pela Agência Portuguesa do Ambiente.²¹

1.3. Óleos Alimentares em Estudo

Os óleos alimentares estudados neste projeto foram escolhidos com base no seu consumo a nível mundial e nacional, pois quanto mais um óleo é consumido, maior quantidade haverá para reciclar. A Figura 1 apresenta uma análise estatística do consumo de óleos vegetais a nível mundial. Neste contexto, foram estudados o óleo de palma, o óleo de colza e óleo de girassol.

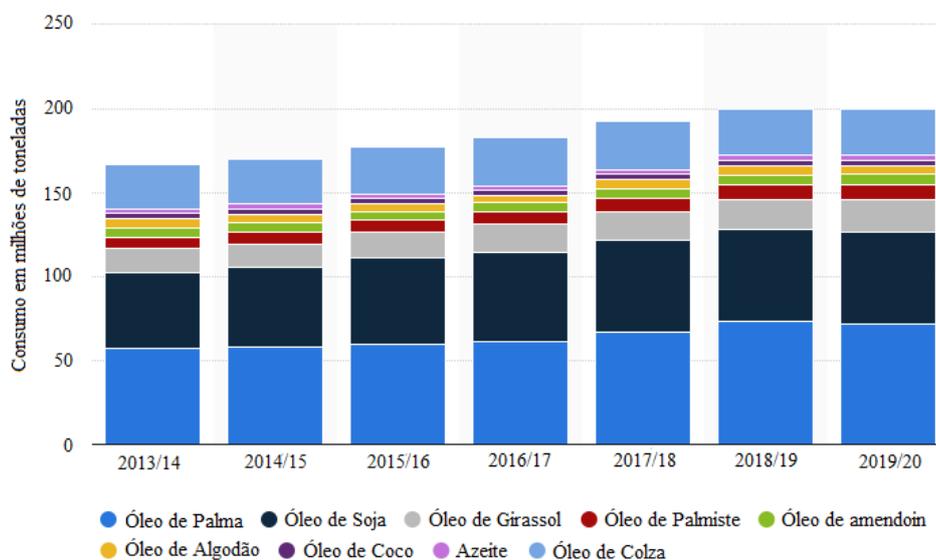


Figura 1 - Consumo de óleos vegetais a nível mundial. Adaptado de <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/>¹.

O óleo de palma é o óleo mais consumido no mundo.¹ É extraído do mesocarpo (vulgarmente chamado de polpa) dos frutos da palmeira (*Elaeis guineensis*). Esta planta é muito comum em climas tropicais, e por isso é cultivada maioritariamente em África, América do Sul e Sudeste Asiático, os cinco principais países produtores são a Indonésia, Malásia, Tailândia, Colômbia e Nigéria. A palmeira fornece o maior rendimento de óleo por unidade de área cultivada, um hectare de plantações de palmeira é capaz de produzir até 10 vezes mais óleo do que outras principais culturas oleaginosas. O fruto da palmeira produz dois tipos distintos de óleos, o óleo de palma que é extraído da polpa do fruto e o óleo de palmiste que é extraído do caroço do fruto, no entanto apenas o óleo de palma é usado na culinária. A indústria alimentar utiliza cerca de 90% do óleo de palma produzido, os restantes 10% são usados na fabricação de sabão e indústria oleoquímica.²²

O fruto da palmeira contém cerca de 56 a 70% de óleo, e pode ser extraído por processos diferentes consoante o seu rendimento e complexidade. Para a sua extração existem vários métodos, mas a sua base é comum a todos eles: esterilização do fruto, separação da polpa do fruto, digestão, extração de óleo e clarificação. A esterilização do fruto envolve um processo de calor e absorção de humidade, o objetivo é inativar as enzimas lipolíticas da polpa do fruto. A extração pode ser feita por dois procedimentos, a prensagem mecânica ou a extração por solvente. No fim do processo é comum submeter o óleo a refinamento para remover impurezas, pode ser refinamento químico ou físico, sendo que o refinamento químico apresenta algumas desvantagens em relação ao físico, como a perda de triglicéridos, o alto consumo de energia, altos custos no equipamento, o factor tempo e ainda o facto de gerar grandes quantidades de efluentes que poluem o meio ambiente.²²

Quando comparado com outros óleos vegetais, o óleo de palma possui uma composição única de ácidos gordos, pois contém praticamente igual quantidade de ácidos gordos saturados e ácidos gordos insaturados, o que o torna naturalmente semi-sólido à temperatura ambiente, tendo um ponto de fusão entre 33 °C e 45 °C. A composição aproximada de ácido palmítico (C16: 0) é de 44%, de ácido oleico (C18: 1) é de 40%, de ácido linoleico (C18: 2) é de 10% e ácido esteárico (C18: 0) é de 5%.²² Tal como os restantes óleos, o óleo de palma é constituído por uma mistura de triacilglicéridos, diacilglicéridos e monoacildiglicéridos, estes dois últimos, muitas vezes resultam da hidrólise dos triacilglicéridos. Para além de lípidos, o óleo de palma também é constituído por micronutrientes tais como carotenóides, tocoferóis, tocotrienóis, esteróis, fosfolípidos, glicerolípidos e esqualeno.²² Os carotenóides são responsáveis pela cor vermelho-alaranjado do óleo de palma. Eles atuam como antioxidantes protegendo o óleo contra a oxidação, sendo eles mesmos oxidados antes do ataque oxidativo aos triglicéridos. Os tocoferóis e tocotrienóis são geralmente chamados de vitamina E, são solúveis em gordura, têm uma cabeça formada por anéis fenólicos e heterocíclicos e uma cadeia hidrocarbonada que representa a cauda. A diferença na estrutura dos tocoferóis e tocotrienóis encontra-se apenas na cauda, os tocoferóis possuem uma cauda saturada, enquanto que os tocotrienóis possuem uma cadeia não saturada

com três ligações duplas isoladas. Atuam também como antioxidantes inibindo radicais livres. O óleo de palma é uma das fontes mais ricas de vitamina E da natureza. Os restantes micronutrientes estão presentes em quantidades mais baixas e também contribuem para evitar a oxidação do óleo de palma. Todos estes constituintes têm influência nas propriedades físico-químicas do óleo.²²

O óleo de colza ou canola, é o terceiro óleo mais consumido no mundo.¹ É extraído das sementes da colza (*Brassica napus L.*), uma planta com flores amarelas. As sementes da colza contêm aproximadamente 40% de óleo e 17 a 26% de proteína. Para além de óleo de colza, ainda é possível produzir farinha de colza, que é um subproduto da extração do óleo de colza, é uma matéria-prima altamente rica e contém até 50% de proteína.²³

A colza (*Brassica napus L.*) é uma espécie que se originou numa região geográfica limitada através de hibridizações espontâneas entre os genótipos de nabo (*Brassica rapa L.*) e do repolho (*Brassica oleracea L.*).²⁴ Esta planta é cultivada em climas mais frios, sendo que no inverno o cultivo incide mais na Europa e na Ásia, na primavera o clima mais adequado é o do Canadá, norte da Europa e Austrália, e no verão os eleitos são os países do norte da Europa, Canadá, China e Austrália.²⁵ O Canadá tornou-se líder mundial na produção em larga escala de variedades de canola de alta qualidade, caracterizadas por baixos níveis de ácido erúico (<2%) e glucosinolato (<30 $\mu\text{mol} / \text{g}$). Foi no Canadá que surgiu o termo Canola que resulta da contração da frase Can(adian) o(il) l(ow) a(cid), ou seja, óleo canadense de baixo teor de ácido.²³

O processo da extração do óleo das sementes da colza divide-se em várias etapas, primeiro é feita uma limpeza às sementes, de seguida as sementes são pré aquecidas e submetidas a moinhos para que possam ser lascadas e posteriormente são novamente aquecidas a altas temperaturas para começar a extrair o óleo. Posto isto, as sementes passam por prensas, onde é possível extrair uma grande quantidade de óleo, posteriormente o óleo é submetido a um tratamento para remover fosfatos, e a um refinamento para remover impurezas. Tal como no óleo de palma, o refinamento também pode ser químico ou físico, sendo que o físico é mais económico.²⁶

O óleo de colza contém entre 6 e 14% de ácido linoleico (C18: 2), 50 e 66% de ácido oleico (C18: 1) e cerca de 7% de ácidos gordos saturados. A restante percentagem é atribuída a tocoferóis, fitoesteróis, polifenóis, carotenóides, fosfolípidos, clorofila, ácidos gordos livres e iões metálicos. Destes constituintes, os tocoferóis e os carotenoides são antioxidantes naturais. Os polifenóis, que estão presentes em grandes quantidades no óleo de colza quando comparado com outros óleos, para além de antioxidantes exibem também propriedades antimicrobianas. Os fitoesteróis mostraram desenvolver atividade de antipolimerização. A clorofila (que está presente em grande quantidade), os ácidos gordos livres e os iões metálicos promovem a oxidação do óleo e por isso são constituintes indesejáveis que por norma tentam ser removidos durante o refinamento do óleo. Os fosfolípidos também são indesejados porque causam grandes dificuldades nas etapas de tratamento do óleo.²⁴

O óleo de girassol é o óleo mais consumido em Portugal², o segundo óleo mais consumido na Europa a seguir ao óleo de colza,²⁷ e o quarto óleo mais consumido no mundo.¹ O girassol, *Helianthus annuus* (L.), é uma planta alta com flores amarelas e sementes comestíveis, ganhou este nome porque as suas flores se assemelham ao sol e retorcem as hastes para seguir o sol durante o dia. O óleo de girassol é extraído através das sementes de girassol, que para além desta finalidade, são comestíveis e muito usadas também em rações para aves.²⁷ Os principais países produtores de girassol no mundo são a Ucrânia, Rússia, União Europeia, Argentina e Turquia.²⁸

As sementes de girassol ricas em ferro são, em peso, 47% de gordura e 24% de proteína. Na produção de óleo de girassol virgem, a qualidade da matéria-prima é muito importante, por isso todo o processo de colheita, armazenamento e transporte tem um rigor associado. Para produzir o óleo, as sementes são trituradas, aquecidas e prensadas a quente. Após prensagem, o produto resultante é extraído por solvente. O óleo bruto deve ser refinado para remover compostos e aromas desagradáveis. O resultado é um óleo amarelo pálido, de sabor neutro, mas utilizável numa ampla gama de aplicações.²⁹

A nível de composição química o óleo de girassol contém entre 48% e 74% de ácido linoleico (C18: 2), 14% e 39% de ácido oleico (C18: 1) e 7% e 11% de ácidos gordos saturados. Para além disto, ainda é constituído por tocoferóis, fitoesteróis, esqualeno, carotenóides, ácidos fenólicos, coenzimas Q9 e Q10, fosfolípidos, ácidos gordos livres, clorofila, cera e iões metálicos. Os tocoferóis, carotenóides, ácidos fenólicos e as coenzimas Q9 e Q10 são antioxidantes, e para além disto, estas coenzimas exibem também propriedades anti-inflamatórias. Os fitoesteróis e o esqualeno são conhecidos por ajudar a reduzir o colesterol no sangue. Dos constituintes mais indesejados, temos os ácidos gordos livres, a clorofila e os iões metálicos que promovem a oxidação do óleo, os fosfolípidos que dificultam o processo de extração de óleo e a cera que provém das cascas das sementes. Estes constituintes mais indesejáveis são reduzidos no processo de refinamento do óleo.³⁰

A composição destes óleos está descrita na literatura com mais detalhe^{31, 32, 22, 24, 30}, no entanto, a Tabela 2 apresenta um resumo da composição dos óleos estudados neste projeto.

Tabela 2 - Composição dos óleos de palma, colza e girassol. Informação em conformidade com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.³¹

	Constituintes	Óleo de Palma	Óleo de Colza	Óleo de Girassol
Ácidos gordos (% relativamente ao total de ácidos gordos)	C12:0	Até 0.5	-	Até 0.1
	C14:0	0.5-2.0	Até 0.2	Até 0.2
	C16:0	39.3-47.5	2.5-7.0	5.0-7.6
	C16:1	Até 0.6	Até 0.6	Até 0.3
	C17:0	Até 0.2	Até 0.3	Até 0.2
	C17:1	-	Até 0.3	Até 0.1
	C18:0	3.5-6.0	0.8-3.0	2.7-6.5
	C18:1	36.0-44.0	51.0-70.0	14.0-39.4
	C18:2	9.0-12.0	15.0-30.0	48.3-74.0
	C18:3	Até 0.5	5.0-14.0	Até 0.3
	C20:0	Até 1.0	0.2-1.2	0.1-0.5
	C20:1	Até 0.4	0.1-4.3	Até 0.3
	C20:2	-	Até 0.1	-
	C22:0	Até 0.2	Até 0.6	0.3-1.5
	C22:1	-	Até 2.0	Até 0.3
	C22:2	-	Até 0.1	Até 0.3
	C24:0	-	Até 0.3	Até 0.5
C24:1	-	Até 0.4	-	
Outros Constituintes (mg/kg)	Esteróis	300-700	4500-11300	2400-5000
	Tocoferóis e Tocotrienóis	150-1500	430-2680	440-1520

As diferenças na composição química dos três óleos afeta as suas propriedades físico-químicas. Na Tabela 3 estão apresentadas algumas dessas propriedades para cada óleo.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos óleos em estudo segundo o Decreto-Lei nº 106/2005.

	Óleo de Palma	Óleo de Colza	Óleo de Girassol
Densidade relativa(x °C/ água a 20°C)	0.891-0.899 x=50°C	0.914-0.920 x=20°C	0.918-0.923 x=20°C
Índice de refração (40°C)	1.454-1.456 a 50°C	1.465-1.467	1.461-1.468
Índice de saponificação (mg KOH/g de óleo)	190-209	182-193	188-194
Índice de iodo (Wijs)	50.0-55.0	105-126	118-141
Matéria insaponificável (g/kg)	<=12	<=20	<=15

Algumas das propriedades apresentadas na Tabela 3 serão estudadas neste projeto, nomeadamente o índice de saponificação e índice de iodo. A densidade relativa dos óleos está diretamente ligada à natureza das cadeias hidrocabornadas dos ácidos gordos presentes e varia com a temperatura, por definição representa a razão entre a massa de um volume de amostra (de óleo neste caso) em relação ao mesmo volume de água a 20°C. O índice de refração nos óleos depende do seu peso molecular, do comprimento da cadeia hidrocarbonada e do seu grau de insaturação. Os óleos vegetais também contêm um pequeno teor de matéria insaponificável como por exemplo, fitoesteróis, tocoferóis e hidrocarbonetos.³³ São muitas as propriedades que caracterizam físico-quimicamente os óleos vegetais, sendo que uma das mais comuns é o índice de acidez, que para óleos refinados não deve ultrapassar 0.6 mg KOH/g de óleo, para óleos virgens e prensados a frio o índice pode ir até 4 mg KOH/g de óleo e para óleos de palma virgens até 10 mg KOH/g de óleo.

As propriedades físico-químicas dos óleos estão portanto diretamente ligadas à sua composição química. Quando os óleos são submetidos a frituras, a sua composição é alterada. Durante a fritura, é libertada água da comida, e em contrapartida o óleo migra para a comida. Esta água que é libertada promove reações de hidrólise formando monoacilglicerol, diacilglicerol, ácidos gordos livres e glicerol, para além disto, no meio de fritura há ainda reações de oxidação que resultam na formação de hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, ácidos, peróxidos e etc, e ainda reações de isomerização, ciclização e polimerização devido às altas temperaturas do meio reacional. À medida que o óleo é submetido a mais processos de fritura, estas reações repetem-se e por isso, um óleo mais usado tem mais produtos secundários do que um óleo menos usado.³⁴ Esses subprodutos são, portanto, responsáveis por alterar as propriedades da Tabela 3, bem como outras propriedades físicas, nomeadamente cor, viscosidade, tensão superficial, etc. A cor é uma propriedade que geralmente altera e é facilmente observada. Normalmente a cor escurece devido

ao desenvolvimento de pigmentos durante a oxidação de ácidos gordos, reações de Maillard (reações entre grupo amino de um aminoácido com carbonilo de um hidrato de carbono redutor) e oxidação de compostos fenólicos, que neste caso pode até resultar numa cor diferente e não no escurecimento, como é o caso do óleo de palma quando o β -caroteno oxida (a cor muda de laranja para amarelo).¹¹

A viscosidade do OAU aumenta com o número de ciclos de fritura devido a dímeros apolares e compostos poliméricos de alto peso molecular produzidos durante a polimerização de triglicerídeos.¹¹ Quanto maior o teor de polímeros formados, também maior será a densidade do óleo, por isso é expectável que a densidade aumente ao longo dos ciclos de fritura. O índice de acidez tende também a aumentar, uma vez que as reações de hidrólise que acontecem no meio de fritura formam ácidos gordos livres.³⁵ Estes são alguns exemplos de como a fritura do óleo pode afetar as suas propriedades. Neste projeto serão estudadas algumas destas propriedades dos óleos virgens e usados com maior detalhe.

1.4. Do OAU aos Surfactantes

O OAU, como explicado anteriormente, permite a formação de sabão através da reação de saponificação que consiste na hidrólise alcalina de triglicerídeos, ou seja, a reação de uma base forte em meio aquoso produzindo sais de ácido gordo e glicerol (Figura 2).¹⁷

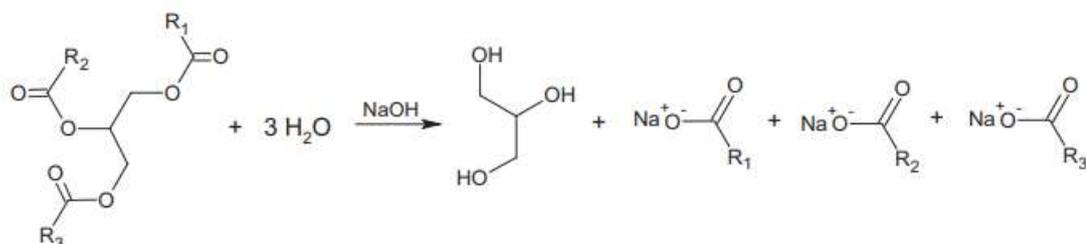


Figura 2 - Reação de saponificação dos triglicerídeos.

Estes sais de ácidos gordos são designados tensoativos ou surfactantes, e são caracterizados por serem solúveis em água e se concentrarem nas superfícies e interfaces reduzindo a tensão superficial, o que permite que sejam usados para umedecer, lavar, emulsionar e dispersar. Esta atividade superficial deve-se à sua estrutura de molécula anfifílica. Em que uma parte da molécula é hidrofóbica, normalmente uma cadeia hidrocarbonada, que por isso tem afinidade com substâncias apolares como a gordura. Outra parte da molécula é hidrofílica, designada muitas vezes por cabeça polar, e por isso tem afinidade com a água.³⁶

O termo interface denota um limite entre duas fases imiscíveis, já o termo superfície indica que uma das fases é um gás, geralmente ar. Existem, portanto, dois tipos de superfície, as de sólido-vapor e líquido-vapor, e três tipos de interfaces, as de sólido-líquido, sólido-sólido e líquido-líquido. A concentração do surfactante num limite depende da estrutura do surfactante e também da natureza das duas fases que se encontram na interface.³⁶

Um surfactante classifica-se com base na carga do grupo da cabeça polar, e pode ser aniônico, catiónico, não iônico e zwitteriônico. Nos surfactantes aniônicos o grupo hidrofílico tem carga negativa, como por exemplo carboxil (RCOO^-), sulfonato (RSO_3^-), sulfato (ROSO_3^-), ou fosfato (ROPO_3^-). Os surfactantes catiónicos têm cabeça polar com carga positiva, por exemplo halogenetos de amónio quaternário (R_4N^+). Os surfactantes não iônicos não têm carga, mas o seu grupo hidrofílico é altamente polar, por exemplo o polioxietileno, polioliol, açúcares. Os surfactantes zwitteriônicos têm simultaneamente carga positiva e negativa, são exemplo as sulfobetainas ($\text{RN}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$).³⁶

As estruturas específicas das moléculas de surfactante, com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos bem definidos, são responsáveis pela sua tendência de se concentrar nas interfaces, e assim, reduzir a energia livre interfacial do sistema em que se encontram. No entanto, quando todas as interfaces estão ou começam a ficar saturadas, a redução geral de energia pode continuar por meio de outros mecanismos. Um desses mecanismos, manifesta-se fisicamente pela cristalização ou precipitação do surfactante na solução, tal como é observado para uma solução de qualquer soluto que excedeu seu limite de solubilidade. No caso dos surfactantes, há outros mecanismos mais comuns, como a formação de agregados moleculares, chamados de micelas e mesofases de cristal líquido, que permanecem em solução como espécies dispersas termodinamicamente estáveis, com propriedades distintas das da solução monomérica. A formação de micelas ocorre assim que se atinge a concentração micelar crítica (CMC), a partir deste momento a concentração de monómeros em solução mantém-se estável e aumenta a concentração de micelas, como representado esquematicamente na Figura 3.³⁷

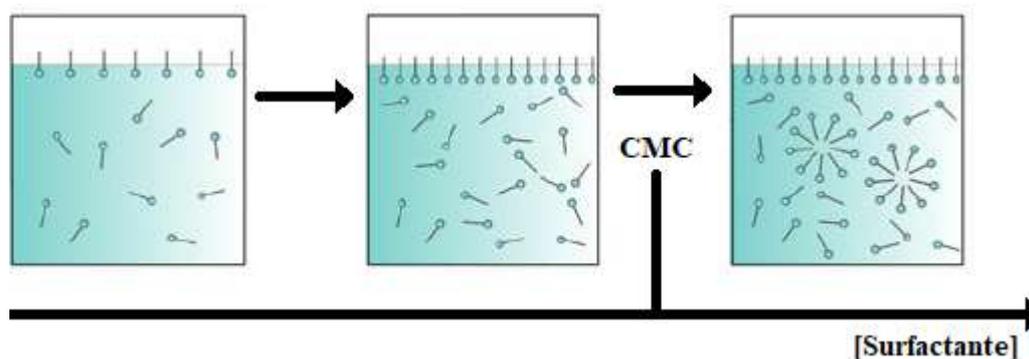


Figura 3 - Representação esquemática da adição de surfactante a água em contacto com ar, até se atingir a concentração micelar crítica (CMC). Adaptado de Anika Hamberger & Katharina Landfester.³⁸

Consoante o grau de empacotamento e a concentração dos surfactantes em solução, podem ser formados vários tipos de agregados. O factor de empacotamento crítico (CPP), que determina o grau de empacotamento dos surfactantes é dado pela Equação 1:

$$CPP = \frac{V}{A \times l} \quad \text{Equação 1}$$

onde V representa o volume ocupado pela cauda do surfactante, A a área da cabeça hidrofílica e l o comprimento da cauda hidrofóbica.³⁹

A Figura 4 representa os possíveis agregados micelares que se podem formar consoante o CPP dos surfactantes. Ordenados de forma ascendente relativamente ao seu grau de empacotamento de surfactante, temos na Figura 4(a) uma micela esférica ($CPP < 1/3$) com interior composto pelas cadeias hidrocarbonadas e o exterior por grupos de cabeças polares (representadas como esferas) voltadas para a água; na Figura 4(b) uma micela cilíndrica ($1/3 < CPP < 1/2$) com o interior composto também de cadeias hidrocarbonadas e exterior de cabeças polares; na Figura 4(c) uma vesícula ($1/2 < CPP < 1$), que é constituída a partir de bicamada semelhante à da fase lamelar e é caracterizada por um compartimento de água no interior da vesícula. As vesículas podem ter formas diferentes e também existem vesículas reversas; na Figura 4(d) a fase lamelar ($CPP \approx 1$), que consiste em bicamadas de surfactante paralelas, formando muitas vezes cristais líquidos, e têm para sistemas de surfactante-água, um núcleo composto por cadeias hidrocarbonadas; na Figura 4(e) uma micela reversa, composta por um núcleo de água circundado pelos grupos de cabeças polares do surfactante e as cadeias alquílicas voltadas para o exterior por afinidade com um solvente não polar.³⁶

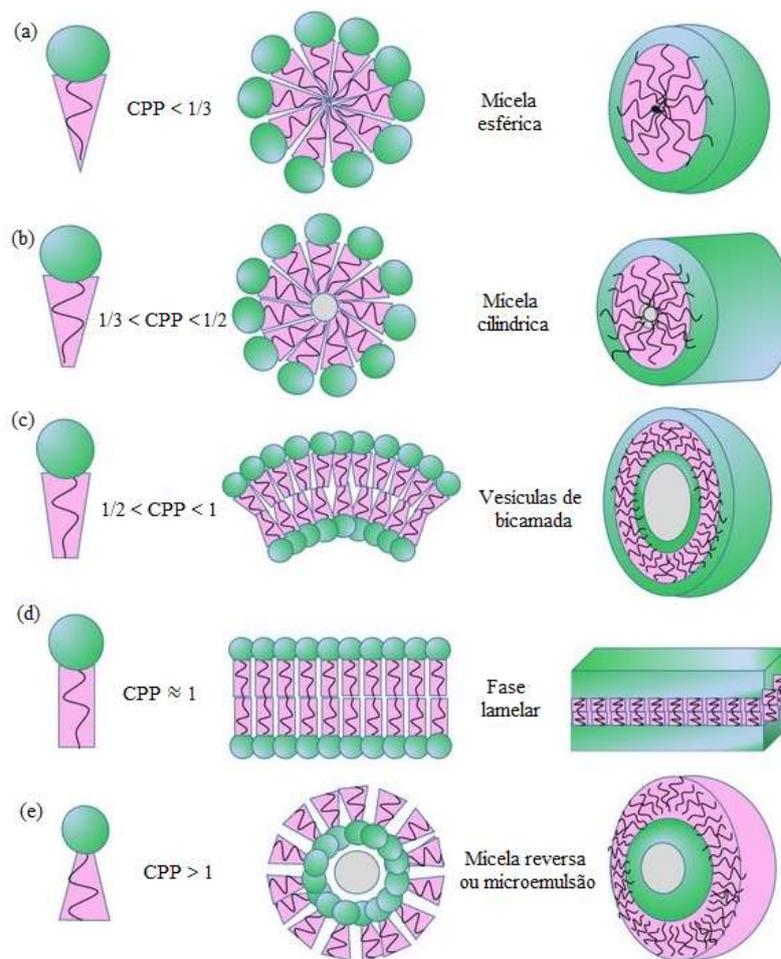


Figura 4 - Agregados micelares consoante o seu grau de empacotamento (CPP): (a) Micela esférica; (b) Micela cilíndrica; (c) Vesícula; (d) Fase lamelar; (e) Micela reversa. Adaptado de Domenico Lombardo et al.³⁹

Esta característica de agregação dos surfactantes é uma das responsáveis pelo poder de detergência dos produtos de limpeza. Quando um objeto está sujo, por exemplo de gordura, em meio aquoso na presença de surfactante, a parte hidrofóbica do surfactante liga-se à gordura que é também apolar, e a parte hidrofílica do surfactante fica solubilizada em água. O surfactante ocupa todas as faces da gordura acabando por assim emulsionar esta sujidade. Este processo pode ser observado na Figura 5.⁴⁰

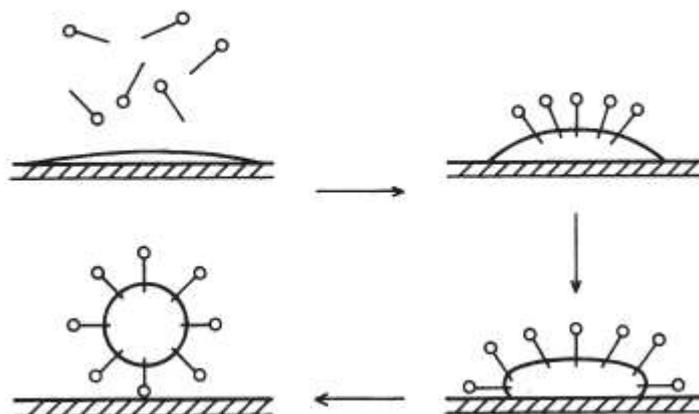


Figura 5 – Esquemática do processo de lavagem usando surfactantes. Adaptado de Bock K., Stache H..⁴⁰

Não existe um surfactante universalmente bom, adequado a todos os usos, a escolha depende da aplicação pretendida, mas de forma geral, espera-se que para um detergente os surfactantes tenham boa adsorção e remoção da sujeira, baixa sensibilidade à dureza da água, boas propriedades de dispersão, alta solubilidade (na forma de agregado) e baixa capacidade de reposição da sujeira. Atualmente, dependendo da aplicação de um detergente, são misturados vários tipos de surfactante, e obviamente que esta escolha de surfactante não é exclusiva ao desempenho do detergente, mas também tem em conta considerações toxicológicas, ecológicas e econômicas. Os surfactantes aniônicos são os mais usados para detergentes de roupa, lava-louça e limpeza no geral, já os catiônicos são mais adequados a amaciadores da roupa, devido à sua incompatibilidade com surfactantes aniônicos e baixa eficiência de limpeza.⁴¹

O presente projeto incide na valorização do OAU, reciclando-o e transformando-o em detergente. No entanto, o processo de saponificação é um pouco diferente do convencional, uma vez que numa primeira fase se realiza a hidrólise dos triglicerídeos na presença de uma enzima, a lipase, com o objetivo de quebrar a ligação éster dos triglicerídeos, formando ácidos gordos, seguido da adição de base para que acima do seu pK_a se formem sais carboxilatos, os surfactantes.

O uso da reação enzimática traz vantagens ao processo de saponificação, uma vez que o processo convencional usa hidróxido de sódio em quantidades que proporcionam um aumento do pH, tornando o seu processo de produção perigoso para o utilizador. Para além disto substituindo o processo químico convencional pela reação enzimática descrita, o impacto ambiental também é mais reduzido. A reação enzimática de hidrólise está esquematizada na Figura 6. Esta lipase torna-se ativa na interface óleo/água, sendo que se posiciona na água direcionando o seu centro ativo para os triglicerídeos, que são o seu substrato. Assim, quebra as ligações éster dos triglicerídeos, formando inicialmente diacilglicerol e um ácido gordo, na segunda quebra de

ligação éster forma monoacilglicerol e um ácido gordo, e por fim, na terceira quebra da ligação éster, dá origem ao glicerol e mais um ácido gordo.

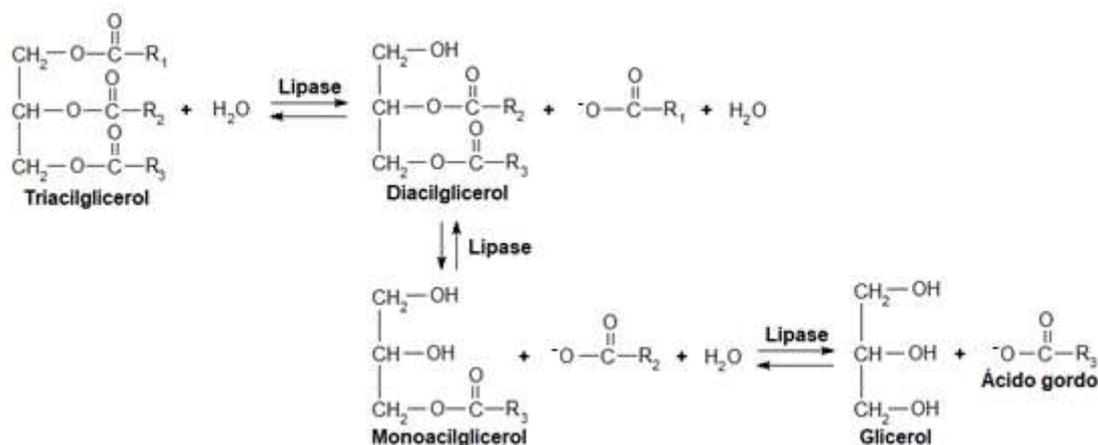


Figura 6 - Reação enzimática de hidrólise usada no processo de saponificação.

As enzimas já são atualmente um componente conhecido dos detergentes⁴², no entanto, não com o mesmo objetivo que as estudadas neste projeto. Enquanto que neste projeto se recorre ao uso da lipase para hidrolisar os triglicerídeos e transformar em ácidos gordos, nos detergentes convencionais são usadas enzimas como aditivos para ajudar os surfactantes a desempenhar a sua função de limpeza, ou seja, o objetivo da enzima é catalisar a degradação de um substrato (neste contexto, a sujidade) por hidrólise, enquanto que o papel do surfactante é normalmente remover a sujidade da superfície. A ação da enzima é específica, as lipases e esterases catalisam a hidrólise de ligações éster, as proteases (também chamadas peptidases) atuam nas ligações peptídicas, as amilases catalisam a hidrólise do amido em açúcares, as celulases catalisam a decomposição de celulose e alguns polissacarídeos. Já no caso dos surfactantes, o mesmo surfactante pode remover tipos de sujidade diferentes, embora ainda assim existam diferentes surfactantes que se adequam mais ou menos a determinadas aplicações, por exemplo, os surfactantes aniônicos têm uma vasta gama de aplicações e são os mais usados em detergentes (muitas vezes juntamente com surfactantes não-iônicos), já os surfactantes catiónicos são bem mais específicos e geralmente usados em amaciadores da roupa ou condicionadores de cabelo.⁴²

A eficiência dos detergentes pode ser caracterizada por vários parâmetros, os mais importantes são a CMC, o número de agregação, a temperatura micelar crítica (CMT), a temperatura de Krafft (Tk), o “cloud point” e o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). A CMC é importante do ponto de vista em que os processos de solubilização prosseguem frequentemente através da forma micelar, sendo que as micelas cilíndricas são maior parte das vezes preferenciais em relação às esféricas, uma vez que têm um volume maior e por isso maior capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas e adsorvem de forma mais eficaz às superfícies. Assim sendo, uma CMC baixa é mais eficaz para um detergente, pois formam-se micelas com menor quantidade

de surfactante, por outro lado há diversos factores que influenciam a CMC, são eles o pH, a temperatura, e no caso dos surfactantes iónicos, a força iónica e o tipo de contra-íão.⁴³ O número de agregação, representa o número médio de moléculas que formam uma micela, e é portanto um critério importante para o tamanho micelar, que poderá ser influenciado pelos mesmos factores externos que a CMC. A CMT representa a temperatura na qual se atinge a CMC, e a temperatura de Krafft é o ponto triplo no qual coexistem monómeros, micelas e cristais hidratados em solução, desta forma, temperaturas abaixo destes pontos não favorecem a formação de micelas e consequentemente o poder de detergência é inferior.⁴⁴ O “cloud point”, acontece para surfactantes não-iónicos, e representa uma temperatura específica acima da CMT, em que os detergentes passam por uma separação de fases, produzindo uma camada rica em surfactantes e outra camada sem surfactantes (aquosa), o que do ponto de vista do poder de detergência não será benéfico, e por isso deve-se procurar não atingir o “cloud point”.⁴³ O número HLB, balanço hidrofílico-lipofílico, é uma medida da hidrofobicidade relativa do detergente. Os surfactantes mais hidrofóbicos têm um número HLB próximo de zero, enquanto que os detergentes mais hidrofílicos têm valores próximos de 20, este valor é calculado a partir da estrutura do surfactante consoante os grupos funcionais que apresenta. Para detergentes, o HLB mais adequado situa-se na faixa entre 12 e 14. Todos estes parâmetros são muito importantes para melhorar o poder de detergência, no entanto, devemos ter em conta que são sempre influenciados por outros factores como a força iónica, o comprimento das cadeia hidrocarbonadas dos surfactantes, o pH, a temperatura e a presença de aditivos.⁴⁴

1.5. Enzimas em Estudo

Os processos enzimáticos têm vindo a ser implementados numa ampla gama de indústrias devido às grandes vantagens que podem oferecer, como a sua especificidade e o facto de serem ambientalmente amigáveis. Estas propriedades trazem também algumas vantagens ao processo como por exemplo economia de matéria-prima, de energia e de produtos químicos. Os benefícios mais notáveis são as baixas temperaturas e pressões do processo, sem reacções secundárias indesejadas.⁴⁵

As lipases têm desempenhado um papel importante como biocatalisadores industriais, pois representam uma classe de enzimas capazes de hidrolisar ligações éster em substratos de triglicerídeos insolúveis em água. De facto, as lipases de fontes fúngicas como *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus delemar*, *Candida rugosa* e *Candida antarctica A* e *B* são hoje amplamente utilizadas em aplicações como detergentes, alimentos, produção de biodiesel e cosméticos.⁴⁶

A *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) é uma proteína que contém 269 aminoácidos, uma estrutura secundária pertencente à família α/β -hidrolase, e o seu sítio ativo é o trio catalítico

composto por uma serina (Ser146), uma histidina (His258), e um aspartato (Asp201).⁴⁶ O seu peso molecular é de 31.700 g/mol e o seu ponto isoelétrico é de 4.4, tem uma forma aproximadamente esférica, com um tamanho de $35\text{Å} \times 45\text{Å} \times 50\text{Å}$, e contém uma estrutura de folha- β central, predominantemente paralela, de oito filamentos, com cinco α -hélices interconectadas. A TLL é uma proteína bastante estável, é capaz de manter a sua atividade enzimática entre 55 e 60°C, com o máximo de atividade a pH próximo de 9.⁴⁷

Como foi dito anteriormente, ao contrário do uso convencional das lipases em detergentes, neste projeto a lipase é usada no processo de preparação dos detergentes, tal como demonstrado na Figura 6. Para tal, foi usada a TLL, comercializada pela Novozymes.

Este tipo de proteína é caracterizado por ter ativação interfacial, ou seja, torna-se ativa quando encontra uma interface água/lípido. Neste caso, a proteína que é solúvel em água, liga-se à interface e atua apenas em substratos da interface. Em particular na TLL, existe uma pequena estrutura (α -hélice), o lid (entre os resíduos 82 e 98), que é responsável pela ativação da proteína assim que ela se liga à interface, pois assume duas conformações: uma que provoca impedimento ao trio catalítico (conformação fechada) e outra que desimpede o trio catalítico (conformação aberta). Este mecanismo de atividade interfacial está demonstrado na Figura 7.^{48,46}



Figura 7 - Mecanismo de ativação interfacial da lipase. A branco está representada uma interface lipídica, e a preto um lípido que viaja entre a interface e o meio aquoso. Esta imagem permite observar que a enzima assim que se liga à interface adota uma conformação específica para favorecer a sua atividade, e ao mesmo tempo que o seu centro ativo apenas tem afinidade para os lípidos da interface. Imagem adaptada de Gelb, M. *et al.*⁴⁸

Uma vez ligada à interface lípido/água, a lipase inicia a sua atividade através do trio catalítico. O mecanismo desta fase está apresentado na Figura 8. Na primeira etapa, a serina é ativada por desprotonação, com auxílio da histidina e do aspartato (Figura 8a). Consequentemente, dá-se um ataque nucleofílico da serina ao grupo carbonilo do substrato formando um intermediário acil-enzima (Figura 8b). De seguida, dá-se um novo ataque nucleofílico, desta vez por parte da água (também funciona com um monoacilglicerídeo por exemplo), à enzima acilada levando à libertação do produto e regeneração do sítio catalítico (Figura 8c).⁴⁹

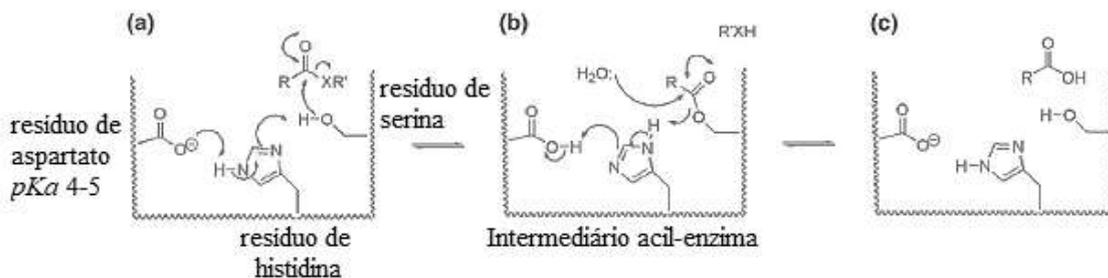


Figura 8 - Mecanismo de catálise da lipase. Adaptado de Reis, P. *et al.*⁴⁹

Neste projeto, para os estudos de dinâmica molecular, que serão falados adiante, foi usada a mesma enzima, no entanto foi estudada na sua conformação aberta (1EIN), conformação fechada (1DT3) e ainda uma mutação entre uma esterase e uma nativa 1EIN (1EIN_hybrid). Para a realização destes estudos, foram adquiridas as estruturas da proteína através do *Protein Data Bank* (PDB), às quais foram atribuídas os códigos PDB 1DT3 e 1EIN.

Estudos computacionais de dinâmica molecular que constam na literatura, sustentam a ideia de que o lid fecha (1DT3, conformação fechada) quando a lipase está presente num ambiente hidrofílico (alta constante dielétrica), enquanto quando o ambiente passa a ser hidrofóbico (baixa constante dielétrica), o lid abre (1EIN, conformação aberta). A Figura 9 demonstra este movimento do lid.⁴⁶

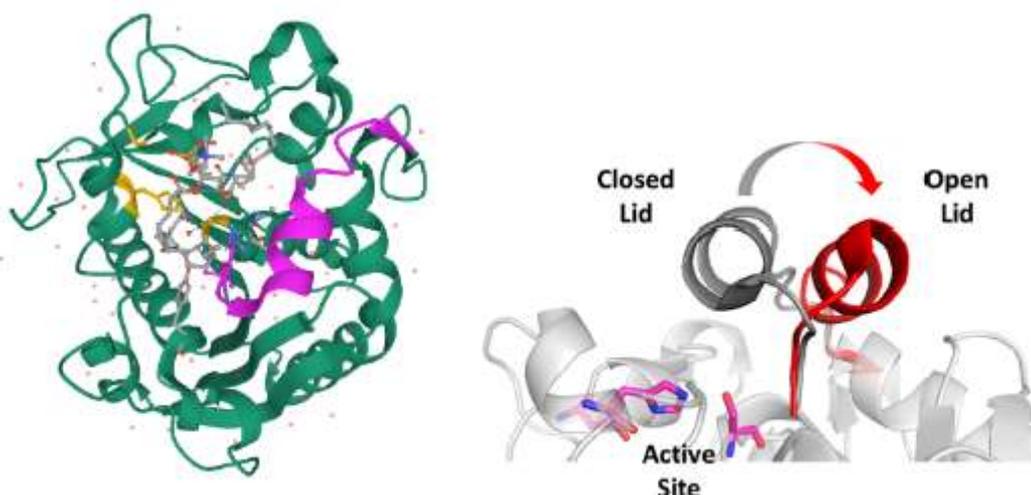


Figura 9 - A imagem do lado esquerdo representa a proteína TLL na sua conformação aberta, sendo que a cor rosa representa o lid, e a cor amarela representa o trio catalítico. A figura do lado direito representa uma aproximação da zona do lid e trio catalítico da proteína TLL, demonstrando o movimento que o lid adota face às duas conformações da proteína: com o lid cinzento estamos perante a conformação fechada, e com o lid vermelho estamos perante a conformação aberta. Imagens adaptadas de <https://www.rcsb.org/> e de Jakob Skjold-Jørgensen *et al.*⁴⁶

velocidade de cada átomo no sistema em estudo. Inicialmente, é atribuída uma configuração específica aos átomos com o objetivo de reproduzir a temperatura e a pressão do sistema real. A partir do cálculo das forças que atuam em cada partícula, é possível determinar a posição e a velocidade de cada um desses átomos posteriormente. As forças que atuam nessas partículas são determinadas usando um modelo conhecido como campo de forças, que normalmente é desenvolvido com base numa combinação de princípios básicos da física, parametrizações para cálculos de mecânica quântica, e dados experimentais. O campo de forças determina a contribuição de cada tipo de interação para a função geral do sistema.^{52,53} Embora as simulações de DM não permitam caracterizar por si só uma reação química, permitem estudar individualmente cada um dos processos adjacentes a esta reação, através da trajetória que se obtém da simulação, o que fornece uma quantidade de informação importante em relação ao sistema em estudo.⁵² Esta informação pode ser obtida através de diversas análises, nomeadamente *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) para estudar a estabilidade do sistema, estudos de interações e distâncias entre moléculas, etc.

Os diferentes campos de forças usados em DM podem ter diferentes graus de resolução, o nível atômico é o que permite obter informações mais detalhadas sobre o sistema ao longo da simulação, no entanto requer muito poder computacional, o que limita as escalas de tempo usadas. O nível Coarse Grained (CG) é menos detalhado, no entanto é bastante eficaz e permite usar escalas de tempo mais longas e estudar sistemas maiores.⁵⁴

Neste projeto científico usa-se uma abordagem CG para o estudo da reação de hidrólise dos triglicerídeos catalisada pela lipase TLL (estruturas 1EIN, 1DT3 e 1EIN_hybrid). Neste tipo de resolução, uma única partícula é usada para representar um grupo de átomos, reduzindo assim os graus de liberdade do sistema e o número de partículas a serem computadas. O modelo CG seguido para os estudos de DM deste projeto foi o MARTINI⁵⁵, que é atualmente um dos campos de força mais usados, e permite fazer simulações em diferentes tipos de moléculas, desde lípidos a proteínas, açúcares, entre outras. Este modelo é baseado num mapeamento de quatro para um (4:1), isto é, em média quatro átomos pesados mais os hidrogénios a eles associados são representados por um único centro de interação, ou seja, uma única partícula que costuma ser representada como uma esfera (bead). Existem outros tipos de mapeamento, nomeadamente 3:1 e 2:1, no entanto, o mapeamento de 4:1 traz a melhor relação entre eficiência computacional e representabilidade química. Com base na natureza química da estrutura subjacente, as esferas de CG atribuem-se a um tipo de partícula específico com caráter mais ou menos polar. O modelo de Martini possui quatro tipos principais de partículas: polar (P), não polar (N), apolar (C) e carregada (Q). Dentro de cada tipo, existem subdivisões diferentes de acordo com a sua capacidade de ligação de hidrogénio e o seu grau de polaridade, o que resulta num total de 18 tipos de partículas.⁵⁵ A Figura 11 representa uma esfera que corresponde a 4 moléculas de água e um lípido representado por 10 esferas no modelo MARTINI.

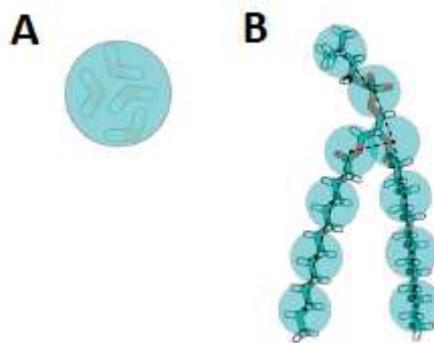


Figura 11 - Representação do mapeamento do modelo MARTINI para as moléculas de água (A) e para um lípido (B). Os círculos a azul transparente representam as esferas (beads) do mapeamento. Adaptado de Marrink, S. e Tieleman, D.⁵⁵

No caso de simulações de DM com proteínas usando o modelo MARTINI, a falta de ligações de hidrogénio torna a estrutura terciária da proteína instável, e por isso é necessário usar uma rede elástica. Existem vários modelos de rede elástica, como o ElNeDyn, o GoMartini ou o Generalized Elastic Network (GEN)⁵⁶. Neste trabalho, foi usado o modelo de rede elástica ElNeDyn22, que é composta por ligações harmónicas permanentes entre as partículas do backbone ($C\alpha$) da proteína, impedindo assim uma alteração estrutural, por exemplo desnaturação da proteína, ao longo da simulação. Este modelo de rede elástica foi escolhido porque se optou por manter a estrutura das proteínas o mais próximo possível do original. Estas ligações harmónicas são também conhecidas como molas harmónicas, e são caracterizadas por uma constante de força (K_{SPRING}) e um cutoff (RC), que acabam por determinar a rigidez e a extensão da rede elástica. Estes valores de K_{SPRING} e RC são considerados os mesmos para toda a proteína, no entanto variam de proteína para proteína.^{57,55}

1.7. Objetivos do Projeto

O óleo alimentar usado tem vindo a ser considerado um grande problema de poluição ambiental quando o seu descarte não é feito corretamente. Hoje em dia, já existem diversas formas de reciclar este óleo evitando que chegue aos ecossistemas e às ETAR e provoque elevados estragos. A forma mais comum de reciclagem, é a sua transformação em biodiesel, no entanto, acaba também por poluir o ambiente quando é usado. A indústria oleoquímica tem reunido muitos esforços para diversificar esta reciclagem do OAU.

Este projeto, uma parceria entre o Grupo Colling da Universidade de Coimbra e a empresa EcoXperience, assenta no reaproveitamento do OAU para o transformar em produtos de limpeza, que para além de darem uma nova vida ao OAU também têm um menor impacto no meio ambiente do que os detergentes convencionais. A inovação do projeto passa pelo processo de saponificação que é diferente do convencional. Em vez de se usar reagentes nocivos para o meio

ambiente e até para o utilizador na saponificação dos triglicerídeos, recorre-se à hidrólise dos triglicerídeos na presença de uma enzima, a TLL. Esta enzima tem como objetivo quebrar a ligação éster dos triglicerídeos, formando ácidos gordos, seguido da adição de base para que acima do seu pKa se formem sais carboxilatos, os surfactantes. Este processo distingue os produtos da EcoXperience dos restantes produtos no mercado no que diz respeito a sustentabilidade e até a economia circular!

O presente projeto científico tem como principal objetivo a otimização do processo de saponificação do óleo de palma, óleo de colza e óleo de girassol usados, para a preparação de detergente do chão. O interesse particular neste projeto relaciona-se com o facto dos óleos de palma, colza e girassol serem dos mais consumidos no mundo, sendo por isso os óleos que provocam maior impacto ambiental e é, portanto, urgente validar o seu processo de transformação em detergente (reciclagem). Desta forma, foram realizados estudos de otimização da reação de hidrólise tendo em conta as características da enzima usada e dos óleos em estudo. Os estudos foram realizados tanto a nível computacional recorrendo a simulações de dinâmica molecular, como a nível laboratorial.

As simulações de dinâmica molecular visaram reproduzir a reação enzimática de hidrólise usada em laboratório, para isto foi usado um sistema bifásico óleo/água, em que inicialmente o modelo usado para o óleo era a trioleína (TOG), por ser um modelo universal. Mais tarde, após apurar as proteínas com melhor desempenho (de entre a 1DT3, 1EIN e 1EIN_hybrid), o modelo usado para o óleo visou reproduzir os óleos em estudo (palma, colza e girassol). Através destes estudos, foi possível perceber a afinidade e o comportamento de cada proteína para com a interface óleo/água.

Para os estudos laboratoriais foi necessário obter óleo alimentar usado, e para isso os óleos foram submetidos a 3 e 5 ciclos de fritura de batatas. Foi feita uma caracterização química dos óleos virgens e usados, que compreende o índice de acidez, índice de saponificação, índice de iodo, análise de FTIR-ATR e análise de espectroscopia UV-Vis.

Uma vez caracterizados os óleos, procedeu-se aos estudos de otimização da reação de hidrólise, e para tal recorreu-se ao Planeamento Factorial, que é uma técnica que se insere no ramo da quimiometria, mais propriamente, desenho experimental. O seu principal objetivo é estudar um sistema com diferentes variáveis através da combinação destas para obter o máximo de informação sobre o sistema recorrendo a um número mínimo de experiências. Maior parte das aplicações do desenho experimental focam-se na otimização de processos, porque permite descobrir as variáveis relevantes que produzem mudanças significativas num determinado parâmetro, ou até combinações de variáveis que produzam resultados significativos. Para isto, maior parte das vezes é necessário fazer um estudo prévio do sistema em questão para poderem ser selecionadas as variáveis necessárias. Estas variáveis são usadas no desenho experimental e de seguida é definido um número fixo de experiências, através dos resultados destas experiências o desenho experimental cria modelos (que se traduzem em equações paramétricas) que permitem

analisar os resultados, apurar as condições ideais e até fazer previsões. Os pontos correspondentes a todas as experiências possíveis constituem uma superfície contínua, conhecida como superfície de resposta, dependendo do número finito de experiências realizadas para um sistema, obtém-se um mapa mais ou menos preciso da superfície de resposta. Os desenhos de superfície de resposta mais usados são o Box-Behken e o Doehlert design.^{58, 59} Neste contexto, foram realizados estudos cinéticos variando as condições para a reação enzimática de hidrólise, e recorrendo ao método de planeamento fatorial, foram apuradas as condições de referência desta reação para cada um dos óleos.

Com as condições ótimas de reação de hidrólise apuradas, procedeu-se à adição de base, que também serviu para determinar a melhor base para a transformação em detergente. Por fim, os detergentes obtidos foram submetidos a uma caracterização físico-química através do pH, teste de espuma, índice de emulsificação, tensão superficial, e viscosidade, e comparados com um detergente comercial. Estas técnicas serão exploradas nas próximas secções.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Dinâmica Molecular

2.1.1. Sistemas usados

2.1.1.1. Descrição, composição e construção dos sistemas

Neste trabalho recorreu-se a estudos de dinâmica molecular para caracterizar as interações entre uma proteína (lipase) e diversos óleos usando um modelo de caixa bifásica óleo/água. Foram realizadas simulações usando o software Groningen Machine for Chemical Simulation (GROMACS) 2019⁶⁰ com um campo de forças Coarse-Grained Martini versão 2.2⁶¹. Neste estudo foram usados vários sistemas, numa primeira fase foram estudados três sistemas com caixa bifásica óleo/água em que o modelo usado para o óleo foi o do TOG (trioleína) por ser o mais universal, cada um destes sistemas inclui uma lipase: a 1EIN (conformação aberta, sem impedimento no centro ativo), 1DT3 (a mesma lipase mas com conformação fechada, com impedimento no centro ativo) e a 1EIN_hybrid (proteína mutada entre uma esterase e uma nativa entre os resíduos 82 e 98 da 1EIN). Após analisar os resultados destes sistemas, e concluir que as proteínas 1EIN e 1EIN_hybrid seriam mais eficientes, avançou-se com novos sistemas bifásicos em que o modelo usado para o óleo passaria a reproduzir os diferentes óleos estudados no laboratório. Assim sendo, passou-se a ter dois sistemas bifásicos óleo/água para o óleo de colza, outros dois sistemas bifásicos óleo/água para o óleo de girassol e mais outros dois sistemas bifásicos óleo/água para o óleo de palma, em que um deles contém a proteína 1EIN e outro a 1EIN_hybrid. O modelo para o óleo nestes últimos sistemas foi construído com base na constituição real de cada óleo³², desta forma para o óleo de colza foi estimado 65% de ácido oleico (TOG), 30% de ácido linoleico (TLG) e 5% de ácido palmítico (TPG), para o óleo de girassol foi 30% de ácido oleico (TOG), 65% de ácido linoleico (TLG) e 5% de ácido palmítico (TPG), para o óleo de palma foi 50% de ácido palmítico (TPG) e 50% de ácido oleico (TOG). A Tabela 4 expressa a composição de cada sistema bifásico, e a Figura 12 exemplifica um sistema bifásico óleo/água com uma lipase na sua interface.

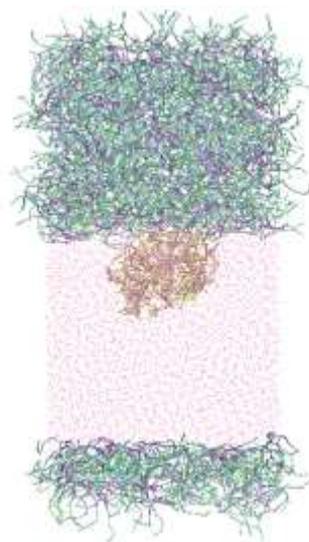


Figura 12 - Exemplo de sistema bifásico óleo/água, em que a caixa de óleo é composta por moléculas de trioleína e a caixa de água por moléculas de água. Na interface que delimita a água e o óleo está a proteína 1EIN.

Uma vez construído o sistema (Figura 12) e translacionada a proteína para o centro da água (as simulações não devem iniciar com a proteína na interface óleo/água para não influenciar os resultados, ou seja, ela deve deslocar-se livremente até à interface sem estar inicialmente restringida), neutralizou-se o sistema através da adição de iões, neste caso de Na^+ . Na Tabela 4 está representada a composição de cada sistema.

Tabela 4 - Constituição dos diferentes sistemas bifásicos.

Molécula	Sistema A	Sistema B	Sistema C	Sistema D (colza)	Sistema E (girassol)
TOG	500	500	500	325	150
TPG	-	-	-	25	25
TLG	-	-	-	150	325
H₂O	6746	6744	6749	6740	6750
1DT3	1	-	-	-	-
1EIN	-	1	-	1	1
1EIN_hybrid	-	-	1	-	-
Na⁺	8	8	8	8	8
Tamanho da caixa (Å)	95x95x191	95x95x190	95x95x191	95,7x95,7x188,6	95,7x95,7x189,4

(Continuação da Tabela 4)

Molécula	Sistema F (palma)	Sistema G (colza)	Sistema H (girassol)	Sistema I (palma)
TOG	250	325	150	250
TPG	250	25	25	250
TLG	-	150	325	-
H ₂ O	6746	6742	6749	6745
1DT3	-	-	-	-
1EIN	1	-	-	-
1EIN_hybrid	-	1	1	1
Na ⁺	8	8	8	8
Tamanho da caixa (Å)	95,7x95,7x188,36	95,7x95,7x188,7	95,7x95,7x188,9	95,7x95,7x188,39

2.1.2. Parametrização molecular

Para construir todos os sistemas, foi necessário converter as configurações originais de alguns dos constituintes para Coarse-Grained, e para isso recorreu-se à ferramenta martinize.py, ambas foram obtidas a partir do site do Martini (<http://cgmartini.nl/>).

As proteínas usadas nos sistemas foram obtidas no site Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), a enzima 1EIN_hybrid foi mutada a partir da 1EIN e de uma esterase, entre os resíduos 82 e 98 (Figura 10)⁵¹ recorrendo ao software Pymol.

A lipase em estudo tem a particularidade de conter histidinas duplamente protonadas, pelo que foi necessário definir manualmente o estado de protonação das HIS145 e HIS198.

Em todos os sistemas estudados foi necessário recorrer ao uso de uma rede elástica para manter a estrutura tridimensional da proteína, ou impedir que esta desnaturasse durante a simulação, isto é conseguido através de ligações harmónicas permanentes. O modelo de rede elástica usado foi o Elnedyn22 (versão 22). A rede elástica usada para as proteínas tem constante de força Kspring de 500 kJ/mol/nm² e RC de 0,9 nm.⁵⁷ As topologias dos triglicérides, nomeadamente trioleína, tripalmitina e trilinoleína foram descarregadas do site Martini, e o modelo usado para a água foi o *standard nonpolarizable Martini water model*.

2.1.3. Configuração das simulações

Nas simulações dos sistemas A, B e C correram 5 replicados de cada, e nas simulações dos sistemas D a I correram 3 replicados de cada, todos usando um número constante de partículas, condição de fronteira periódica, pressão e temperatura controladas através do barostato

Berendsen⁶² e termostato V-rescale⁶³ respectivamente, com controlo semi-isotrópico e pressão de 1 bar. A temperatura foi de 298K para todos os sistemas e também de 333K para os sistemas de D a I. As interações de Coulomb apresentam um cutoff de 1.1 nm e uma constante dielétrica de 15, e as interações de Lennard-Jones um cutoff de 1.1 nm. Para cada simulação, foi realizada uma minimização de energia, seguida por uma simulação curta de 1 ns com intervalo de tempo de 2 fs, e outra de 10 ns com intervalo de tempo de 10 fs. Os sistemas foram simulados nas condições NPT durante 2 μ s usando uma etapa de integração 20 fs.

2.1.4. Análise de dados

2.1.4.1. Análise estrutural, RMSD e RMSF

Para estudar a estabilidade da proteína ao longo das simulações recorreu-se aos cálculos de “*Root Mean Square Deviation*” (RMSD) e de “*Root Mean Square Fluctuation*” (RMSF), através das ferramentas *gmx rms* e *gms rmsf* do GROMACS, respectivamente. No RMSF apenas as alterações das posições das backbone beads foram consideradas.

O RMSD permite analisar a alteração da estrutura relativamente à estrutura de partida e é calculado pela Equação 2:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 2}$$

Com $M = \sum_{i=1}^N m_i$, m_i é a massa do átomo inicial e $r_i(t)$ é a posição no tempo t .⁶⁴

O RMSF permite identificar regiões/resíduos da proteína mais móveis ou flexíveis.

2.1.4.2. Processo de interação das proteínas com o óleo

Para estudar as interações da proteína com os diversos óleos, foi calculada a dependência temporal da distância da proteína ao centro de massa do óleo, através da ferramenta *gmx distance* do GROMACS. Foi ainda usada a ferramenta *gmx select* para identificar os resíduos da proteína que interagem com o óleo e os triglicerídeos do óleo que interagem com a proteína.

Para além disto, ainda foi estudada a orientação da proteína na interface óleo/água recorrendo à ferramenta *gmx bundle*, que calcula o ângulo entre o eixo z e um vetor da proteína. Neste caso, o vetor escolhido foi o lid (entre o resíduo 82 e o 98).

2.1.4.3. Visualização das trajetórias

As trajetórias adotadas pelas proteínas ao longo das simulações foram visualizadas através do Visual Molecular Dynamics (VMD).

2.1.4.4. Análise das caixas de solvente usadas

Após análise e interpretação dos resultados relativos aos sistemas bifásicos água/trioleína, avançou-se para novos sistemas bifásicos, em que o óleo visa reproduzir os óleos estudados laboratorialmente, nomeadamente óleo de girassol, óleo de colza e óleo de palma.

Para a análise e validação das novas caixas de solvente recorreu-se à ferramenta gmx angle, através da qual se pode observar o comportamento dos ângulos curtos e longos dos triglicerídeos ao longo das simulações.

2.2. Componente Laboratorial

2.2.1. Caracterização experimental dos óleos alimentares usados

Ao longo do presente trabalho experimental foram estudadas nove amostras, óleo de girassol (marca Fula), óleo de colza (marca Vitaquell), óleo de palma (marca Guinea's) virgens e todos estes óleos submetidos a 3 e a 5 ciclos de fritura. O processo de fritura consistiu na fritura de batatas congeladas, a 180 °C durante aproximadamente 30 minutos. Após estes ciclos de fritura, os óleos usados foram filtrados por sucção, e foi realizada uma caracterização experimental de cada amostra, sendo esta essencial para perceber se os triglicerídeos presentes nos óleos sofrem alterações quando submetidos a frituras, relativamente ao seu estado virgem.

As amostras foram caracterizadas de acordo com métodos padrões e técnicas de análise, são eles o índice de acidez, índice de saponificação, índice de iodo, espectroscopia UV-Vis (índice de dienos conjugados) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As análises foram realizadas em triplicado.

2.2.1.1. Índice de Acidez

O índice de acidez permite verificar a acidez da amostra, ou seja, o teor de ácidos gordos livres presentes na amostra em estudo, e é expresso em miligramas de KOH (marca José Manuel Gomes dos Santos, LDA) por grama de amostra. A sua determinação foi realizada de acordo com o Regulamento (CEE) N° 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991⁶⁵. Pesou-se 1g de óleo (num erlenmeyer de 100 ml) e dissolveu-se em 50 ml de mistura dissolvente éter etílico/etanol (1:1). Adicionou-se 2-3 gotas de fenolftaleína (marca Panreac) e titulou-se com solução aquosa de KOH 0.5 M (previamente padronizada), até a mistura ficar rosada.

O índice de acidez (W_A) é calculado pela Equação 3:

$$W_A = \frac{M_{KOH} \times V \times c}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 3}$$

em que M_{KOH} representa a massa molar de KOH (56.11 g/mol), V o volume gasto (ml) da solução de KOH, c a concentração da solução de KOH (M) e m a massa da amostra.

2.2.1.2. Índice de Saponificação

A determinação do índice de saponificação seguiu a norma ISO 3657:2013. Pesou-se 1g de óleo (num erlenmeyer de 100 ml) e adicionou-se 25 ml de solução etanólica de KOH 0.5 M. Colocou-se a mistura reacional em refluxo (60 a 70 °C) sob agitação durante 30 minutos. Passado este período e após a mistura arrefecer, adicionou-se 2-3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com uma solução de HCl (37% marca Merck) 0.5 M (previamente padronizada) até a mistura ficar incolor. Em paralelo foi realizado um ensaio em branco.

O índice de saponificação (W_S) é expresso em miligramas de KOH por grama de óleo, e representa a quantidade de base (KOH) necessária para saponificar todo o conteúdo lipídico (triglicerídeos e ácidos gordos livres) de uma amostra. É calculado pela Equação 4:

$$W_S = \frac{M_{KOH} \times (V_1 - V_2) \times c}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 4}$$

onde M_{KOH} representa a massa molar de KOH (56.11 g/mol), V_1 o volume (ml) da solução de HCl do ensaio em branco, V_2 o volume (ml) gasto da solução de HCl na titulação com a amostra, c a concentração da solução de HCl, e m a massa da amostra (g).

2.2.1.3. Índice de Iodo

O índice de iodo foi determinado de acordo com o Regulamento (CEE) N° 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991⁶⁵. Este índice mede a insaturação dos óleos e gorduras, uma vez que a partir da adição de iodo às duplas ligações se dá a sua halogenação. Para a determinação do índice de iodo pesou-se 0.1 g de óleo (num erlenmeyer de 250 ml), adicionou-se 20 ml de mistura dissolvente ciclohexano/ácido acético glacial (marca Chem-Lab) 1:1, e 25 ml de reagente de Wijs (solução de monocloreto de iodo 0.1 M em ácido acético, marca Honeywell), tapou-se agitou-se e deixou-se no escuro durante 1 hora. Passado este período, adicionou-se 20 ml de solução de iodeto de potássio (marca Fisher Chemical) 100 g/l e titulou-se a mistura com uma solução de tiosulfato de sódio (marca Merck) 0.1 M até aparecer um tom amarelo, adicionaram-se umas gotas de solução de amido (marca Sigma-Aldrich) e continuou-se a titulação com agitação forte até a solução ficar incolor. Paralelamente foi realizado um ensaio em branco.

O índice de iodo (W_I) vem expresso em gramas de iodo por 100 gramas de óleo, e é calculado segundo a Equação 5:

$$W_I = \frac{12.69 \times c \times (V_1 - V_2)}{m_{amostra}} \quad \text{Equação 5}$$

onde c representa a concentração (mol/L) da solução de $Na_2S_2O_3$, V_1 o volume (ml) da solução de $Na_2S_2O_3$ do ensaio em branco, V_2 o volume (ml) da solução de $Na_2S_2O_3$ usado na determinação, $m_{amostra}$ a massa da amostra em gramas e 12.69 é a massa molecular do iodo após ser aplicado o factor de conversão para as unidades do índice de iodo.

2.2.1.4. Espectroscopia FTIR-ATR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que permite estudar as vibrações dos átomos de uma molécula. Ao fazer passar um feixe de luz na região do infravermelho através da amostra, a radiação incidente é absorvida em diferentes frequências dando posteriormente origem ao espectro. As frequências em que as bandas aparecem no espectro de infravermelho correspondem às frequências das vibrações das moléculas da amostra. Neste caso, a espectroscopia de infravermelho usa espectrómetros de transformada de Fourier, que se baseiam num processo matemático que melhora a qualidade dos espectros e minimiza o tempo necessário para a obtenção

dos dados. Acoplado a este espectrómetro temos o equipamento de Reflexão Total Atenuada (ATR), que opera medindo as alterações que ocorrem num feixe infravermelho refletido internamente quando este feixe entra em contacto com uma amostra. Como é possível observar na Figura 13, nesta técnica, um feixe infravermelho é direcionado, num determinado ângulo, para um cristal opticamente denso, pouco solúvel em água e com um alto índice de refração. Este feixe atravessa o cristal e atinge a amostra que está em contacto com o cristal, gerando uma reflexão interna total (quando o ângulo de incidência na interface entre a amostra e o cristal é maior que o ângulo crítico), e posteriormente sai pela extremidade oposta do cristal seguindo para o detetor do espectrofotómetro de infravermelho. O detetor regista o sinal obtido e gera um espectro de infravermelho. Quando o feixe infravermelho entra em contacto com a amostra, esta absorve seletivamente radiação, a radiação atenuada resultante é medida e registada em função do comprimento de onda pelo espectrofotómetro, dando origem a um espectro.

Esta técnica oferece muitas vantagens, das quais se destaca o facto de não ser necessário preparar a amostra, basta colocá-la em contacto com o cristal, e é fácil de limpar após utilização, para além disto as amostras podem ser sólidas ou líquidas.^{66,67}

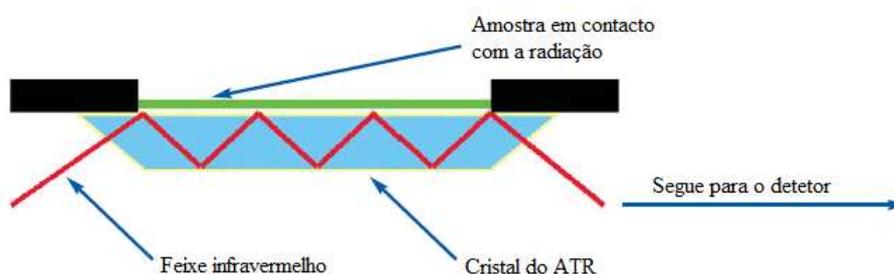


Figura 13 - Demonstração do funcionamento do equipamento de FTIR-ATR, em que um feixe infravermelho atravessa o cristal e atinge a amostra, gerando uma reflexão interna total, e de seguida sai pela extremidade oposta do cristal seguindo para o detetor do espectrofotómetro. Adaptado de <https://covalentmetrology.com/atr-ftir/>.

Neste trabalho, os espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de fourier foram obtidos num espectrofotómetro Nicolet 380 da marca Thermo Scientific. A leitura de cada amostra de óleo foi realizada com 32 varrimentos e resolução de 2 cm^{-1} . Os espectros foram subtraídos ao espectro de background. Esta técnica permitiu identificar os grupos funcionais presentes nas amostras consoante a sua absorvância e número de onda.

2.2.1.5. Espectroscopia UV-Visível

A espectroscopia de absorção UV-Vis é uma técnica na qual se faz incidir radiação eletromagnética, na região do ultravioleta-visível (200 a 800 nm) sobre uma amostra. Os grupos funcionais cromóforos desta amostra irão absorver parte da radiação, o que leva a transições entre diferentes estados eletrônicos das moléculas presentes (quando a energia da radiação eletromagnética que incide sobre a molécula é igual à diferença de energia entre o estado eletrônico fundamental e o estado excitado da molécula). Esta técnica baseia-se na energia necessária para excitar um elétron e este transitar de orbital molecular, estas transições são posteriormente observáveis no espectro de absorção. A quantidade de radiação absorvida pela amostra pode ser expressa pela lei de Beer-Lambert:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon lc \quad \text{Equação 6}$$

onde A é a absorvância, I e I_0 são a intensidade da radiação transmitida e a intensidade da radiação incidente respetivamente, ϵ é a absorvidade molar ($\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$), l é o caminho óptico (cm), e c é a concentração da espécie (mol L^{-1}).⁶⁸

Um espectrofotómetro UV-Vis mede a intensidade da luz que passa através de uma solução de amostra e compara-a com a intensidade da luz que passa pelo branco. Ou seja, dentro do espectrofotómetro estão duas cuvetes, uma com uma solução da amostra e outra com o branco, é emitido um feixe de luz (radiação eletromagnética) que atravessa a cuvete, e a intensidade da luz que é transmitida após passar pela cuvete é medida e registada, como é possível observar na Figura 14. De seguida, obtém-se um espectro que resulta da divisão da intensidade transmitida da solução da amostra pela intensidade transmitida pelo branco. Desta forma, é possível indentificar as moléculas que pertencem à amostra, uma vez que estas absorvem a luz em determinados comprimentos de onda que o branco não absorve. O espectro de absorção obtido é um gráfico da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente.⁶⁹



Figura 14 – Demonstração do funcionamento de um espectrofotómetro UV-Vis. Adaptado de <https://bit.ly/38NTF5O>.

É ainda possível determinar o índice de dienos conjugados, que nos dá em percentagem a quantidade de dienos conjugados presentes na amostra. Para o cálculo deste índice recorre-se às seguintes equações.⁷⁰

Coefficiente de absorção específica, a :

$$a = \frac{A}{b \times m} \quad \text{Equação 7}$$

em que A corresponde à absorvância da amostra, b ao comprimento da célula e m à massa da amostra em g/L da solução utilizada para as medições.

Coefficiente de absorção específica a_2 , a 233 nm corrigido para a absorção dos grupos ácidos ou ésteres:

$$a_2 = a_{233} - a_0 \quad \text{Equação 8}$$

em que a_0 é 0.07 para grupos éster e 0.03 para grupos ácidos.

A percentagem (m/m) de dienos conjugados, C_2 , é dada por:

$$C_2 = 0.91 \times a_2 \quad \text{Equação 9}$$

Para este trabalho, os espectros de absorção UV-Vis foram recolhidos através dum espectrofotómetro UV-2450 da marca Shimadzu. Para esta análise foi necessário preparar soluções, dissolvendo-se 0.02 g de amostra em 50 ml de iso-octano (marca Panreac). Neste caso, a cuvete de referência (branco) no espectrofotómetro apenas contém iso-octano. Foram medidos 3 espectros para cada amostra.

2.2.2. Otimização da reação de hidrólise

Uma vez caracterizados os óleos em estudo, procedeu-se à determinação das condições ótimas da reação de hidrólise, para tal foi necessário realizar estudos cinéticos, estudos de variação de condições da reação (proporção óleo/água, temperatura, percentagem de Lipex e velocidade de agitação) e por fim o planeamento factorial. Para os estudos desta secção foi usada uma formulação de lipase, a Lipex comercializada pela Novozymes.

2.2.2.1. Estudos Cinéticos da Reação de Hidrólise

Para perceber o comportamento da reação de hidrólise ao longo do tempo, foram realizados estudos cinéticos para cada óleo virgem. Para estes estudos cinéticos usou-se uma proporção óleo/água 2:1, sendo o peso total da reação de 80 g, com uma concentração de SLE₂S (70%) de 0.07 mM, Lipex (marca Novozymes) a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 60 °C e velocidade de agitação de 1500 rpm. A utilização de SLE₂S na reação de hidrólise, nesta concentração, aumenta o rendimento em cerca de 4% (estudos realizados no Grupo Colling).

A cada hora destes estudos cinéticos foi feita uma quantificação tirando uma alíquota da reação e dissolvendo numa mistura dissolvente etanol/acetona 1:1, que posteriormente foi titulada com uma solução aquosa de hidróxido de potássio 0.5 M (previamente padronizada) e indicador fenolftaleína. A cada quantificação foi calculado o rendimento através das fórmulas:

$$WA_t = \frac{M(KOH) \times v(KOH) \times c(KOH)}{m(amostra)} \times \frac{(f_o + f_A)}{f_o} \quad \text{Equação 10}$$

$$\text{Rendimento de hidrólise} = \frac{WA_t - WA_i}{WS_i - WA_i} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

onde WA_t corresponde ao índice de acidez da mistura reacional, WA_i corresponde ao índice de acidez do óleo original (óleo virgem não hidrolisado), WS_i é o índice de saponificação do óleo original, $M(KOH)$ a massa molar do hidróxido de potássio, $v(KOH)$ corresponde ao volume da solução aquosa de KOH gasto na titulação, $c(KOH)$ é a concentração da solução aquosa de KOH, $m(amostra)$ é a massa de cada alíquota, f_o representa a fração de óleo na reação e f_A a fração de água na reação.

Foram realizadas 12 quantificações, a primeira no início do estudo cinético, as restantes foram realizadas de hora a hora durante 10 horas, e a última foi às 24 horas de reação. Cada quantificação foi realizada em triplicado, e cada estudo cinético foi igualmente realizado em triplicado, tendo por isso 3 experiências independentes para cada óleo. Estes estudos cinéticos resultaram em gráficos de rendimento da hidrólise em função do tempo de reação.

2.2.2.2. Estudo de Condições de Referência para a Reação de Hidrólise

Para compreender o comportamento da reação de hidrólise, é também necessário estudar as suas condições de referência. Este estudo consistiu em fazer variar algumas condições da reação

de hidrólise, como a proporção óleo/água, a percentagem de lipex, a temperatura e a velocidade de agitação. No fim de cada reação foi feita uma quantificação e calculado o seu rendimento.

Para a proporção óleo/água foram testadas as proporções 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 e 7:1, com 0.07 mM de SLE₂S, sendo a massa total da reação de 30g, temperatura de 20°C, velocidade de agitação de 1500 rpm durante 5 horas. Para o estudo da percentagem de lipex testou-se as percentagens de 1%, 5%, 10% e 15%, com uma proporção óleo/água de 2:1, 0.07 mM de SLE₂S, massa total da reação de 30g, temperatura de 20°C, velocidade de agitação de 1500 rpm durante 5 horas. A temperatura foi fixada a 20 °C, 40 °C, 60° C e 70 °C (e 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C para o óleo de palma), na proporção óleo/água 2:1, concentração de SLE₂S 0.07 mM, massa total da reação de 30g, velocidade de agitação de 1500 rpm, durante 5 horas. Quanto à variação da velocidade de agitação foram estudadas as velocidades 200 rpm, 500 rpm, 1000 rpm e 1500 rpm, na proporção óleo/água de 2:1, massa total da reação de 30 g, concentração de 0.07 mM de SLE₂S, temperatura de 20 °C, durante 5 horas.

Cada quantificação foi feita em triplicado, e cada reação foi repetida três vezes. Os resultados serão apresentados na forma de gráfico do rendimento da reação de hidrólise (Equação 11) em função do parâmetro variado.

2.2.2.3. Planeamento Factorial da Reação de Hidrólise

No presente trabalho, foi feito um estudo prévio do sistema para definir as variáveis para o planeamento factorial que está descrito nas secções 2.5.1. e 2.5.2.. As variáveis escolhidas foram a temperatura, a percentagem de lipase, a proporção óleo/água e o tempo de reação, tal como indicado na Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis e factores usados no planeamento factorial.

Variável de reação	Designação da variável	Mínimo da variável	Médio da variável	Máximo da variável
Temperatura (°C)	T	20	40	60
% Lipex	E	2.5	8.75	15
Proporção Óleo/Água	O/W	0.5	1	1.5
Tempo (horas)	Time	2.5	5	7.5

Procedeu-se ao planeamento factorial através do software Design Expert, e usou-se um desenho de superfície de resposta do tipo Box-Beken. Foi gerado um total de 29 experiências (reações) que estão descritas na Tabela 6. Cada reação foi realizada e quantificada em triplicado. Foi apenas usado o óleo de colza virgem nesta secção, e as condições de reação fixas foram a

agitação de 1500 rpm, a concentração de 0.07 mM de SLE₂S e a massa total de reação de 30 g. É de notar que a percentagem de Lipex é sempre uma relação m/V do óleo.

Tabela 6 - Conjunto de experiências definido pelo Design Expert, para realização do planeamento factorial.

Reação	Tempo (horas)	% Lipex	Temperatura	Proporção Óleo/Água
1	5	15	60	1
2	5	8.75	40	1
3	5	8.75	40	1
4	5	8.75	60	1.5
5	2.5	8.75	60	1
6	2.5	8.75	40	1.5
7	7.5	15	40	1
8	5	15	20	1
9	5	2.5	20	1
10	2.5	2.5	40	1
11	7.5	8.75	20	1
12	5	8.75	40	1
13	5	8.75	20	0.5
14	7.5	2.5	40	1
15	5	2.5	40	0.5
16	7.5	8.75	40	1.5
17	5	8.75	20	1.5
18	5	15	40	1.5
19	7.5	8.75	40	0.5
20	2.5	15	40	1
21	2.5	8.75	40	0.5
22	5	2.5	40	1.5
23	5	8.75	40	1
24	7.5	8.75	60	1
25	5	2.5	60	1
26	5	8.75	60	0.5
27	5	8.75	40	1
28	2.5	8.75	20	1
29	5	15	40	0.5

Após a realização das experiências da Tabela 6, foram analisados os resultados através do Design Expert e foram apuradas as condições ótimas para a reação de hidrólise, que posteriormente foram aplicadas a todos os óleos em triplicado.

2.2.3. Preparação e Caracterização dos Detergentes

2.2.3.1. Preparação dos Detergentes

Uma vez otimizadas as condições de referência para a reação de hidrólise e testadas nos diferentes óleos, passou-se à preparação dos detergentes. Foi preparado um detergente do chão para cada óleo em estudo (óleo de colza, palma e girassol virgens e usados), e a formulação usada foi já otimizada pela empresa EcoXperience.

A formulação de detergente do chão consiste em 4% de mistura hidrolisada, 10% de NaOH (marca José Manuel Gomes dos Santos, LDA) em relação à massa de óleo utilizada para hidrólise, 1.4% de SLE₂S, 1.75% de isopropanol, e a restante percentagem é água destilada. Foi usado o agitador mecânico (Heidolph RZR 2020), para a mistura se tornar homogênea.

Os detergentes preparados foram posteriormente caracterizados e comparados com um detergente comercial lava-tudo da marca Continente.

2.2.3.2. pH

O pH para detergente do chão da EcoX, deve ser preferencialmente superior a 9, pois os tensoativos provenientes do óleo são ácidos gordos desprotonados, pelo que para garantir que se mantêm nesta forma o pH deve ser alto. Foi medido o pH de cada detergente e comparado com um detergente comercial.

2.2.3.3. Teste de Espuma

Um detergente não tem necessariamente de formar muita espuma para ser um bom detergente, tudo depende da sua finalidade, para um detergente do chão não é relevante que se forme imensa espuma. A quantidade de espuma é uma característica que pode variar imenso de detergente para detergente, tendo em conta os seus constituintes.

O teste de espuma permite avaliar a quantidade de espuma formada por cada detergente. Para realizar este teste, pesou-se 0.1 g de detergente em 10 g de água, numa proveta de 100 ml. De seguida tapou-se a proveta e agitou-se vigorosamente 20 vezes. Por fim mediu-se a altura da camada de espuma. Este teste foi realizado em triplicado para cada detergente e os resultados foram comparados com um detergente comercial.

2.2.3.4. Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação permite saber se os detergentes têm um bom poder de emulsificação de gordura, e até que ponto esta emulsão é estável, podendo ser um factor determinante para a finalidade do detergente. Este índice é dado pelo método de Cooper e Goldenberg (1987), e definido pela Equação 12:

$$IE(\%) = \frac{CE}{AT} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

em que *CE* corresponde à altura da camada emulsificada e *AT* à altura total do líquido.⁷¹

Para a realização do índice de emulsificação pesou-se 5 g de água, 0.2 g de detergente e 5 g de óleo de girassol virgem em falcons de 15 ml. Estas amostras foram agitadas manualmente vigorosamente 20 vezes e submetidas à agitação máxima no vortex VM3 da CAT durante 2 minutos. O procedimento foi realizado em triplicado para cada detergente.

2.2.3.5. Reologia

Por definição, a reologia é o estudo da deformação e do fluxo da matéria, quando submetida a uma determinada tensão externa.⁷² No caso dos fluidos, a reologia está relacionada com o escoamento dos mesmos, que é um fenómeno que está diretamente ligado aos conceitos de tensão, deformação e viscosidade. A tensão resume-se nas forças que atuam no fluido e é dada em Pascal (Pa). A deformação está associada à mudança de posições relativas das partes de um corpo quando aplicada uma tensão, podendo ser reversível ou irreversível. A viscosidade pode ser definida como a propriedade física de um líquido resistir ao escoamento induzido pelo cisalhamento.⁷³

No presente trabalho estudou-se a viscosidade das formulações de detergentes preparadas. Para tal, as amostras foram colocadas no reómetro (Thermo Scientific HAAKE MARS) e é usada uma configuração geométrica, que neste caso foi o cone C35/1° Ti L. O cone aplica uma tensão e ao mesmo tempo rotação controladas pelo reómetro (exemplificação na Figura 15). A viscosidade é posteriormente calculada no software do reómetro, pela Equação 12:⁷²

$$\eta = \frac{\sigma}{\gamma} \quad \text{Equação 13}$$

onde η representa a viscosidade em Pa.s, σ a tensão de cisalhamento em Pa e γ a taxa de cisalhamento em s^{-1} . O reómetro é capaz de controlar a temperatura, mas para este trabalho optou-se por usar a temperatura ambiente, uma vez que os detergentes também serão usados pelos consumidores à temperatura ambiente.

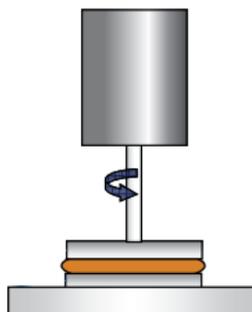


Figura 15 - Ilustração do funcionamento do reómetro, mais propriamente do cone exercendo tensão e rotação sobre a amostra (a cor de laranja). Adaptado de <https://bit.ly/3kCRoWC>.

2.2.3.6. Tensiometria

A tensiometria é mais uma técnica importante para a caracterização dos detergentes, pois permite medir tensões superficiais dos detergentes a diferentes concentrações e determinar a CMC, que é um factor determinante para o potencial de detergência. A tensão superficial existe nas interfaces líquido-ar, e relaciona-se com as forças intermoleculares presentes no líquido. Enquanto que no seu interior estas forças existem em todas as direções, na superfície não existe numa direção criando assim uma assimetria que dá origem à energia superficial (tensão superficial). Em suma, a tensão superficial é um reflexo das forças coesivas de um líquido.³⁶

Neste trabalho, a tensão superficial das amostras foi medida através do método do anel de Du Noüy, que consiste em fazer mergulhar na solução da amostra um anel de platina suspenso pela balança do tensiómetro, formando-se um filme de líquido dentro do anel. O recipiente com a amostra é lentamente descido provocando tensão no filme de líquido formado contrária à tensão do anel suspenso. Quando esta tensão é máxima o vector da força é paralelo à direção do movimento e o ângulo de contacto entre o líquido e a superfície do anel é 0° (Figura 16). Nesse momento é medida a tensão superficial que é dada através da Equação 13:⁷⁴

$$\sigma = \frac{F}{L \times \cos\theta}$$

Equação 14

onde σ é a tensão superficial em N/m, F em N é a força máxima exercida quando o vetor da força é paralelo à direção do movimento, L em m é o comprimento do anel molhado (corresponde à soma da circunferência interna e externa) e θ é o ângulo entre o líquido e a superfície do anel.

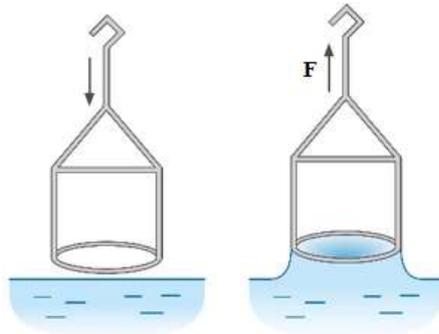


Figura 16 - Esquemática do método do anel Du Noüy. Do lado direito o anel a submergir na amostra, do lado esquerdo a força exercida que leva à determinação da tensão superficial. Adaptado de <https://bit.ly/3ICVAO1>.

Neste trabalho a tensão superficial foi medida num tensiómetro Attension da Biolin Scientific, em triplicado a amostras de 30 ml, na concentração de 1 g/L para os detergentes de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e um detergente comercial, a 25 °C.



Capítulo 3

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Dinâmica Molecular

Os resultados relativos aos estudos de dinâmica molecular estão organizados pela complexidade dos sistemas, ou seja, começa-se pelos sistemas mais simples em que o modelo para a caixa de óleo é apenas TOG, e depois de se apurar as proteínas com melhores resultados, avança-se para novos estudos com sistemas mais complexos, em que a caixa de óleo visa reproduzir os diversos óleos em estudo (óleo de colza, girassol e palma).

3.1.1. Sistemas TOG/Água

3.1.1.1. Análise da estabilidade estrutural dos modelos das proteínas

A estabilidade estrutural das proteínas num sistema pode ser analisada através de RMSD e RMSF. O RMSD demonstra a alteração da sua estrutura relativamente à estrutura de partida, o RMSF permite determinar regiões/resíduos da proteína mais móveis ou flexíveis.

A Figura 17 representa os RMSD e RMSF das proteínas dos primeiros sistemas estudados (sistemas óleo/água em que o óleo é representado por moléculas de TOG, com as proteínas 1EIN, 1EIN_Hybrid e 1DT3). Os gráficos da figura correspondentes ao RMSD indicam que a estrutura de qualquer uma das proteínas ao longo do tempo de simulação é muito semelhante à estrutura de partida. O que de certa forma já era esperado devido à utilização de uma rede elástica na parametrização das proteínas. Tendo em conta a escala em estudo, os pequenos desvios observáveis são insignificantes para a estabilidade do sistema. Ainda relativamente aos RMSD, também é observável que os gráficos dos diferentes replicados para cada proteína, se encontram sobrepostos, o que significa que há uma concordância entre os diferentes replicados, o que acaba por validar o comportamento observado, uma vez que todos os replicados têm o mesmo comportamento.

No que diz respeito aos RMSF, de uma forma geral, os replicados das diferentes proteínas também se encontram sobrepostos. Todos os replicados apresentam os mesmos picos, embora nem todos com a mesma intensidade. O facto dos replicados corroborarem no seu comportamento quanto aos picos apresentados nos gráficos de RMSF, indica que esses picos representam regiões mais móveis da proteína. É possível observar que as proteínas 1EIN e 1EIN_hybrid são bastante semelhantes entre si, e que a proteína 1DT3 é ligeiramente diferente. As proteínas 1EIN e

1EIN_hybrid apresentam os seus picos de maior intensidade nas mesmas zonas, no entanto, a proteína 1DT3 não apresenta grande intensidade nos picos dessas zonas, embora os picos também existam. Este comportamento era algo esperado, uma vez que a proteína 1EIN_hybrid tem como estrutura base a da proteína 1EIN e apenas apresenta uma mutação entre os resíduos 82 e 98. Em relação às proteínas 1EIN e 1DT3, estas são a mesma, no entanto a primeira apresenta uma conformação aberta no lid, tendo o seu centro ativo desimpedido, e a segunda apresenta uma conformação fechada no lid, ficando com o centro ativo impedido. Por outro lado, a proteína 1DT3 poderia ter menos flexibilidade devido à rede elástica que lhe foi adicionada antes da simulação, no entanto, devido à conformação do seu lid, acaba por ter menos ligações de rede elástica do que a proteína 1EIN. O que significa que se a flexibilidade da proteína dependesse da rede elástica, a proteína 1EIN teria menos flexibilidade que a 1DT3, e não é o que se verifica.

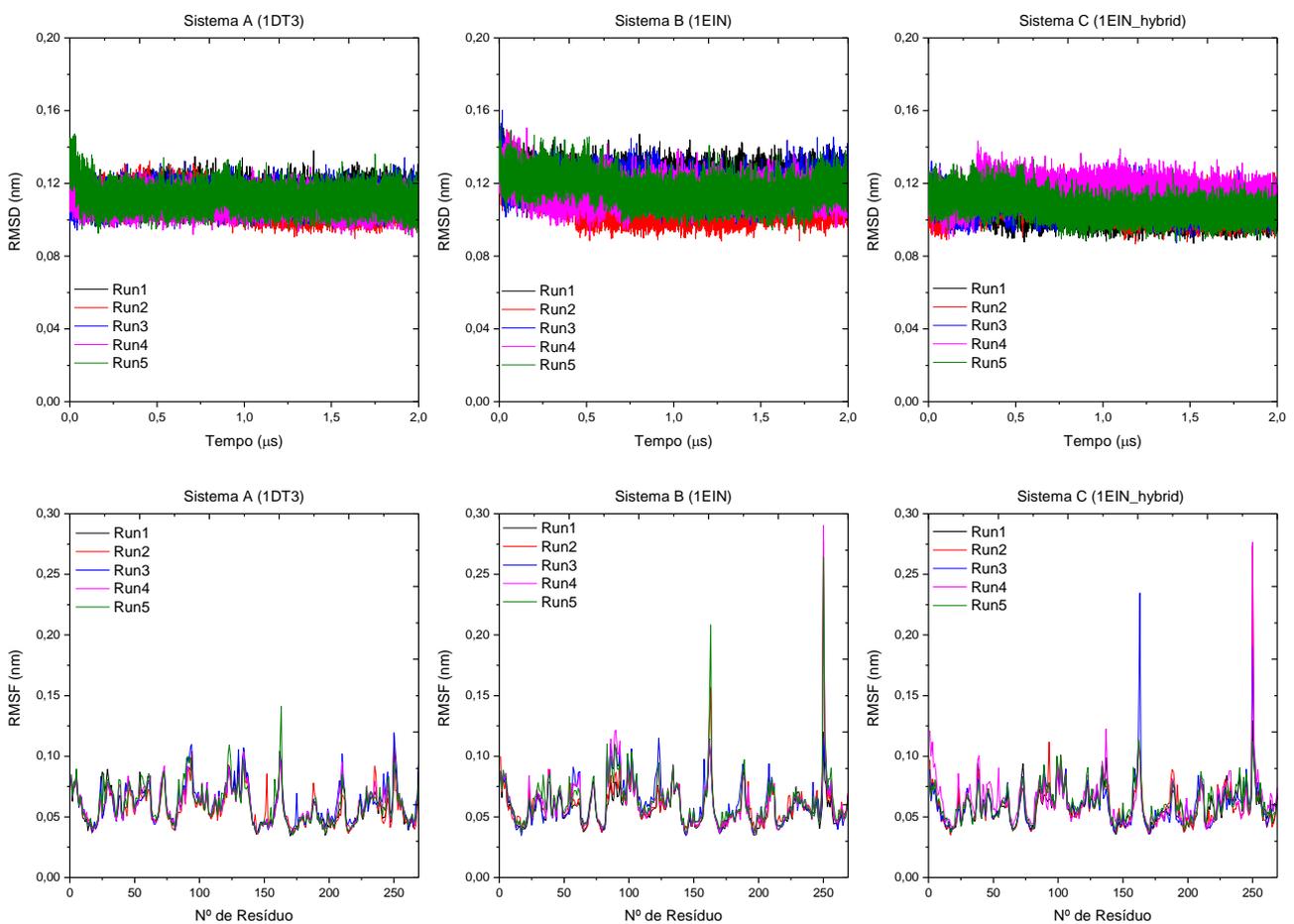


Figura 17 - Gráficos de RMSD e RMSF para os sistemas TOG/água com as proteínas 1DT3, 1EIN e 1EIN_Hybrid.

As zonas mais móveis das proteínas em estudo situam-se entre os resíduos 150 e 175, que corresponde a uma zona entre duas hélices. A região próxima do resíduo 250 poderá corresponder a um loop de uma folha β , como apresentado na Figura 18.

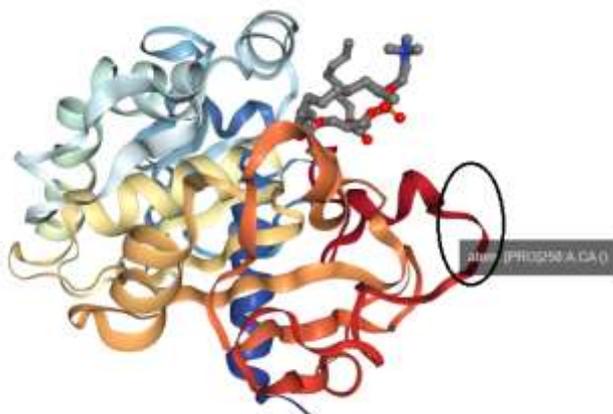


Figura 18 - Proteína 1EIN em 3D. A região dentro do círculo preto representa a região de resíduos próximos do 250. Imagem retirada de <https://www.rcsb.org/structure/1EIN>.

Através das análises de RMSF, é também possível observar que entre as proteínas 1EIN e 1EIN_hybrid, os gráficos são bastante semelhantes e as zonas mais flexíveis são as mesmas, o que indica que a mutação realizada na região do lid para a proteína 1EIN_hybrid não afeta a mobilidade/flexibilidade da proteína no geral.

3.1.1.2. Caracterização do processo de ligação da proteína à interface óleo/água

3.1.1.2.1. Distância da proteína ao centro de massa da caixa de óleo

Para estudar a interação das proteínas com a interface óleo/água, para além da visualização das trajetórias dos sistemas, começou-se por medir ao longo do tempo a distância entre a proteína e o centro de massa (COM) do óleo. Os resultados estão apresentados na Figura 19.

Devido à condição de fronteira periódica, existem valores de distâncias positivos e negativos, quando a proteína interage pela parte debaixo do óleo ou pela parte de cima, respectivamente. No entanto, o valor desta distância deve sempre ser considerado em módulo.

Em todos os sistemas apresentados na Figura 19, as proteínas após equilíbrio na interface, assumiram o valor de aproximadamente 7 nm de distância ao COM do óleo, que corresponde à distância em que a proteína realiza maior parte das interações com os triglicerídeos. A proteína que demorou mais tempo a estabilizar na interface, foi de forma geral a 1EIN, no entanto, a Run4 a proteína 1EIN_hybrid é mais instável ao longo da simulação devido à variação de distâncias observada.

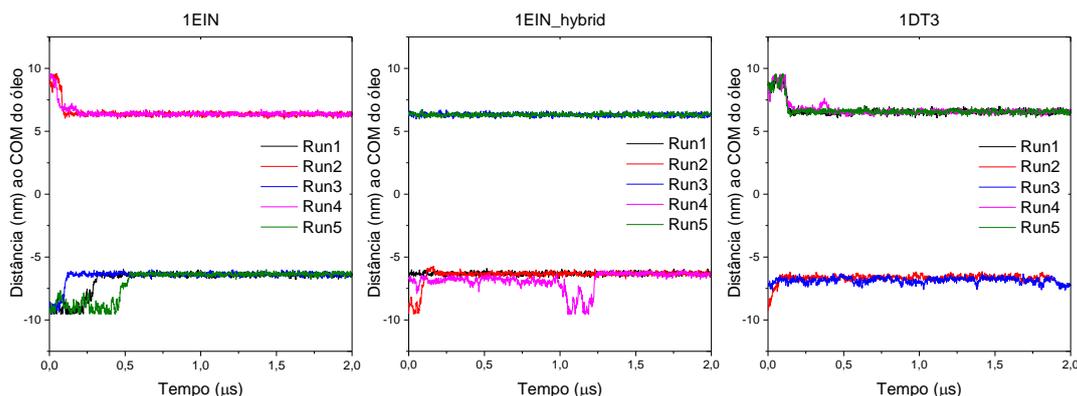


Figura 19 - Distâncias (nm) da proteína ao centro de massa do óleo em função do tempo de simulação para cada sistema TOG/água.

3.1.1.2.2. Orientação das proteínas em relação à interface óleo/água

Para estudar a orientação das proteínas em relação à interface óleo/água, para além de se ter visualizado as trajetórias dos sistemas, recorreu-se à ferramenta *gmx bundle* que permite calcular o valor de um ângulo definido entre um vetor escolhido na proteína e o eixo z da interface óleo/água. Para as proteínas em estudo, foi escolhido o vetor que corresponde ao lid da proteína, tal como demonstrado na Figura 20.

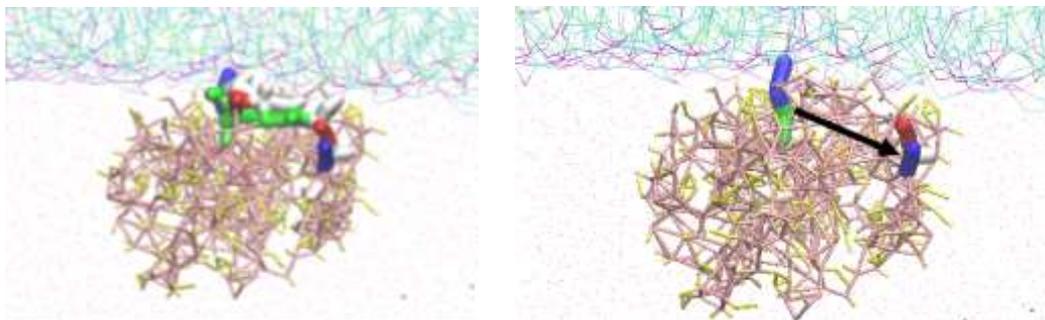


Figura 20 - Proteína 1EIN numa caixa bifásica óleo/água, à esquerda com o lid destacado, à direita com o vetor destacado correspondente ao lid.

A Figura 21 permite compreender os possíveis ângulos adotados pelo vetor, que neste caso é o lid da proteína. Tendo em conta a Figura 22, percebe-se que quando a proteína estabiliza na interface, o ângulo adotado é aproximadamente 75° , e por isso a posição que o lid da proteína adota preferencialmente é semelhante à posição exemplificada na Figura 21 para o ângulo inferior a 90° , dando por isso ideia de que o lid está direcionado para a caixa de óleo.

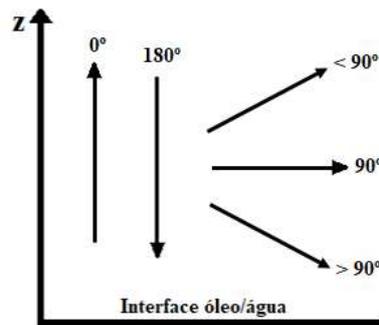


Figura 21 - Exemplificação dos ângulos que o vetor pode adotar ao longo da simulação.

No sistema A, que corresponde à proteína 1DT3 é possível observar muitas oscilações, o que já era esperado, uma vez que o lid está a impedir o centro ativo da proteína, pelo que ela procura estabilidade na interface noutras posições. Neste sistema, os replicados têm comportamentos um pouco diferentes, através da visualização da trajetória, foi possível observar que as Run1, Run2 e Run5 são aquelas que apresentam maior estabilidade, ou seja, começam com a proteína no centro da água, mas rapidamente a proteína se orienta e dirige para a interface, ficando lá até ao fim da simulação. Através dos gráficos da Figura 22, é possível verificar este comportamento, uma vez que o ângulo ($\approx 75^\circ$) é estável durante quase toda a simulação. Pormenorizando um pouco mais, observa-se que a Run2 acaba por ser estável no sentido em que se mantém no mesmo intervalo de ângulos, no entanto, dentro deste intervalo, o ângulo tem altos e baixos, indicando que houve pequenas oscilações na orientação/posição da proteína. A Run4 inicialmente apresenta um ângulo entre 120° e 160° , mas posteriormente acaba por estabilizar com o mesmo ângulo dos replicados anteriores (75°), o que explica o observado na sua trajetória, pois após estabilização da proteína na interface, esta afasta-se e posteriormente volta a ligar-se à interface, daí a mudança brusca de ângulo. A Run3 é a mais diferente de todas, apresenta um ângulo que oscila bastante ao longo da simulação entre 120° e 180° , através da trajetória observou-se que a proteína deslocou-se rapidamente para a interface, no entanto nunca interagiu com a interface usando o seu centro ativo, o que pode ser explicado devido ao impedimento provocado pelo lid, desta forma a proteína adotou uma posição diferente das restantes o que se reflete nos ângulos obtidos.

No que diz respeito ao sistema B, correspondente à proteína 1EIN, o comportamento dos vários replicados é bastante semelhante, todos acabam por encontrar estabilidade no mesmo ângulo de $\approx 75^\circ$, apenas muda o percurso até à interface, sendo que neste aspecto a Run5 destaca-se no sentido em que demora mais tempo a encontrar a posição mais estável. De forma geral, assim que os replicados chegam à interface acabam todos por adotar a mesma posição refletindo-se no ângulo de 75° até ao fim da simulação.

Em relação ao sistema C da proteína 1EIN_hybrid, o comportamento observado nas trajetórias é semelhante ao sistema B. No entanto, a Run4 destaca-se porque devido à condição de fronteira periódica existe uma interface no lado oposto à interface tomada como referência e a

proteína acaba por interagir com essa interface, deslocando-se apenas mais tarde para a interface de referência onde adota a mesma orientação dos restantes replicados. Isto pode ser observado através dos ângulos adotados, inicialmente o ângulo situa-se entre 0° e 60° , depois assume valores entre 100° e 180° , e por fim estabiliza a 75° sobrepondo-se com os restantes replicados.

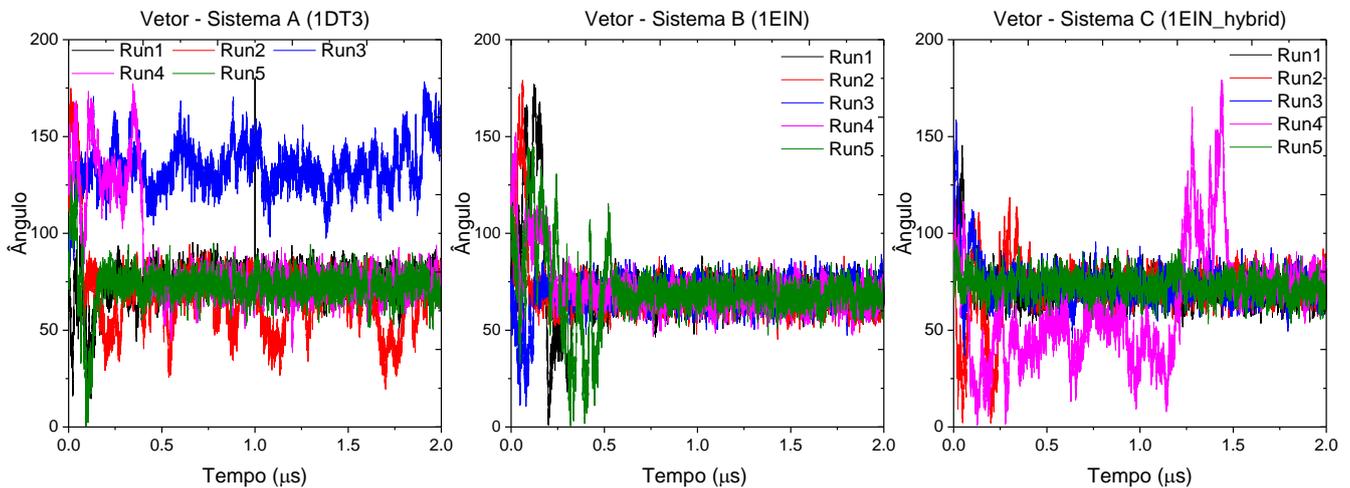


Figura 22 - Ângulo formado pelo vetor da proteína e o eixo z da interface óleo/água em função do tempo de simulação para cada sistema em estudo.

3.1.1.3. Caracterização dos resíduos mais importantes na interação das proteínas com o óleo

Para analisar as interações dos resíduos das proteínas com o óleo recorreu-se à ferramenta gmx select. Os gráficos da Figura 23 representam a frequência de interação em função do número de partícula da proteína, através deles observa-se que os picos mais intensos são os mesmos para as diferentes proteínas, e que as proteínas que apresentam interações mais intensas são a 1EIN e 1EIN_hybrid, que são bastantes semelhantes entre si.

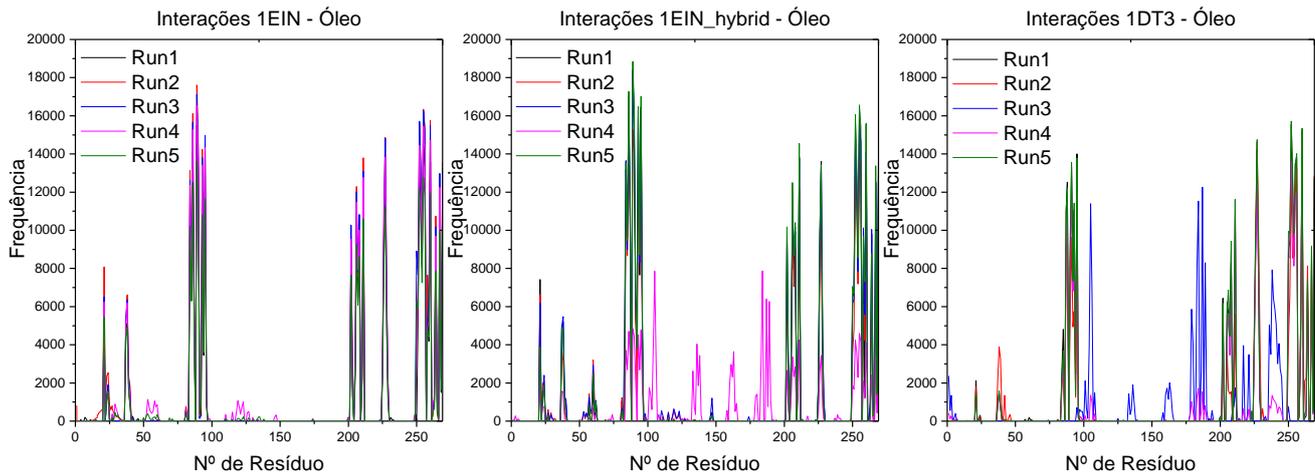


Figura 23 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com o óleo para cada sistema TOG/Água.

Para tornar a análise mais facilitada, destas interações foram selecionadas como mais importantes aquelas em que a frequência é superior a 10000, o que significa que foram selecionados como resíduos mais importantes aqueles que interagiram mais de 50% do tempo total de simulação. O gráfico da Figura 24 representa os resíduos selecionados para cada um dos sistemas, em que a frequência representa o número de vezes que cada resíduo se repete entre os 5 replicados. Os resíduos selecionados são praticamente os mesmos para os três sistemas, no entanto têm intensidades diferentes. A proteína 1EIN é aquela que interage mais com o óleo e a 1DT3 é a que interage menos. A proteína 1DT3 ainda apresenta dois picos embora pouco intensos que as restantes duas proteínas não apresentam. Os resíduos identificados são os resíduos de 84 a 96, que correspondem a maior parte dos resíduos constituintes do lid, 204 a 211, 226 e 227, 252 a 269, que inclui a histidina 258 que pertence ao trio catalítico do centro ativo da proteína, no caso da 1DT3 temos ainda o resíduo 105, 184 e 187. Todos estes resíduos estão caracterizados na Tabela 7, para todos os sistemas em estudo, os resíduos que mais interagem com o óleo são apolares, o que faz sentido uma vez que o óleo também é apolar.

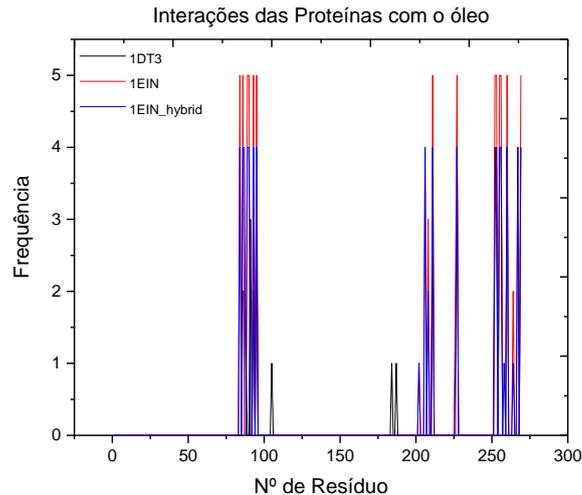


Figura 24 - Gráfico-resumo dos resíduos mais importantes (que mais se repetem nos diferentes replicados) para cada sistema em estudo.

Tabela 7 - Caracterização dos resíduos mais importantes (identificados na Figura 24) quanto ao tipo de aminoácido.

Proteína	Resíduos Apolares	Resíduos Polares	Resíduos Aromáticos	Resíduos Positivos	Resíduos Negativos	Total
1DT3	86ILE ²	252ILE ⁴	88ASN	95PHE ³	-	87GLU ²
	91GLY ³	253PRO ³	105SER	184PHE		
	93LEU ²	255ILE ⁴	226THR	211PHE ³		
	187VAL	256PRO ⁴		260TRP ⁴		
	227LEU ⁴	269LEU ⁴				
1EIN	86ILE ⁵	252ILE ⁵	226THR ²	89TRP ⁵	84ARG ⁵	-
	90ILE ⁵	253PRO ⁵	267THR ⁴	95PHE ⁵		20
	93LEU ⁵	255ILE ⁵		211PHE ⁵		
	202ILE	256PRO ⁵		260TRP ⁵		
	206LEU ⁴	264LEU ²				
	208PRO ³	269LEU ⁵				
1EIN_hybrid	86ILE ⁴	252ILE ³	87THR ⁴	89TRP ⁴	84ARG ⁵	-
	90ILE ⁴	253PRO ⁴	267THR ⁴	95TYR ⁴	258HIS	
	93LEU ⁴	255ILE ⁴		211PHE ⁴		21
	202ILE	256PRO ⁴		260TRP ⁴		
	206LEU ⁴	264LEU				
	208PRO ²	269LEU ⁴				
	227LEU ⁴					

Nota: ²aminoácido identificado como mais importante em dois replicados. ³aminoácido identificado como mais importante em três replicados. ⁴aminoácido identificado como mais importante em quatro replicados. ⁵aminoácido identificado como mais importante nos cinco replicados. **Aminoácido pertence ao lid.** **Aminoácido pertence ao centro ativo.**

3.1.1.4. Caracterização dos ácidos gordos no processo de interação do centro ativo da proteína com o óleo

Esta análise foi realizada recorrendo ao *gmx select*, e permite identificar a frequência de interação dos TOG com o centro ativo da proteína, que é onde na realidade ocorre a reação. Os gráficos da Figura 25 são o resultado desta análise, para cada um dos sistemas em estudo. Não é observável nenhum tipo de relação direta nos TOG dos diferentes replicados ou até sistemas, pelo que dá a entender que os TOG que interagem com o centro ativo da proteína são fruto de algum acaso, ou da sua posição próxima ao mesmo, não estando por isso dependentes ou restringidos à sua conformação inicial.

A frequência de interação para os TOG com o centro ativo da proteína 1DT3 é muito baixa relativamente às proteínas 1EIN e 1EIN_hybrid, o que pode ser explicado com base no impedimento do centro ativo provocado pelo lid da proteína, e para além disto, a Run3 não apresentou interações entre os TOG e o centro ativo.

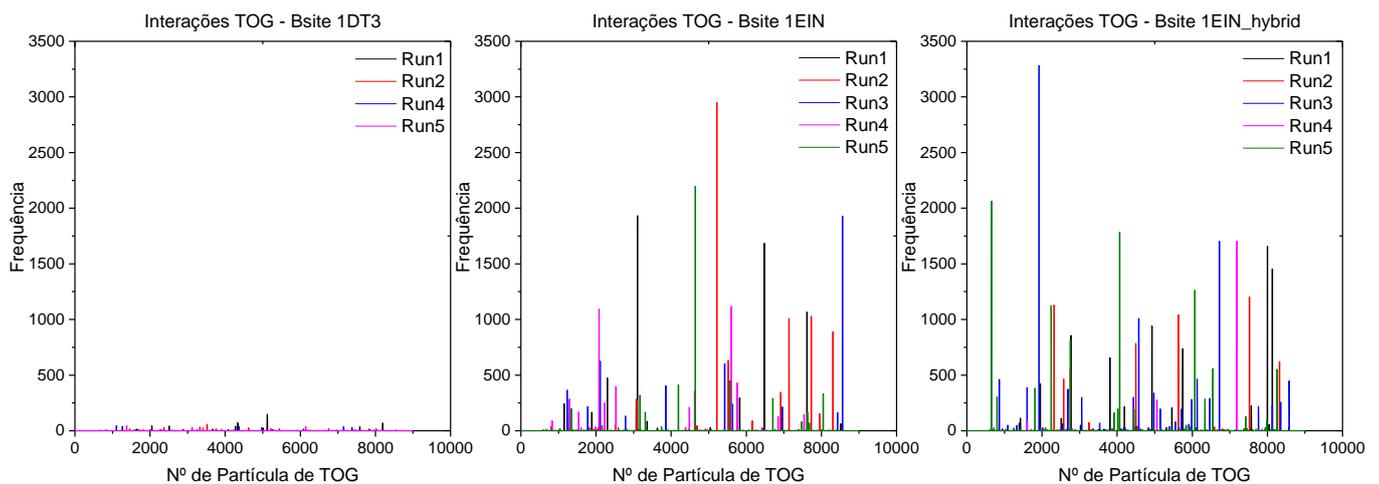


Figura 25 - Frequência de interação dos triglicerídeos do óleo com o centro ativo (Bsite) da proteína nos diferentes sistemas TOG/Água.

3.1.1.5. Caracterização dos resíduos da proteína que contribuem para a interação dos triglicerídeos com o centro ativo da proteína

Com base na análise anterior (secção 3.1.1.4.) foram selecionados os TOG que interagiram mais de 1% do tempo de simulação com o trio catalítico da proteína (uma percentagem que permite remover frequências insignificantes para o estudo), de seguida recorreu-se novamente à ferramenta *gmx select* para identificar quais os resíduos da proteína que interagem com os TOG selecionados. Esta análise permite-nos identificar os resíduos da proteína que contribuem para a

chegada dos triglicerídeos do óleo ao centro ativo da proteína. Os gráficos abaixo representam o resultado desta análise. O sistema da proteína 1DT3 não apresentou triglicerídeos a interagir mais de 1% do tempo, pelo que foi descartado desta análise.

Os dois sistemas da Figura 26 apresentam os mesmos picos, o que já tem vindo a ser habitual nestes sistemas ao longo das análises, no entanto, de forma geral são ligeiramente mais intensos na proteína 1EIN_hybrid, o que significa que interagiu mais com os TOG. Os picos que as proteínas apresentam são exatamente os mesmos picos que foram considerados como resíduos mais importantes em 3.3., representam o lid, os resíduos próximos do lid na superfície da proteína e a histidina pertencente ao trio catalítico.

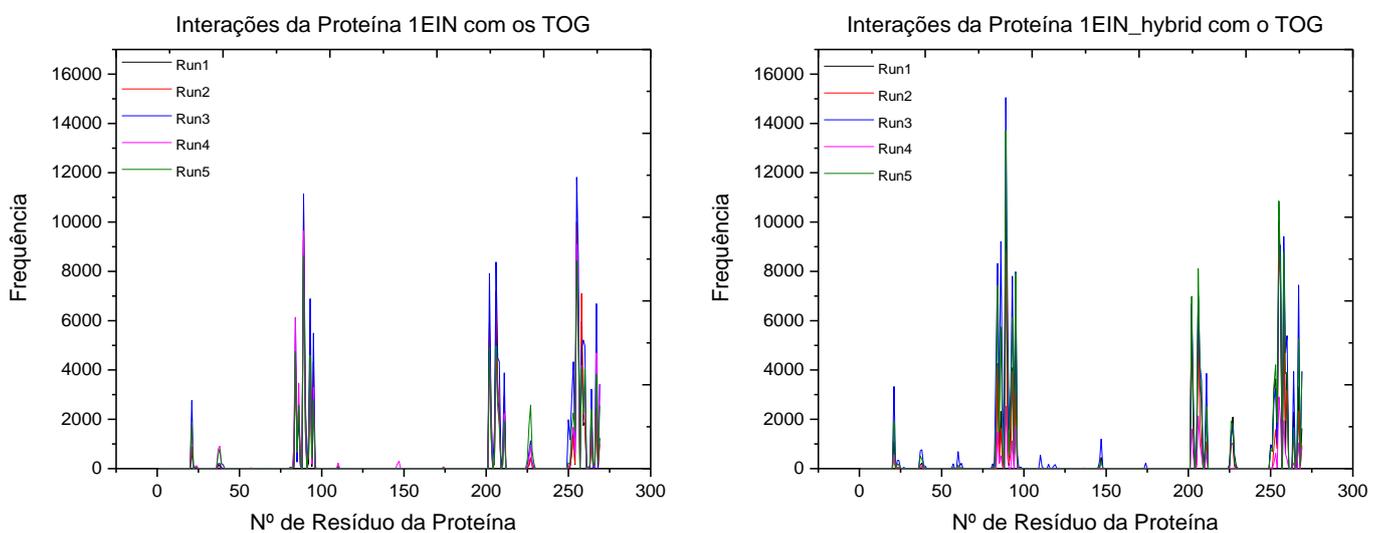


Figura 26 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com os triglicerídeos que mais interagiram com o centro ativo da proteína.

3.1.2. Novos Sistemas Óleo/Água

3.1.2.1. Caracterização e Validação das Novas Caixas de Óleo

Após analisar os resultados para os três sistemas bifásicos estudados, selecionou-se as proteínas que demonstraram maior eficácia, isto é, que interagiram mais com o óleo. Estas proteínas foram usadas em novos sistemas bifásicos. Estes sistemas bifásicos óleo/água contêm caixas de óleo diferentes, que tentam reproduzir os óleos em estudo: óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. As simulações para estes sistemas foram corridas a 25 °C e a 60 °C.

De entre os diferentes constituintes destas caixas de óleo, temos a tripalmitina (TPG) constituída por três cadeias de ácido palmítico, que a 25 °C se apresenta no estado sólido,

apresentando-se claramente no estado líquido aos 60 °C, pelo que a conformação dos seus triglicerídeos não é a mesma nas duas temperaturas, tal como é possível observar na Figura 27.⁷⁵

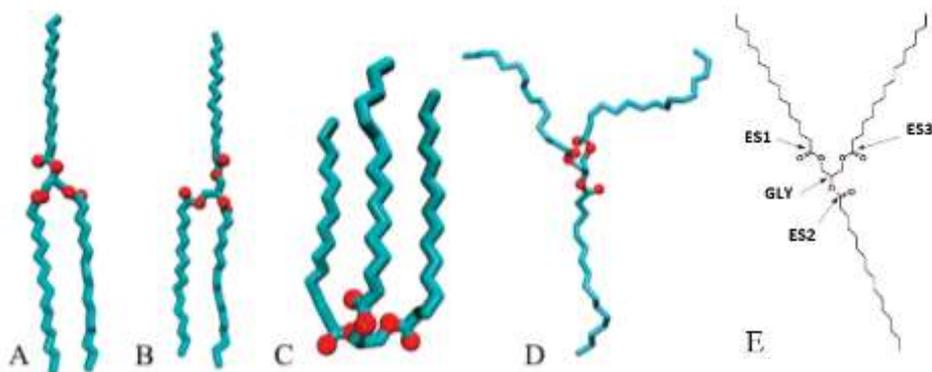


Figura 27 - Exemplos de conformações moleculares da tripalmitina. A, B e C verificam-se no estado sólido ou gel, D verifica-se no estado líquido. Adaptado de Hall, A..⁷⁵

Após a construção e simulação das caixas de solvente, analisou-se os ângulos dos triglicerídeos presentes, para validar os modelos de caixas de óleo e avançar para as simulações com as proteínas. Os gráficos da Figura 28 representam a ângulo ES1-GLY-ES3 (Figura 27E) da tripalmitina e da trioleína a 25 °C e a 60 °C. Após uma primeira simulação a 60°C percebeu-se que o ângulo em estudo para o TPG não tinha alterado em relação aos 25 °C, o que não fazia sentido uma vez que estava comprovado tanto na literatura como em laboratório que a esta temperatura, a tripalmitina estaria no estado líquido e por isso a sua conformação seria semelhante á da trioleína, tal como é possível observar na imagem 25D. Estaríamos perante um problema do campo de forças usado. Desta forma, foi necessário alterar o valor deste ângulo que era de 60° para 110° (com base numa parametrização feita no grupo Colling) no próprio ficheiro itp⁵⁶. Após nova análise observou-se que este ângulo se sobrepõe ao da trioleína, que era o esperado para o óleo no estado líquido.

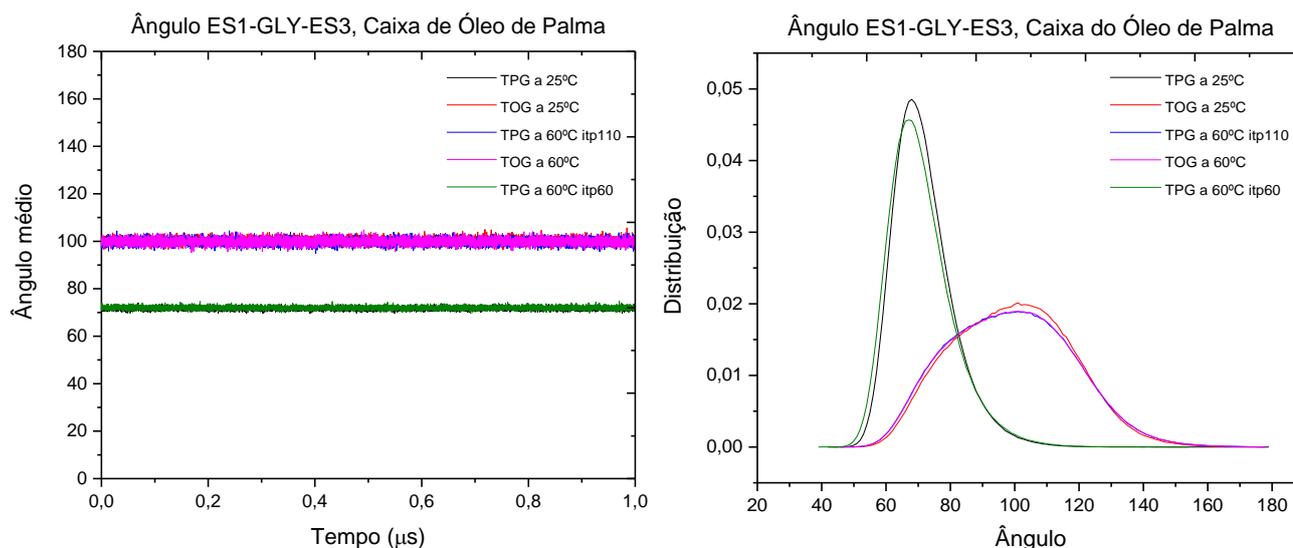
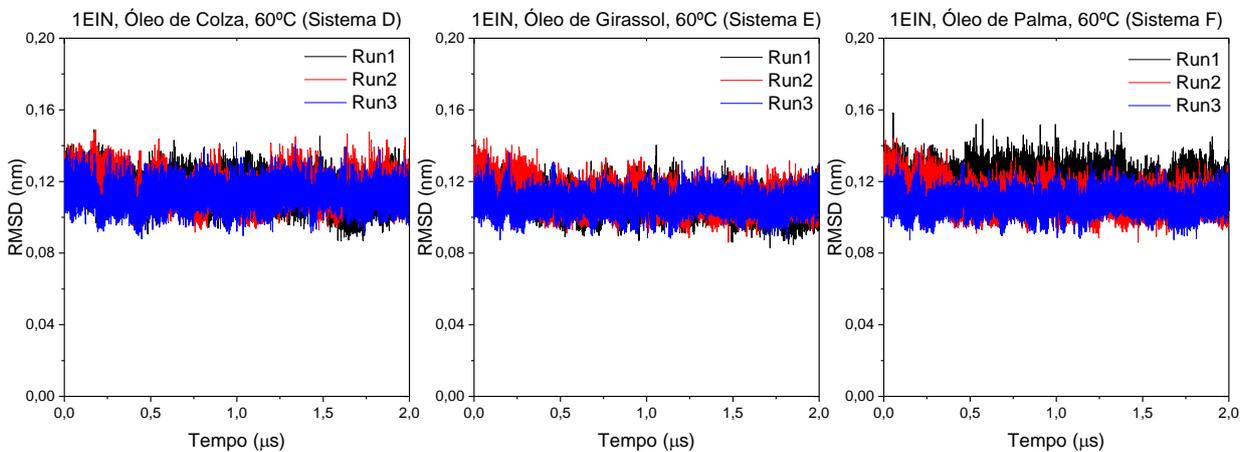
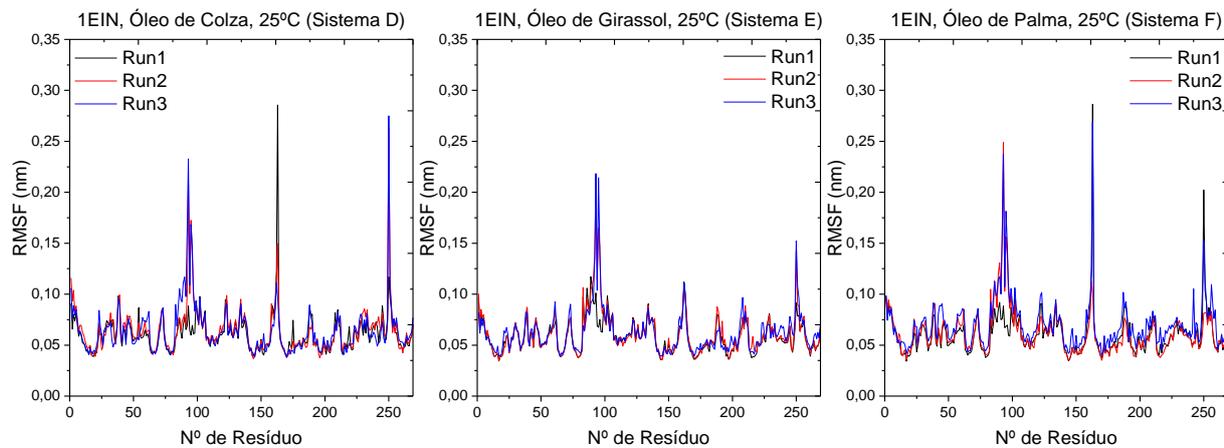
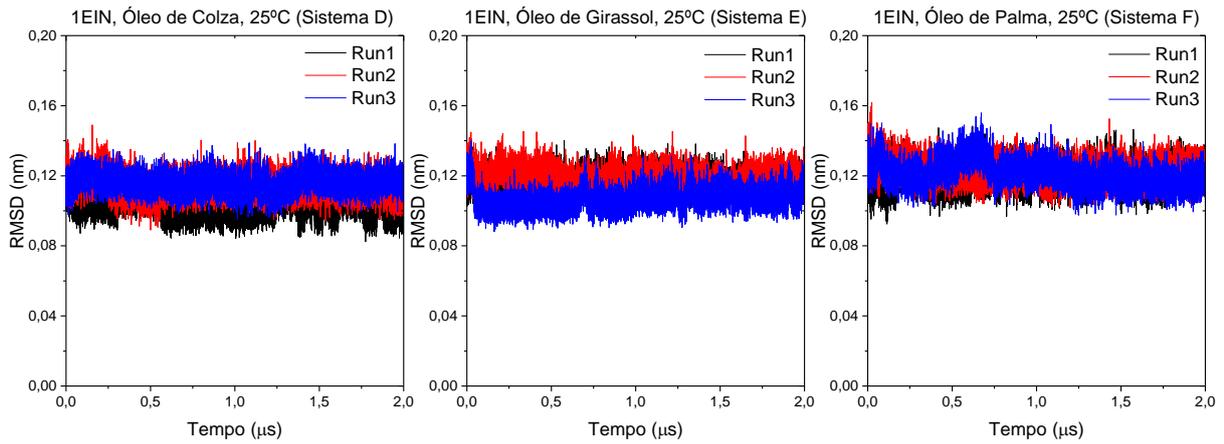


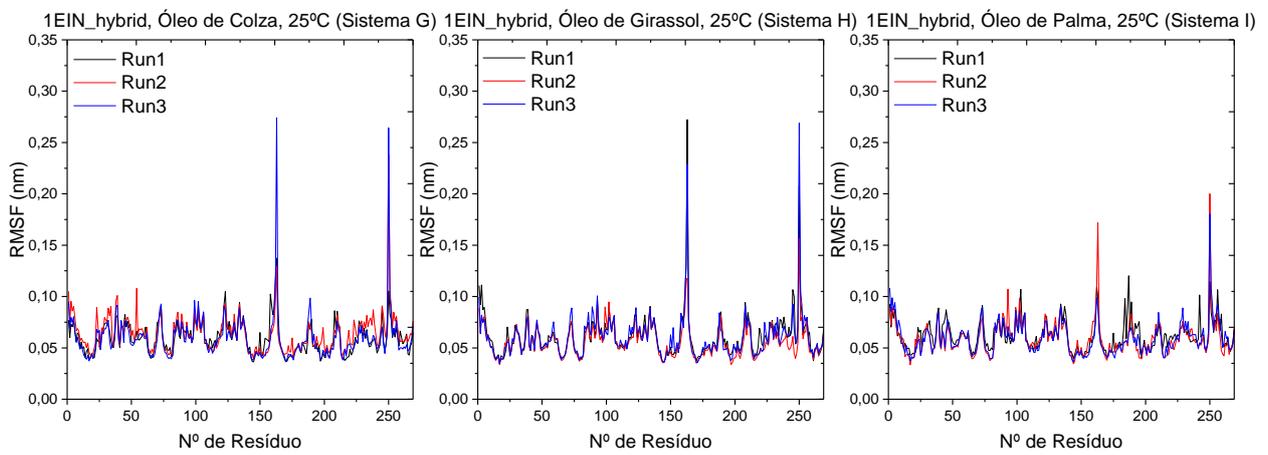
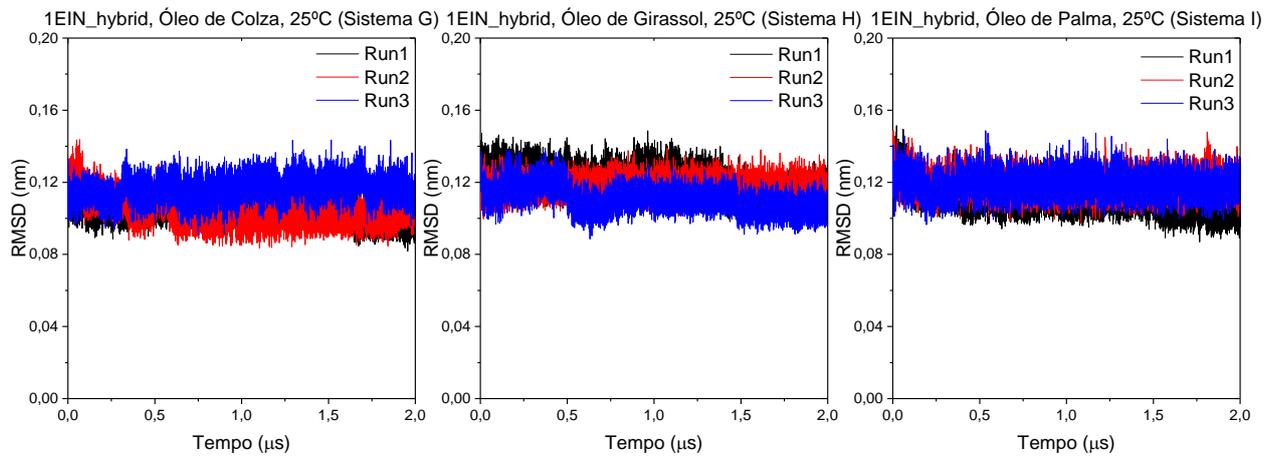
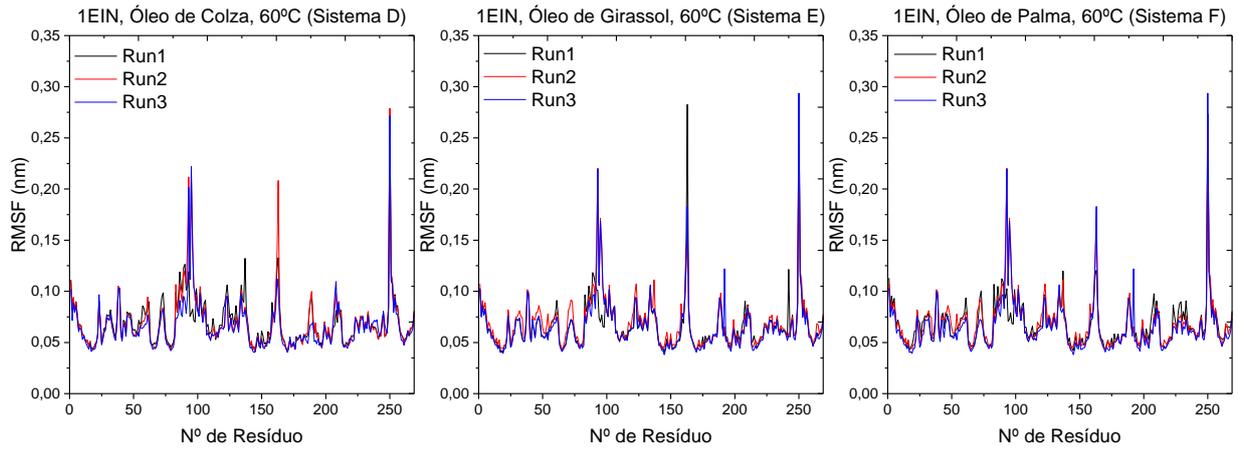
Figura 28 - Comportamento do ângulo ES1-GLY-ES3 da tripalmitina e trioleína à temperatura de 25 °C e 60 °C.

3.1.2.2. Análise da estabilidade estrutural das proteínas nos novos sistemas

A estabilidade estrutural dos sistemas foi analisada através dos RMSD e RMSF. De forma geral, observa-se através dos gráficos da Figura 29, que os replicados de cada sistema se encontram sobrepostos, o que significa que podemos esperar a mesma estabilidade para os diferentes replicados. No que diz respeito aos RMSD, os gráficos são todos estáveis, os pequenos desvios observáveis, tendo em conta a escala usada são insignificantes, e por isso podemos assumir que a estrutura da proteína não foi alterada ao longo da simulação relativamente à estrutura original, o que mais uma vez já seria de esperar devido à utilização de uma rede elástica na parametrização das proteínas.

Relativamente ao RMSF, todos os sistemas da proteína 1EIN (sistemas D, E e F) apresentam as mesmas zonas mais flexíveis que se situam nos resíduos 82-98, 150-175 e ≈ 250 , à exceção do sistema E (óleo de girassol) a 25 °C que não apresenta a região de 150-175. Os sistemas da proteína 1EIN_hybrid (sistemas G, H e I) apresentam como zonas mais flexíveis os resíduos 150-175 e ≈ 250 , à exceção do sistema I (óleo de palma) a 60 °C que apenas apresenta um pico destacado a ≈ 250 . A região de resíduos 82-98 corresponde ao lid da proteína, e o facto de ser mais móvel na 1EIN, pode ser explicado com base na mutação feita nessa zona que deu origem à 1EIN_hybrid, o objetivo da mutação era manter o centro ativo o mais desimpedido possível e por isso mudou-se a região do lid, para que ele se mantenha apenas na posição aberta, retirando assim alguma mobilidade a esta região. Os resíduos 150-175 correspondem a uma região entre duas hélices, que já é tipicamente considerada móvel. A região de resíduos a ≈ 250 parece ser um loop de folha β , tal como demonstrado em 3.1.1.1.





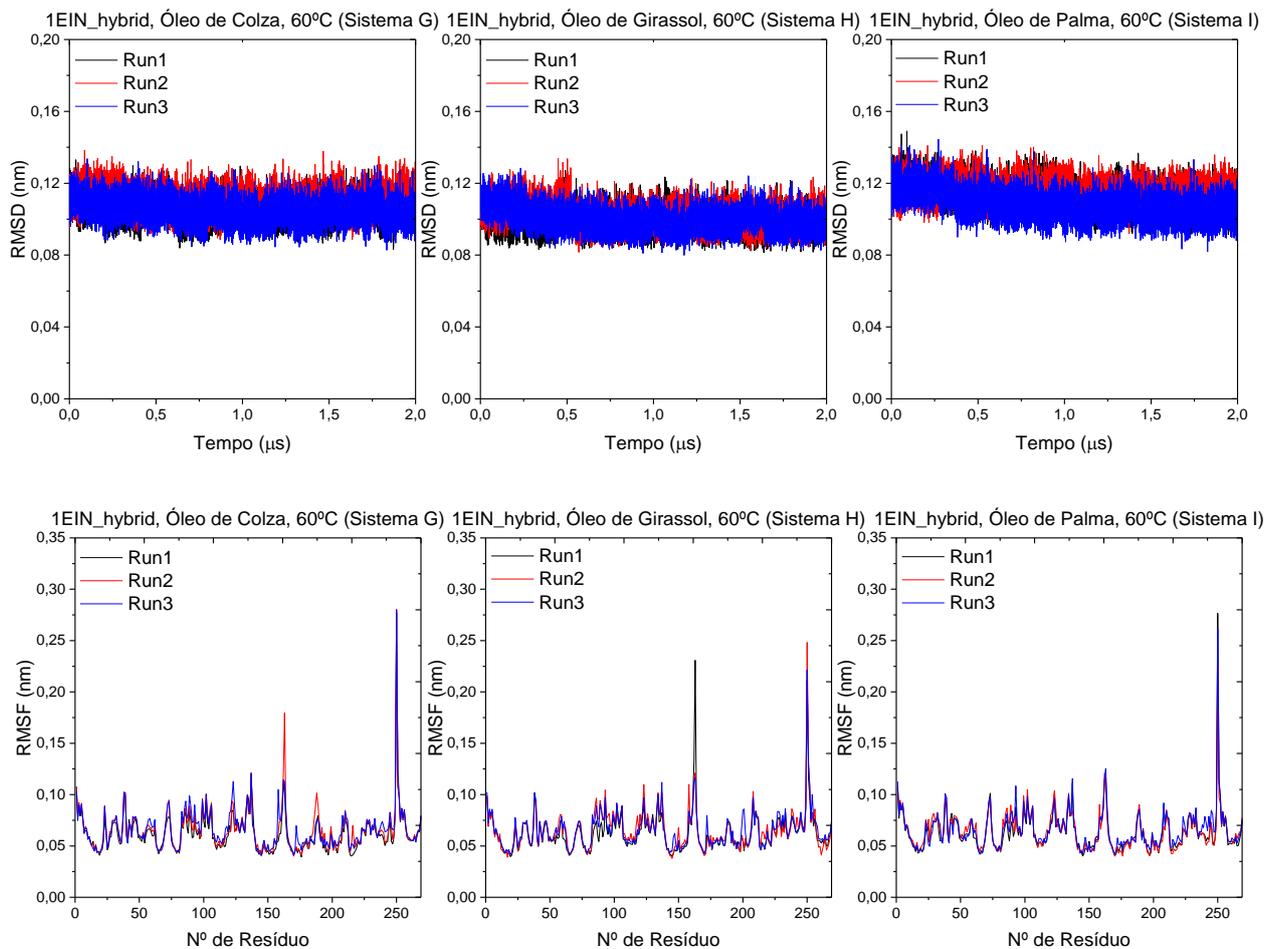


Figura 29 - RMSD e RMSF dos sistemas óleo de colza/água, óleo de girassol/água e óleo de palma/água com as proteínas 1EIN e 1EIN_Hybrid.

3.1.2.3. Caracterização do processo de ligação da proteína à interface óleo/água

3.1.2.3.1. Distância da proteína ao COM do óleo

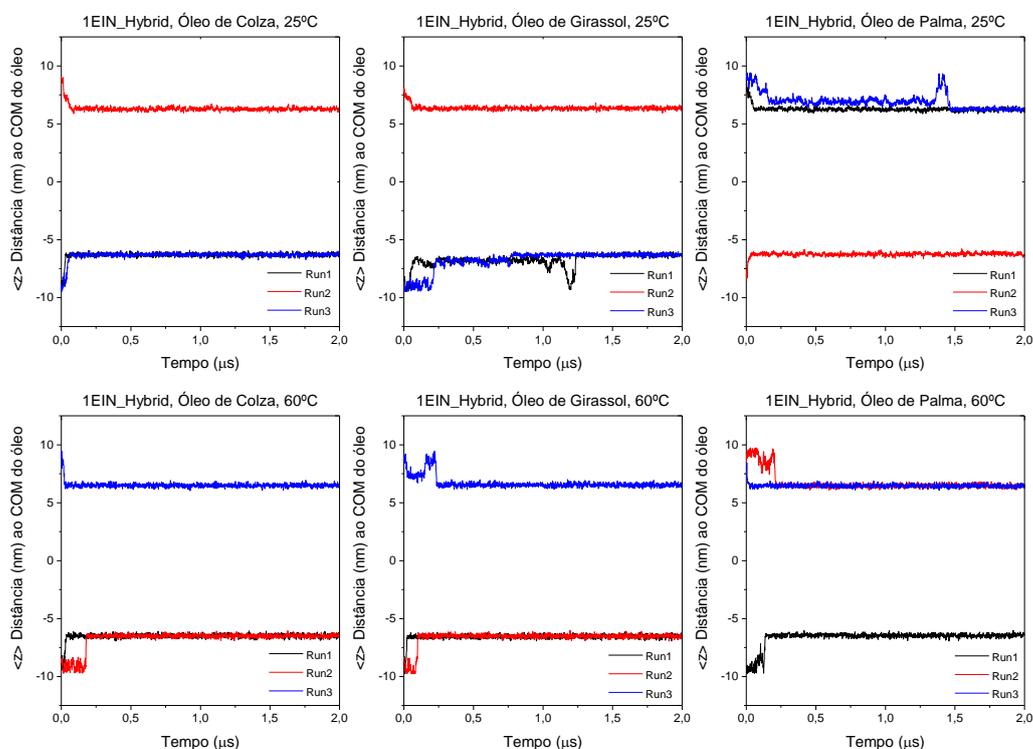


Figura 30 - Distância da proteína 1EIN_hybrid ao centro de massa do óleo ao longo do tempo.

Através das Figuras 30 e 31, observa-se que há valores negativos de distâncias, isto deve-se à condição de fronteira periódica e deve-se assumir o valor de distância em módulo. Analisando os gráficos, pode-se concluir de forma geral, que após estabilização da proteína durante a simulação, esta situa-se, à semelhança do que acontece em 3.1.1.2.1., a aproximadamente 7nm do centro de massa do óleo, que corresponderá à sua posição estável na interface óleo/água. Em alguns sistemas, é possível observar que houve bastante instabilidade no início da simulação devido à variação das distâncias assumidas, como é o caso da proteína 1EIN em óleo de colza a 25°C e a 60°C e óleo de girassol a 25°C. Na proteína 1EIN_hybrid já não é tão flagrante este facto, uma vez que a instabilidade dura menos tempo e não é observada em todos os replicados de um mesmo sistema. Por outro lado, nos sistemas com a proteína 1EIN_hybrid, observa-se que esta não é sempre tão estável quando se encontra na interface óleo/água, pois existem algumas pequenas variações de distâncias em óleo de girassol e óleo de palma a 25°C.

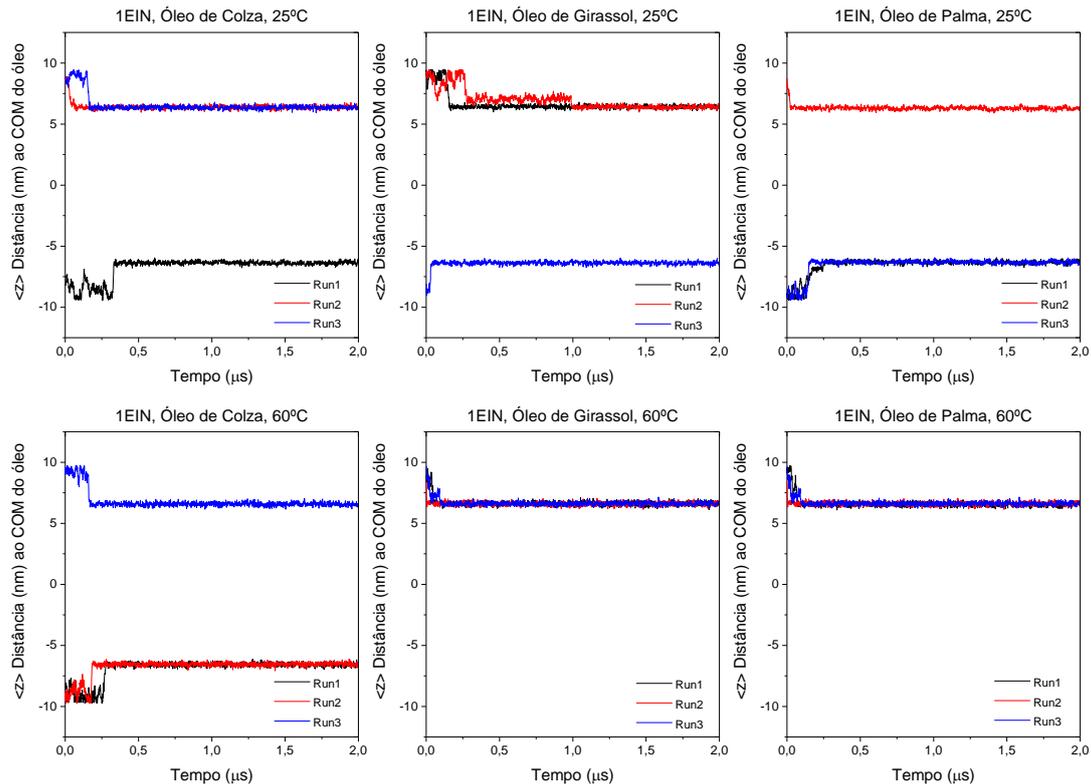


Figura 31 - Distância da proteína 1EIN ao centro de massa do óleo ao longo do tempo.

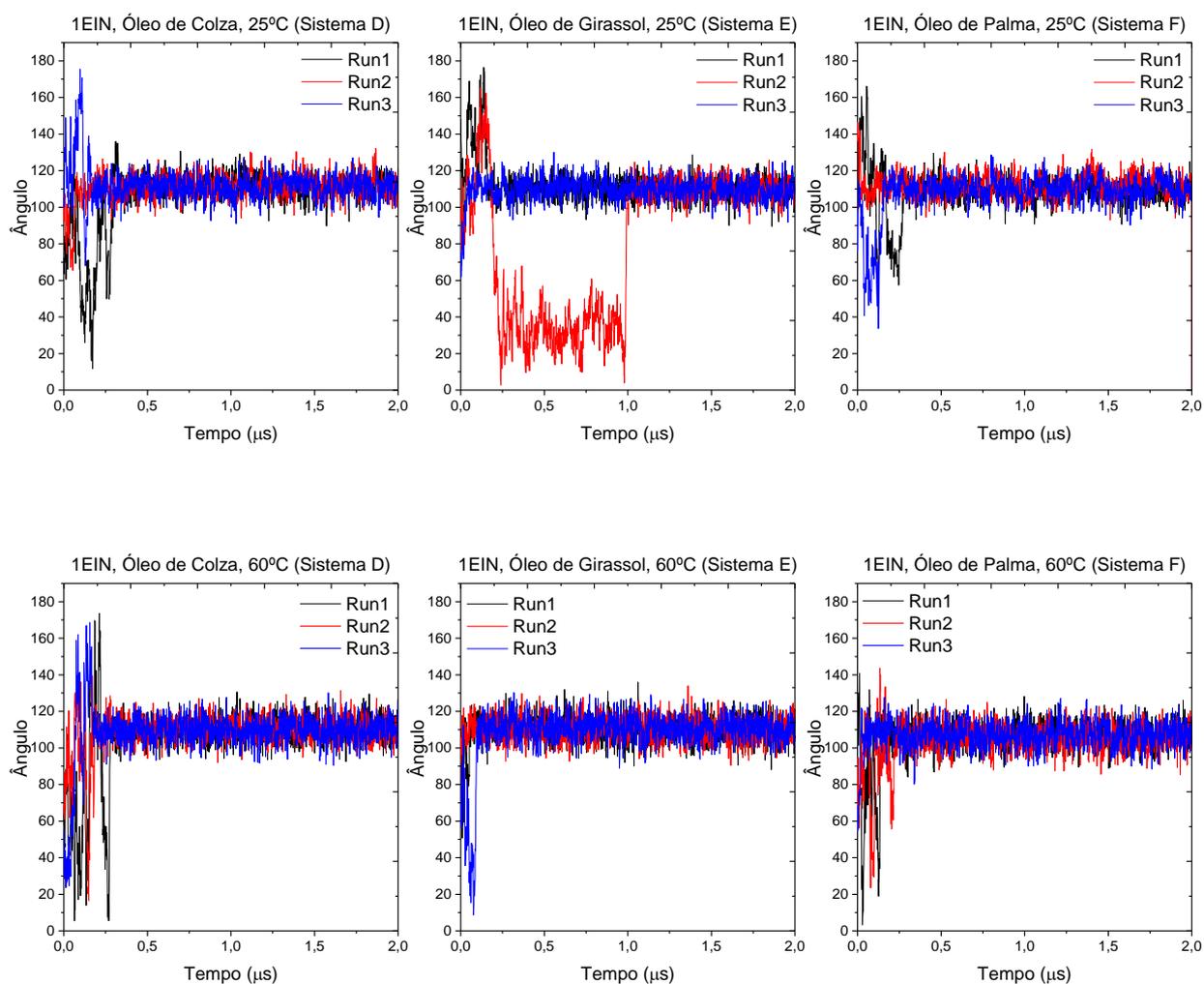
3.1.2.3.2. Orientação das proteínas em relação à interface óleo/água

Tal como na secção 3.1.1.2.2., recorreu-se ao uso da ferramenta *gmx bundle* e à visualização das trajetórias para estudar a orientação das proteínas. O vetor escolhido foi mais uma vez o lid da proteína.

De acordo com os resultados da Figura 32, nos sistemas D (óleo de colza/água com a proteína 1EIN) a 25 °C e 60 °C, F (óleo de palma/água com proteína 1EIN) a 25 °C e 60 °C, E (óleo de girassol/água com a proteína 1EIN) a 60°C, G (óleo de colza/água com a proteína 1EIN_Hybrid) a 25 °C e 60 °C, e H (óleo de girassol/água com proteína 1EIN_Hybrid) a 60 °C, os diferentes replicados adotam todos o mesmo comportamento. Assim que as proteínas se mantêm estáveis na interface óleo/água, o ângulo entre o vetor e o eixo z perpendicular à interface toma o valor de 110°. Nos restantes sistemas alguns replicados adotam o ângulo 75° durante a simulação (Run2 do sistema óleo de palma/água com a proteína 1EIN_Hybrid a 60 °C), outros adotam 110°, e outros têm variações. O ângulo 75° já tinha sido evidência em 3.1.1.2.2..

Os replicados que apresentam comportamentos mais incomuns/instáveis (devido às bruscas oscilações de ângulos) são Run2 do sistema óleo de girassol/água com a proteína 1EIN a 25 °C, Run1 e Run3 do sistema do sistema óleo de girassol/água com a proteína 1EIN_Hybrid a 25 °C e Run3 do sistema óleo de palma/água com a proteína 1EIN_Hybrid a 25 °C, e podem ser

explicados recorrendo à visualização das trajetórias. Na Run2 do sistema óleo de girassol/água com a proteína 1EIN e na Run1 do sistema óleo de girassol/água com proteína 1EIN_Hybrid a 25 °C a proteína inicialmente dirige-se para a interface criada pela condição de fronteira periódica onde interage um pouco e depois acaba por se dirigir e ficar a interagir na interface em estudo. Nas Run3 do sistema óleo de girassol/água com proteína 1EIN_Hybrid e do sistema óleo de palma/água com a proteína 1EIN_Hybrid a 25 °C, a proteína dirige-se para a interface óleo/água, no entanto não interage logo com os resíduos do centro ativo, pelo que até encontrar estabilidade e interagir com esses resíduos, acaba por assumir outra posição e rodar bastante.



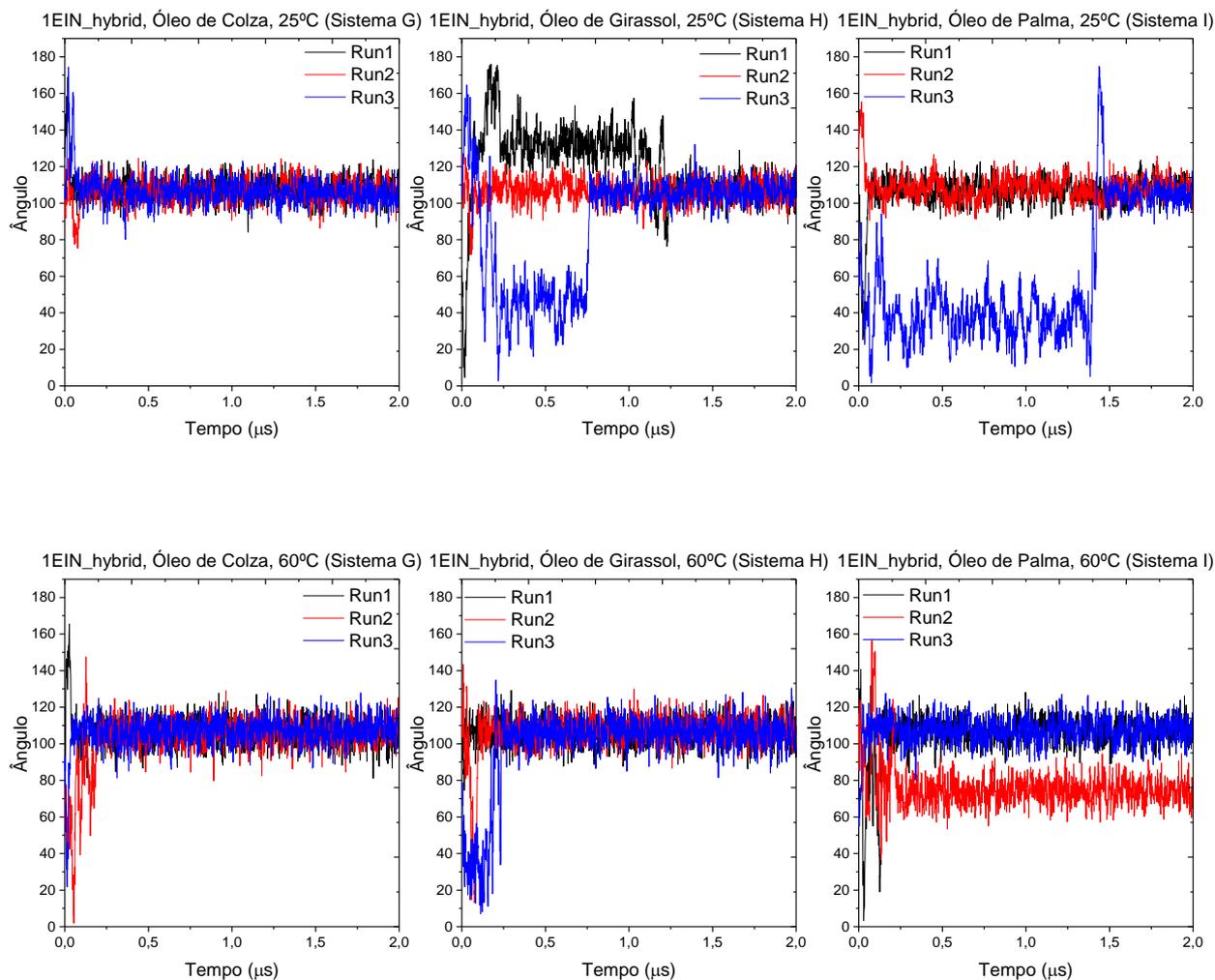


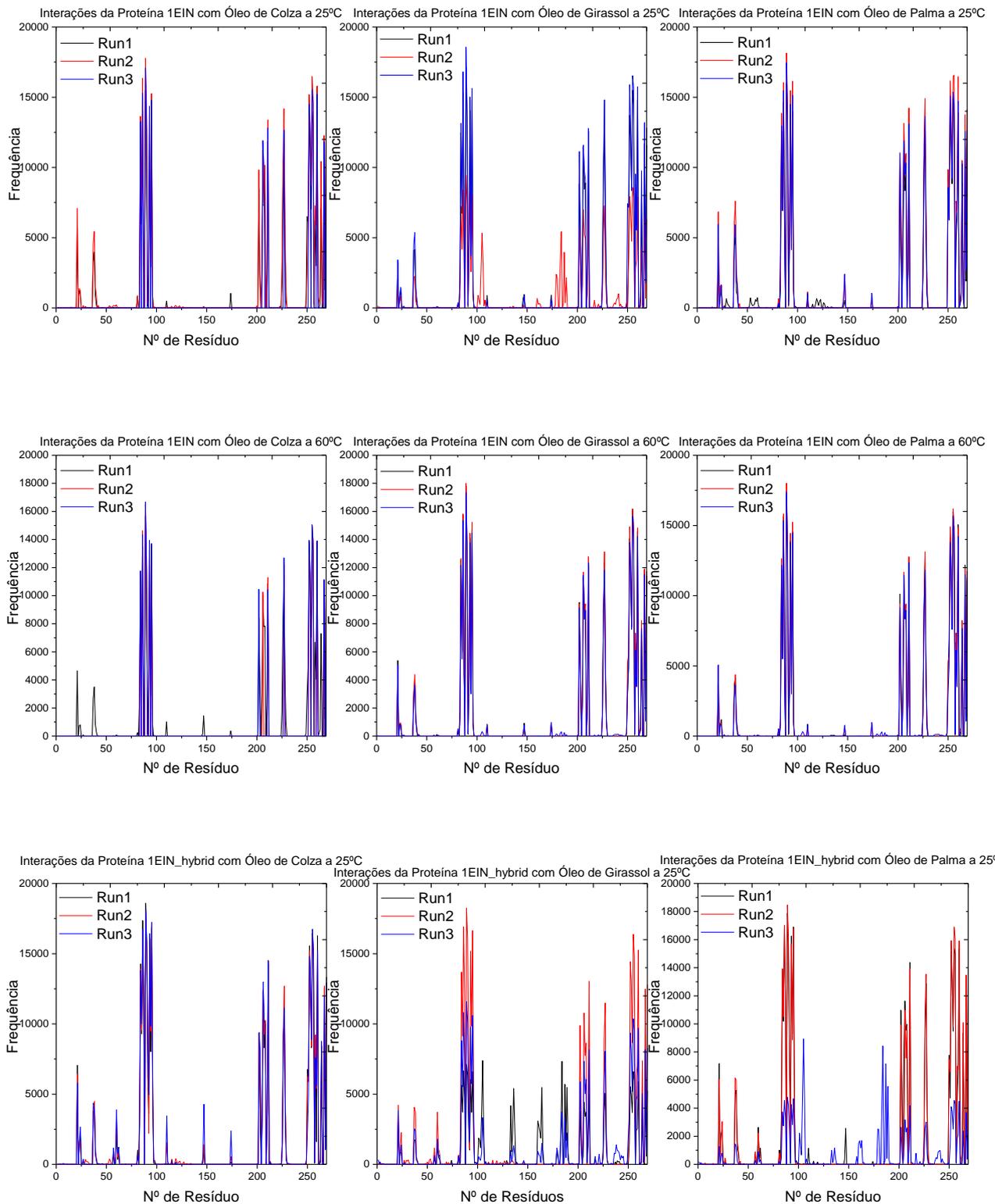
Figura 32 - Ângulo formado pelo vetor da proteína e o eixo z da interface óleo/água em função do tempo de simulação para cada sistema em estudo.

De forma geral, os diferentes sistemas apresentam comportamentos semelhantes entre si, e da mesma forma, semelhantes aos dos sistemas TOG/água.

3.1.2.4. Caracterização dos resíduos mais importantes na interação das proteínas com o óleo

Mais uma vez recorreu-se à ferramenta *gmx select* para obter as interações dos resíduos da proteína com o óleo. Os resultados apresentam-se nos gráficos da Figura 33. Mais uma vez, verifica-se que o comportamento das proteínas 1EIN e 1EIN_hybrid é muito semelhante. Estas proteínas apresentam quase sempre os mesmos resíduos a interagir com o óleo, independentemente do tipo de óleo usado. Tendo em conta que a TLL é uma proteína amplamente

usada e descrita na literatura,^{76,47,77} incluindo algumas aplicações industriais, este resultado é positivo, no sentido em que indica que não há nenhum tipo de óleo que seja menos eficaz na interação com as proteínas.



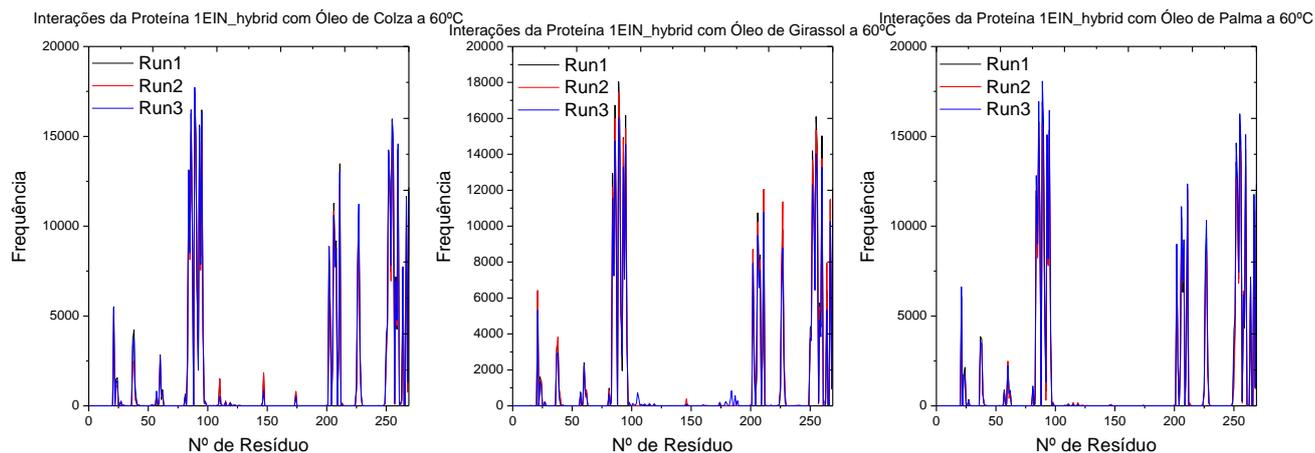


Figura 33 - Frequência de interação com o óleo dos resíduos da proteína para cada sistema em estudo.

Para facilitar o estudo destas interações, foram mais uma vez selecionados os resíduos que interagem mais de 50% do tempo de simulação. Os resultados apresentam-se nos gráficos abaixo, em que a frequência é expressa de 1 a 3 consoante o número de vezes que um resíduo se repete nos 3 sistemas replicados. Através dos resultados da Figura 34, observa-se que os resíduos são praticamente os mesmos para as duas proteínas, no entanto a 1EIN_hybrid apresenta alguns aminoácidos a interagir que a 1EIN não apresenta. Os resíduos destacados são os mesmos do que em 3.4. (84-95, 202-211, 226, 227, 250-269) à exceção dos novos picos apresentados na proteína 1EIN_hybrid para o óleo de girassol a 25°C, que são os resíduos 105, 136, 163 e 187-189. No entanto, como é possível observar, estes resíduos apenas estão presentes num dos replicados. Todos os resíduos destacados na Figura 34 estão caracterizados na Tabela 8.

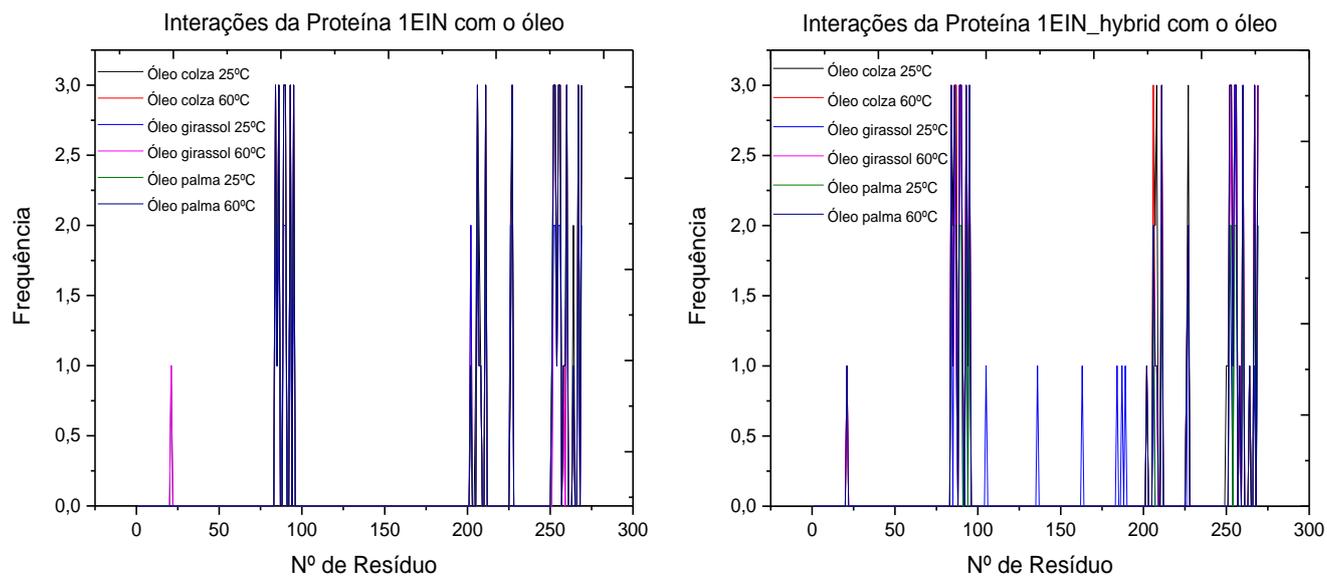


Figura 34 - Gráfico-resumo dos resíduos mais importantes (que mais se repetem nos diferentes replicados) para cada sistema em estudo.

Tabela 8 - Caracterização dos resíduos mais importantes (identificados na Figura 34) quanto ao tipo de aminoácido.

Proteína	Resíduos Apolares	Resíduos Polares	Resíduos Aromáticos	Resíduos Positivos	Resíduos Negativos	Total	
1EIN, óleo de colza, 25°C	86ILE ³	227LEU ³				27	
	90ILE ³	252ILE ³					
	93LEU ³	253PRO ³	85SER ³	21TYR	84ARG		
	202ILE	255ILE ³	226THR ²	89TRP ³	205ARG		254ASP
	206LEU ³	256PRO ³	251ASN	95PHE ³	258HIS		
	207PRO ²	264LEU ²	267THR ³	211PHE ³			
	208PRO	269LEU ³		260TRP ³			
1EIN, óleo de colza, 60°C	86ILE ³	227LEU ³				24	
	90ILE ³	252ILE ³					
	93LEU ³	253PRO ³	85SER	89TRP ³	84ARG ³		
	202ILE ²	255ILE ³	226THR	95PHE ³	258HIS		254ASP
	206LEU ²	256PRO ³	267THR	211PHE ³			
	207PRO	264LEU ³		260TRP ³			
	208PRO	269LEU ³					
1EIN, óleo de girassol, 25°C	86ILE ²	252ILE ²				26	
	90ILE ²	253PRO ²					
	93LEU ²	255ILE ²	85SER	89TRP ²	84ARG ²		
	202ILE ²	256PRO ²	226THR ²	95PHE ²	258HIS		254ASP
	206LEU ²	259LEU	92ASN	211PHE ²	87GLU		
	207PRO	264LEU	267THR ²	260TRP ²			
	208PRO	269LEU ²					
1EIN, óleo de girassol, 60°C	86ILE ³	227LEU ³				25	
	90ILE ³	252ILE ³					
	93LEU ³	253PRO ³	85SER	89TRP ³	84ARG ³		
	202ILE	255ILE ³	226THR	95PHE ³	258HIS		254ASP
	206LEU ³	256PRO ³	267THR ³	21TYR			
	207PRO	264LEU		211PHE ³			
	208PRO	269LEU ³		260TRP ³			
1EIN, óleo de palma, 25°C	86ILE ³	252ILE ³				26	
	90ILE ³	253PRO ³					
	93LEU ³	255ILE ³	85SER	89TRP ³	84ARG ³		
	202ILE	256PRO ³	226THR	95PHE ³	258HIS		254ASP
	206LEU ³	259LEU	267THR ³	211PHE ³			
	207PRO	264LEU	251ASN	260TRP ³			
	208PRO	269LEU ³					
1EIN, óleo de palma, 60°C	86ILE ³	252ILE ³				26	
	90ILE ³	253PRO ³					
	93LEU ³	255ILE ³	85SER	89TRP ³	84ARG ³		
	202ILE	256PRO ³	226THR	95PHE ³	258HIS		254ASP
	206LEU ³	259LEU	267THR ³	211PHE ³			
	207PRO	264LEU	251ASN	260TRP ³			
	208PRO	269LEU ³					
1EIN_hybrid, óleo de colza, 25°C	86ILE ³	227LEU ³				30	
	90ILE ³	250PRO					
	91LEU	252ILE ³	85SER ²	21TYR	84ARG ³		
	93LEU ³	253PRO ³	87THR ³	89TRP ³	258HIS		254ASP
	202ILE	255ILE ³	94ASN	95TYR ³			
	206LEU ³	256PRO ³	226THR	211PHE ³			
	207PRO ²	264LEU	251ASN	260TRP ³			

1EIN_hybrid, óleo de colza, 60°C	208PRO ³	269LEU ³					
	86ILE ³	227LEU ²					
	90ILE ³	252ILE ³					
	91LEU	253PRO ³	85SER	21TYR			
	93LEU ³	255ILE ³	87THR ³	89TRP ³	84ARG ³	254ASP	28
	202ILE	256PRO ³	94ASN	95TYR ³	258HIS		
	206LEU ³	264LEU	226THR	211PHE ³			
207PRO	269LEU ³	267THR ³	260TRP ³				
208PRO							
1EIN_hybrid, óleo de girassol, 25°C	86ILE ³	227LEU ²					
	90ILE ³	252ILE ²					
	93LEU ²	253PRO	87THR	95TYR ³			
	136PRO	255ILE ³	105SER	89TRP ³	84ARG ²	-	23
	163GLY	256PRO ²	189THR	184PHE			
	187VAL	269LEU ²	267THR	211PHE ²			
	206LEU			260TRP ²			
1EIN_hybrid, óleo de girassol, 60°C	86ILE ³	227LEU ²					
	90ILE ³	252ILE ²					
	91LEU	253PRO ³	85SER	21TYR			
	93LEU ³	255ILE ³	87THR	89TRP ³	84ARG ³	254ASP	28
	202ILE	256PRO ³	94ASN	95TYR ³	258HIS		
	206LEU ²	264LEU	226THR	211PHE ³			
	207PRO	269LEU ³	267THR ³	260TRP ³			
208PRO							
1EIN_hybrid, óleo de palma, 25°C	86ILE ²	252ILE ²					
	90ILE ²	253PRO ²	85SER ²	89TRP ²			
	93LEU ²	255ILE ²	87THR ²	95TYR ²	84ARG ²	-	21
	202ILE	256PRO ²	226THR	211PHE ²			
	206LEU ²	264LEU	267THR ²	260TRP ²			
	227LEU ²	269LEU ²					
	208PRO						
1EIN_hybrid, óleo de palma, 60°C	86ILE ³	227LEU ²					
	90ILE ³	252ILE ³					
	91LEU	253PRO ³	85SER	21TYR			
	93LEU ³	255ILE ³	87THR ²	89TRP ³	84ARG ³	254ASP	28
	202ILE	256PRO ³	94ASN	95TYR ³	258HIS		
	206LEU ²	264LEU	226THR	211PHE ³			
	207PRO	269LEU ³	267THR ³	260TRP ³			
208PRO							

Nota: ²aminoácido identificado como mais importante em dois replicados. ³aminoácido identificado como mais importante nos três replicados. Aminoácido pertence ao lid. Aminácido pertence ao centro ativo.

Através da Tabela 8 observa-se que para cada sistema, os resíduos que mais interagem são apolares, o que faz sentido, uma vez que o óleo também é apolar. Na proteína 1EIN, os sistemas com mais interações foram os do óleo de colza a 25 °C, óleo de girassol a 25 °C, óleo de palma a 25 °C e óleo de palma a 60 °C, para a proteína 1EIN_hybrid foram os sistemas com óleo de colza a 25 °C, óleo de colza a 60 °C, óleo de girassol a 60°C e óleo de palma a 60 °C, sendo que é a proteína 1EIN_hybrid que interage mais com o óleo.

Grande parte dos aminoácidos identificados como mais importantes, não pertencem nem ao lid nem ao centro ativo da proteína, tal como é possível observar na Tabela 8, estes aminoácidos pertencem a zonas vizinhas destes elementos e muito provavelmente contribuem para a adsorção dos triglicerídeos ao centro ativo das proteínas. Na literatura estão descritos estudos semelhantes realizados por Willems *et al.*,⁵¹ com 3 variantes da TLL (uma nativa, uma com lid de esterase e uma híbrida entre as duas primeiras), que concluem que a orientação de ligação interfacial da TLL foi significativamente afetada pela natureza dos aminoácidos na região do lid. Sendo que a região do lid da variante esterase demonstrou-se menos flexível do que a região do lid da variante nativa, enquanto que a variante híbrida exibiu flexibilidade e estabilidade do lid superior na conformação aberta, favorecendo assim as interações entre a proteína e o substrato nesta região. Os resultados da Tabela 8 demonstram que há mais resíduos da região do lid da proteína híbrida a interagir com os triglicerídeos do que da proteína nativa, o que está de acordo com os resultados obtidos por Willems *et al.*⁵¹

3.1.2.5. Caracterização dos triglicerídeos no processo de interação do centro ativo da proteína com o óleo

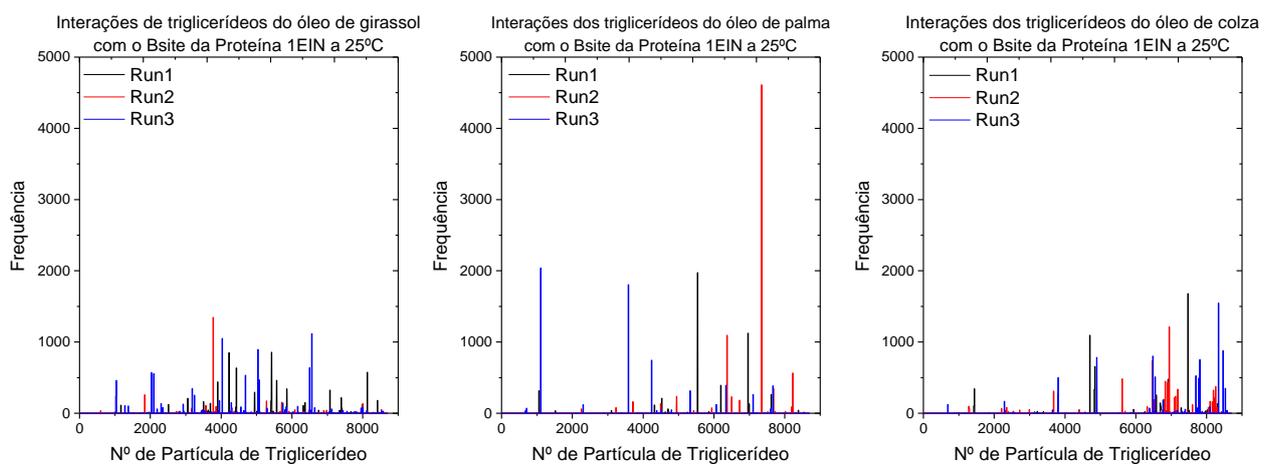
Foram selecionados os triglicerídeos de cada sistema que interagem com o centro ativo das proteínas, os resultados desta análise encontram-se nos gráficos da Figura 35.

Analisando os resultados, é notório que a 60 °C existem muito mais interações do que a 25 °C, por outro lado a 25 °C as interações existentes têm frequências maiores. Este resultado faz sentido uma vez que o aumento de temperatura aumenta a energia cinética do sistema, logo a maior agitação existente entre os triglicerídeos leva ao aumento do número de interações, no entanto, desfavorece o facto de um triglicerídeo poder estabelecer uma interação temporalmente mais longa com o centro ativo da proteína. Mais uma vez, não é possível estabelecer uma relação direta entre os replicados de cada sistema, ou seja, não há sobreposições em zonas específicas. O que leva a entender que a interação dos triglicerídeos com o centro ativo da proteína não está dependente das posições iniciais dos triglicerídeos.

Como já foi explicado anteriormente, as caixas de óleo destes sistemas são compostas por diferentes tipos de triglicerídeos. Estes triglicerídeos, podem ser identificados nos gráficos da Figura 35 através do nº de partícula, ou seja, para o óleo de girassol temos TPG entre 585 e 984,

TOG entre 985 e 3384 e TLG entre 3385 e 8584, para o óleo de colza temos TPG entre 585 e 984, TOG entre 985 e 6184 e TLG entre 6185 e 8584, para o óleo de palma temos TPG entre 585 e 4584 e TOG entre 4584 e 8584. Com esta informação é possível identificar o tipo de triglicerídeo para os picos de maiores frequências, ou seja, é possível saber que tipo de triglicerídeo interage mais tempo para cada sistema. Nos sistemas com óleo de palma, é possível observar que há maior densidade e intensidade de picos a partir aproximadamente da partícula 5000, que corresponde a TOG. Para os sistemas com óleo de colza verifica-se uma maior intensidade e densidade de picos a partir da mesma zona (partícula 5000), no entanto, neste caso estamos perante TLG (maioritariamente) e TOG (em minoria). Nos sistemas com óleo de girassol, a interpretação já não é tão linear, ou seja, as zonas mais densas e intensas não são as mesmas para todos os sistemas que contêm este óleo, para a proteína 1EIN identificam-se as zonas a partir de 4000 que correspondem ao TLG, mas para a proteína 1EIN_hybrid temos a 25 °C a zona de 585 até 2000 que engloba TPG e TOG, e a 60 °C temos picos que se destacam a aproximadamente 4000 e 6000, e correspondem a TLG. Esta análise sobre o tipo de triglicerídeo pode indicar que os TLG são os triglicerídeos que mais têm tendência a interagir com o centro ativo da proteína. O que poderá estar relacionado com a distribuição dos TLG na fase do óleo, ou seja, com preferência dos TLG pela interface óleo/água relativamente aos outros triglicerídeos. Uma possível razão por esta preferência pode estar relacionada com o facto dos TLG serem ligeiramente mais polares por terem mais ligações duplas, e por isso terem uma maior afinidade com a água que é polar.

Em paralelo a esta análise foi visualizada a trajetória de cada sistema com estes triglicerídeos em destaque para perceber se as suas posições poderiam estar a influenciar as interações, no entanto, concluiu-se que são triglicerídeos que estão bem dispersos pela caixa de óleo com posições bem variáveis ao longo da simulação, pelo que as suas interações com o centro ativo não estão vinculadas às coordenadas dos diversos elementos.



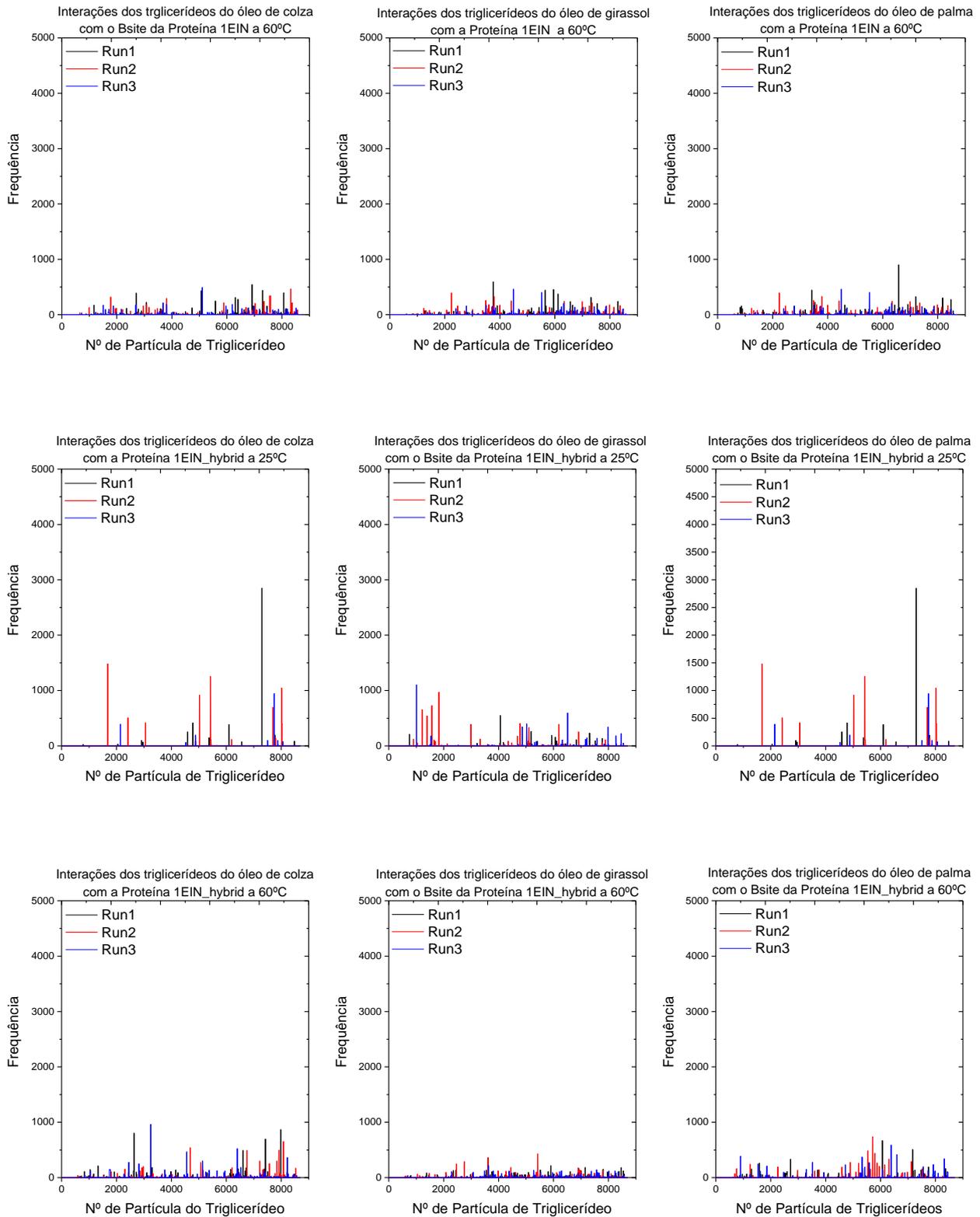


Figura 35 - Frequência de interação dos triglicerídeos do óleo com o centro ativo da proteína para cada sistema em estudo.

3.1.2.6. Caracterização dos resíduos da proteína que contribuem para a interação dos triglicerídeos com o centro ativo da proteína

Da análise anterior, foram selecionados os triglicerídeos que interagem mais de 1% do tempo de simulação com o centro ativo da proteína. De seguida, determinou-se os resíduos da proteína que interagem com os triglicerídeos selecionados. Os resíduos que mais interagirem com os triglicerídeos são aqueles que mais contribuem para a chegada do triglicerídeo ao centro ativo da proteína. Os gráficos da Figura 36 apresentam o resultado desta análise.

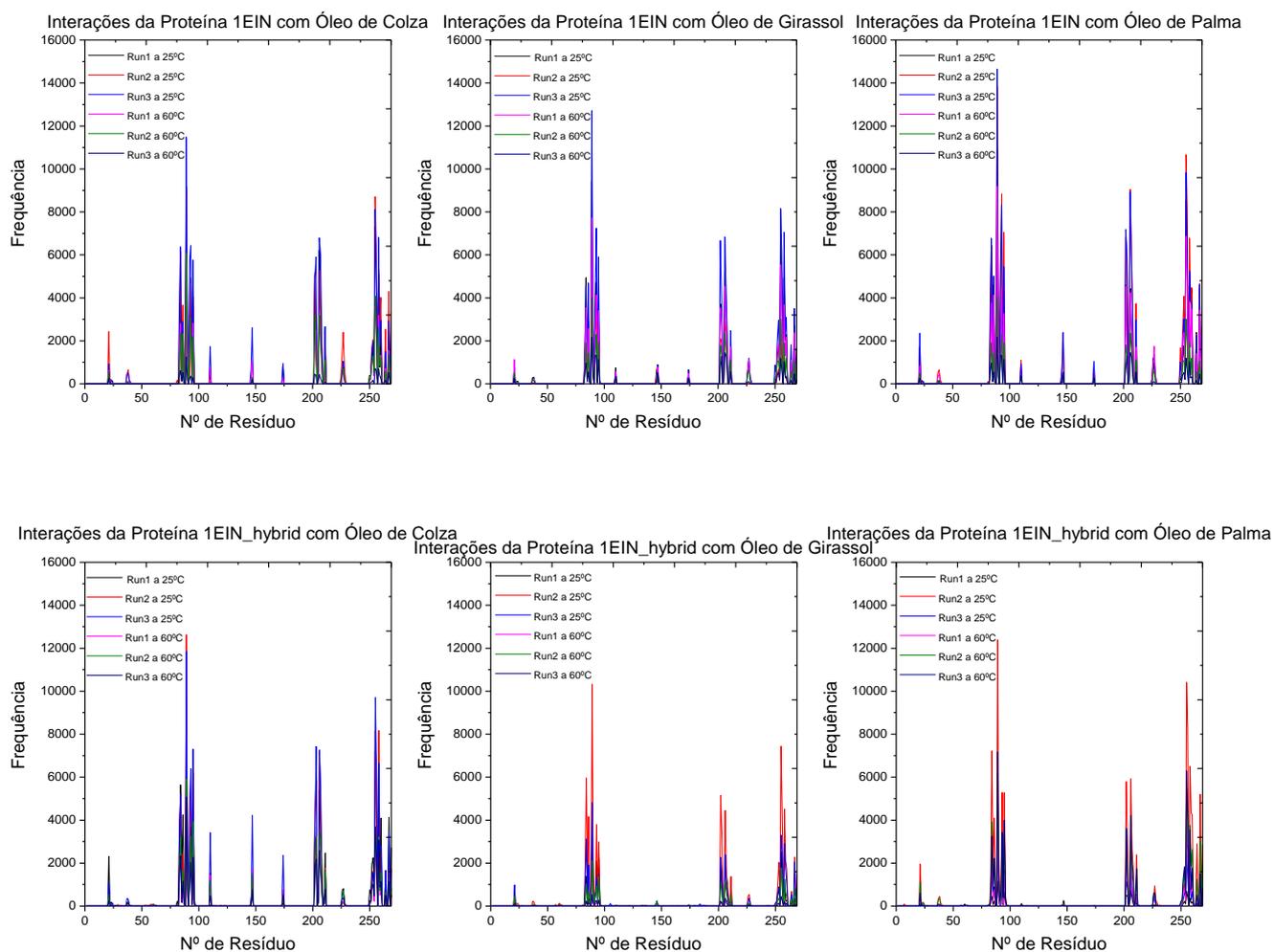


Figura 36 - Frequência de interação dos resíduos da proteína com os triglicerídeos que mais interagiram com o centro ativo da proteína para cada sistema em estudo.

Após analisar os resultados apresentados, verifica-se que os resíduos que mais interagem são novamente os resíduos do lid das proteínas e os resíduos próximos ao centro ativo incluindo a histidina do trio catalítico, tal como em 3.1.1.5. O que significa que os aminoácidos caracterizados

na Tabela 8, não são só importantes para a reação enzimática de hidrólise, nomeadamente o lid que provoca o desimpedimento necessário a esta reação, a histidina 258 pertencente ao centro ativo da proteína que é responsável pela reação, mas também os restantes aminoácidos caracterizados que são responsáveis pela chegada dos triglicéridos ao trio catalítico da proteína. Neste caso, não há nenhuma proteína que se destaque por interagir com maior frequência.

3.2. Componente Laboratorial

3.2.1. Caracterização experimental dos óleos usados

Antes de iniciar os estudos da reação de hidrólise, é necessário caracterizar os óleos que serão usados nesse processo (óleo de colza, girassol e palma virgens e usados), para tentar perceber se à semelhança dos resultados de Dinâmica Molecular, também apresentam comportamentos semelhantes. Para esta caracterização foram realizados os índices de acidez, saponificação e iodo, e ainda espectroscopias FTIR-ATR e UV-Visível.

3.2.1.1. Índice de Acidez

A Figura 37 representa o índice de acidez de cada amostra de óleo, que se traduz no teor de ácidos gordos livres que ela contém. É expresso em miligramas de KOH por grama de amostra.

Numa análise geral aos resultados obtidos verifica-se que o óleo de girassol tem o índice de acidez mais baixo, e o óleo de palma tem o índice de acidez mais alto, sendo que o índice de acidez do óleo de colza é intermédio em relação aos restantes. No entanto, não deixa de ser considerado um alto índice de acidez. Estes altos índices de acidez do óleo de colza e de palma podem estar relacionados com o facto de não terem sido submetidos a processos de refinamento, e conseqüentemente, terão muitos elementos na sua constituição que podem estar a influenciar a acidez do óleo. É de notar que os óleos em estudo têm todos uma constituição diferente no que diz respeito a ácidos gordos. Segundo o decreto-lei nº 106/2005³², o óleo de palma tem na sua constituição maioritariamente ácido palmítico (39,3-37,5% de ácidos gordos totais) e ácido oleico (36,0-44,0% de ácidos gordos totais), o óleo de colza tem ácido oleico (51,0-70,0% de ácidos gordos totais) e ácido linoleico (15,0-30,0% de ácidos gordos totais) e o óleo de girassol tem também ácido linoleico (48,3-74,0% de ácidos gordos totais) e ácido oleico (14,0-39,4% de ácidos gordos totais), o que sugere que o alto teor de ácido palmítico possa levar a um alto índice de acidez.

Analisando os resultados obtidos com mais pormenor, é possível observar que no óleo de girassol o índice de acidez tem tendência a aumentar ao longo das frituras, já no óleo de colza e no de palma é exatamente o contrário. A tendência esperada seria o observado por exemplo com o óleo de girassol, ou seja, um aumento dos ácidos gordos livres (do índice de acidez) com o aumento do número de frituras, uma vez que o alimento ao ser frito liberta água no meio de fritura levando à degradação hidrolítica dos triglicéridos, formando ácidos gordos livres.^{78,79} No entanto, para além da possibilidade dos ácidos gordos livres reagirem com outros produtos formados durante as frituras, é também frequente que o alimento ao ser frito absorva alguns produtos de decomposição formados nas frituras, nomeadamente compostos polares, polímeros, ácidos gordos livres e triglicéridos, reduzindo assim o índice de acidez do óleo, o que pode explicar o comportamento do índice de acidez ao longo das frituras para o óleo de colza e o óleo de palma.⁷⁹

Para além disto, é definido, pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, para óleos e gorduras virgens ou que passaram por processos de prensagem a frio, destinadas à alimentação humana, o índice de acidez máximo de 4 mg de KOH/g, para refinados, o índice máximo de 0,6 mg de KOH/g, e para óleos de palma virgens o índice máximo de 10 mg de KOH/g.³¹ Pelo que sendo o óleo de girassol refinado e o óleo de colza e palma virgens, através dos resultados obtidos verifica-se que todos os óleos cumprem este requisito.

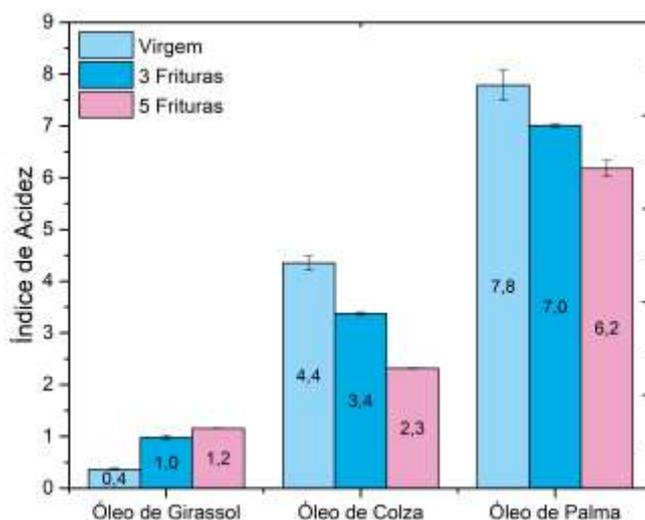


Figura 37 - Resultados do índice de acidez dos diferentes óleos virgens e submetidos a ciclos de frituras.

3.2.1.2. Índice de Saponificação

O gráfico da Figura 38 apresenta os valores do índice de saponificação de cada amostra expresso em miligramas de KOH por grama de óleo. Segundo a literatura³² o índice de

saponificação para o óleo de colza deve estar entre 182 e 193, o óleo de girassol entre 188 e 194 e o óleo de palma entre 190 e 209, tendo em conta os resultados apresentados na Figura 38 e os seus desvios-padrão, podemos dizer que estes estão bastante próximos aos da literatura.

Observa-se que não existe uma tendência geral no comportamento do índice de saponificação ao longo das frituras. Tendo em conta os desvios-padrão apresentados, tanto o óleo de girassol como o óleo de palma apresentam índices de saponificação muito semelhantes antes e após o óleo ser submetido a várias frituras. No caso do óleo de colza, é possível observar uma ligeira tendência descendente no índice à medida que o óleo é submetido a mais processos de fritura. Podemos constatar que as frituras reduziram o teor de matéria saponificável do óleo, possivelmente devido à degradação dos triglicerídeos e possível obtenção de novos subprodutos não saponificáveis, como por exemplo peróxidos, époídos, polímeros e etc.³⁴ No caso do óleo de palma e do óleo de girassol, parece ter havido alguma resistência à degradação por parte da matéria saponificável destes óleos.

De forma geral, os índices de saponificação das diferentes amostras não são muito diferentes uns dos outros, o que significa que à partida a saponificação destas amostras funciona de forma semelhante, mesmo quando o óleo é submetido a frituras, sendo por isso desde já um ponto promissor para o presente trabalho, uma vez que estes são óleos com alto consumo a nível mundial.

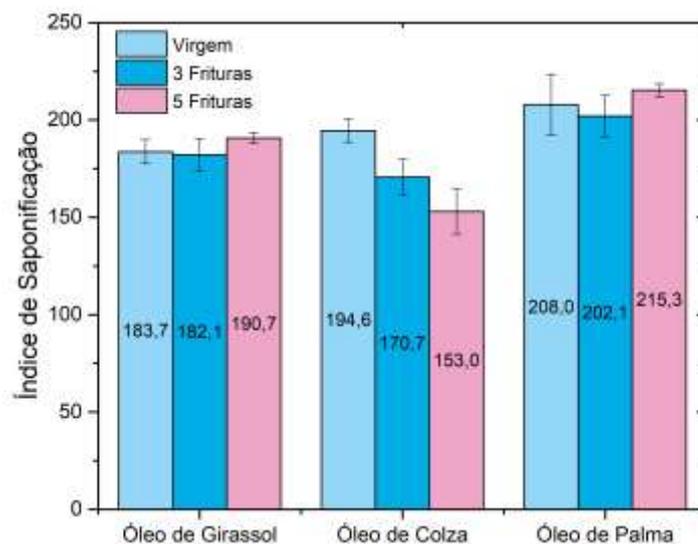


Figura 38 - Resultados do índice de saponificação dos diferentes óleos virgens e submetidos a frituras.

3.2.1.3. Índice de Iodo

O índice de iodo mede o grau de insaturação dos triglicerídeos presentes no óleo e é expresso em gramas de iodo por 100 gramas de óleo. O gráfico da Figura 39 representa o índice de iodo das amostras em estudo. É possível observar que o óleo de palma tem um índice de iodo muito inferior aos restantes óleos, o que faz sentido tendo em conta a sua constituição, que é maioritariamente ácido palmítico (C16:0), um ácido gordo sem insaturações. Os restantes óleos sendo constituídos maioritariamente por ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2), já contêm mais insaturações nas suas cadeias hidrocarbonadas, e consequentemente um maior índice de iodo. De acordo com a literatura³², o óleo de palma tem um índice de iodo entre 50 e 55, o óleo de colza entre 105 e 126, e o óleo de girassol entre 118 e 141, valores estes que corroboram os obtidos experimentalmente, tendo em conta o desvio-padrão apresentado.

Observando os resultados da Figura 39, o comportamento do índice de iodo ao longo das frituras, de forma geral, foi pouco alterado, o que significa que as reações de oxidação envolvidas durante as frituras tiveram pouca influência no grau de saturação dos compostos presentes.

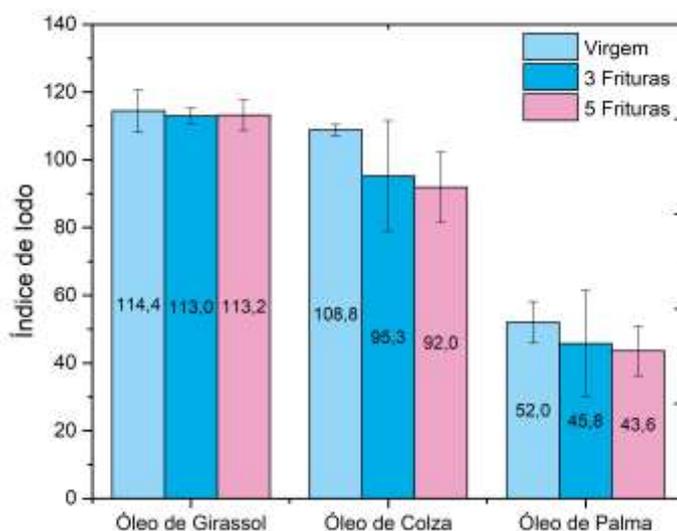


Figura 39 - Resultados do índice de iodo dos diferentes óleos virgens e submetidos a frituras.

3.2.1.4. Espectroscopia FTIR-ATR

Na Figura 40 estão representados os espectros de FTIR normalizados obtidos para cada amostra de óleo. Através dos espectros é possível observar que todos têm as mesmas bandas, ou seja, todas as amostras contêm os mesmos grupos funcionais. Para além disto, é de notar que as amostras submetidas a frituras têm um espectro praticamente sobreposto ao da amostra virgem, o que é positivo, uma vez que indica que não ocorreram alterações significativas nos grupos funcionais em relação ao óleo virgem.

Pode-se observar para ambos os espectros que na região de aproximadamente 800 cm^{-1} existe uma banda de absorção que corresponde à cadeia hidrocarbonada $(\text{CH}_2)_n$, a cerca de 1150 cm^{-1} temos uma banda correspondente ao grupo C-O do éster, entre 1480 e 1500 cm^{-1} a banda de absorção correspondente ao grupo C-H do CH_2 , entre 1700 e 1750 cm^{-1} a banda de absorção que corresponde ao grupo C=O do ácido gordo, e entre 2750 e 3000 cm^{-1} temos uma banda que corresponde ao grupo C-H do CH_2 e do CH_3 , com movimentos vibracionais diferentes da banda entre 1480 e 1500 cm^{-1} (enquanto que o movimento vibracional da banda 1480 - 1500 cm^{-1} estamos perante um desdobramento angular, na banda 2750 - 3000 cm^{-1} estamos perante um estiramento), e outra banda que corresponde ao grupo $=\text{C-H}$.⁸⁰

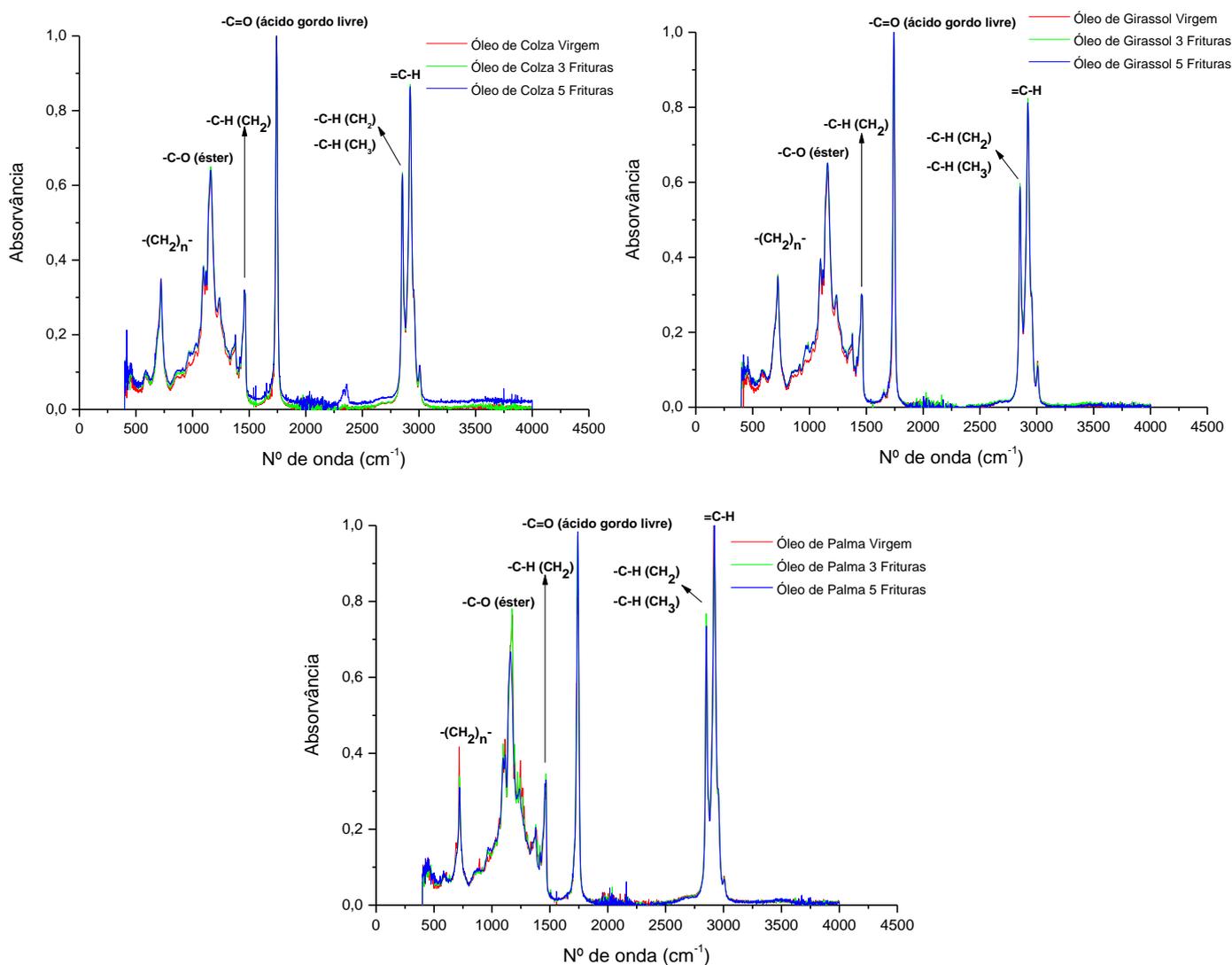


Figura 40 - Espectros de FTIR-ATR dos diferentes óleos de colza, girassol e palma virgens e usados.

3.2.1.5. Espectroscopia UV-Visível

A espectroscopia de absorção UV-Vis permite acompanhar as alterações das cadeias hidrocarbonadas dos triglicerídeos presentes no óleo, através da mudança de grupos funcionais e ligações químicas durante um processo de degradação. À medida que os óleos sofrem oxidação, aumentam a sua capacidade de absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta-visível.

Na Figura 41 estão representados os espectros UV-Vis normalizados de cada amostra em estudo. Os espectros do óleo de colza e do óleo de girassol são os mais semelhantes entre si. Em ambos os casos são facilmente identificáveis as bandas de absorção a cerca de 233 nm e a 270 nm nas amostras submetidas a frituras. Estes comprimentos de onda referem-se a modificações nas estruturas dos triglicerídeos e formação de novas moléculas, mais propriamente às transições eletrónicas dos eletrões das orbitais ligantes para as antiligantes das duplas conjugadas e cetonas α -insaturadas. Num estado inicial de degradação há aumento da absorção a 233 nm devido à formação de dienos conjugados a partir da degradação dos ácidos oleico e linoleico, num estado final de degradação há um aumento de absorção a cerca de 270 nm devido a compostos secundários da oxidação, como trienos conjugados, aldeídos e cetonas insaturadas.^{81,82}

Nos espectros do óleo de palma relativos às amostras submetidas a frituras, estas bandas têm muito pouca intensidade comparadas com os óleos de colza e girassol, uma vez que este óleo é constituído maioritariamente por ácido palmítico que é um ácido gordo saturado, e portanto as pequenas regiões onde há absorção deve-se apenas à percentagem de ácido oleico presente. Para além disto, no espectro do óleo de palma virgem é possível observar uma banda de absorção a cerca de 370 nm até 505 nm, esta banda de absorção diz respeito aos carotenóides, mais propriamente ao β -caroteno, presente no óleo de palma virgem. O β -caroteno é um hidrocarboneto de cadeia longa com diversas insaturações e está presente em diversas frutas, hortaliças e plantas, sendo o principal responsável pela sua coloração laranja-avermelhada. A sua presença explica o facto de o óleo de palma ser cor-de-laranja no seu estado virgem e passar a amarelo claro após ser submetido a frituras (o β -caroteno degrada ao longo das frituras). O β -caroteno é também um antioxidante natural, e por isso é possível que contribua para a resistência à degradação das cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos.⁸³

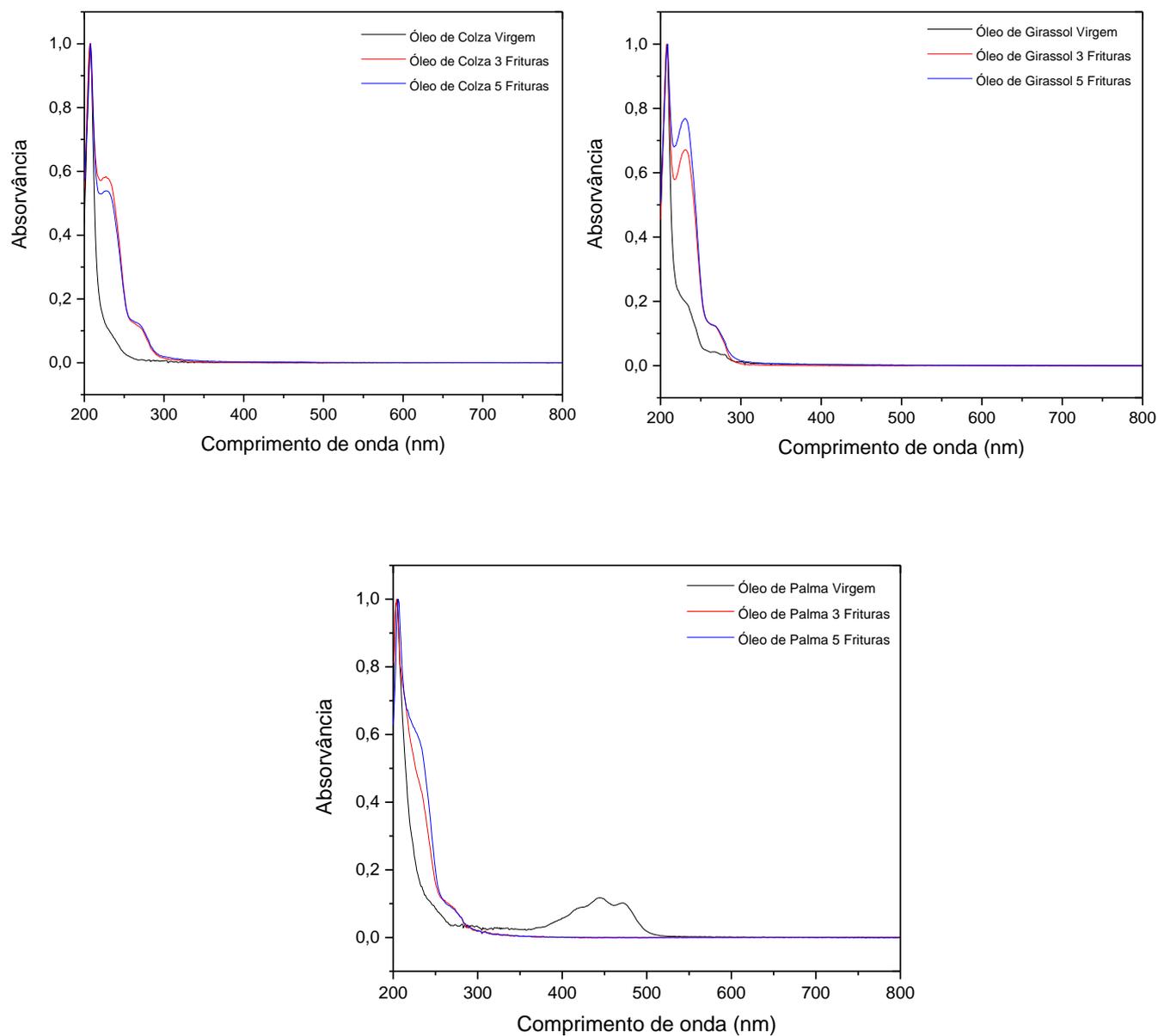


Figura 41 - Espectros de absorção UV-Vis normalizados, para o Óleo de Colza, Óleo de Girassol e Óleo de Palma virgem, submetidos a 3 ciclos de frituras e a 5 ciclos de frituras.

A partir dos espectros UV-Vis obtidos, foi calculada a percentagem de dienos conjugados (% DC) nas amostras em estudo. Os resultados estão apresentados na Figura 42.

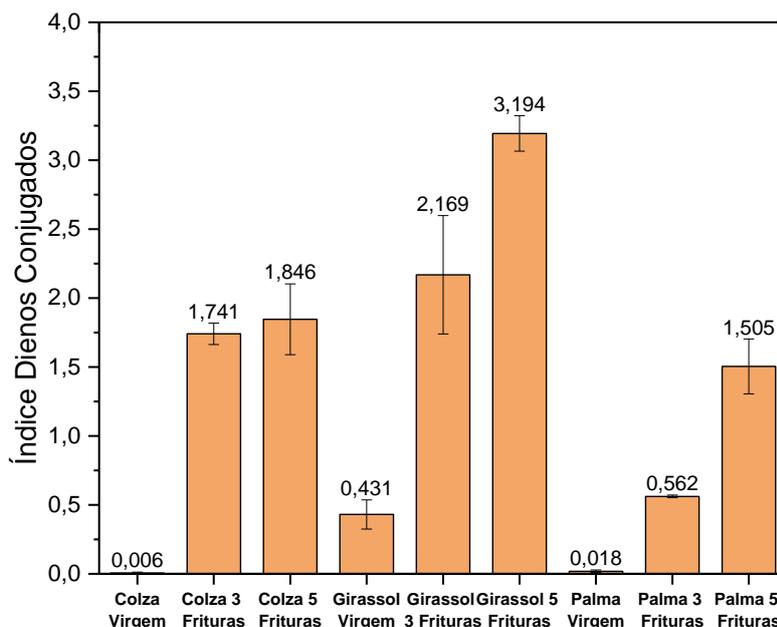


Figura 42 - Percentagem de dienos conjugados nas amostras de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados.

Analisando os resultados da Figura 42, observa-se que à medida que aumenta o número de ciclos de fritura a que o óleo é submetido, também aumenta a percentagem de dienos conjugados presentes nas amostras. Esta análise quantitativa está de acordo com a descrição feita acima, e dessa forma a sua tendência já era esperada uma vez que a formação dos dienos conjugados faz parte dos processos de oxidação aquando da degradação do óleo. O óleo usado com maior percentagem de dienos conjugados foi o óleo de girassol. Os valores para a percentagem de dienos conjugados na literatura variam bastante segundo o tipo/marca de óleo que é estudado, e no caso do óleo usado também varia muito consoante a forma como são feitos os processos de fritura e que alimentos são usados para estes processos. Desta forma, é difícil comparar estes valores obtidos da Figura 42 com a literatura, no entanto, a gama de valores obtida (0.06% a 3.19%) é aceitável para óleos vegetais.^{84, 85, 86}

3.2.2. Otimização da Reação de Hidrólise

Na secção anterior fez-se a caracterização dos óleos virgens e usados, tendo-se chegado à conclusão de que as suas propriedades físico-químicas não são muito alteradas ao longo das frituras. Esta secção será dedicada à hidrólise enzimática dos diversos óleos. Desta forma, na tentativa de simplificar o trabalho e torná-lo mais sustentável, procedeu-se à otimização da reação de hidrólise apenas com óleos virgens, ou seja, óleos não sujeitos a processos de fritura.

3.2.2.1. Estudos Cinéticos da Reação de Hidrólise

A Figura 43 ilustra os resultados dos estudos cinéticos de cada óleo. Como seria de esperar, observa-se que o rendimento da reação de hidrólise aumenta ao longo do tempo. No entanto o maior aumento dá-se até aproximadamente às 5 horas de reação, e posteriormente o aumento no rendimento já não é tão significativo até às 24 horas. Isto pode ser explicado com o facto da concentração de substrato (triglicerídeos) diminuir com o aumento do tempo de reação.

O óleo que atingiu um rendimento maior na reação de hidrólise foi o óleo de colza com cerca de 65% após 24 horas de reação, e o menor rendimento foi obtido para o óleo de palma. De forma geral, os diferentes óleos demonstram o mesmo comportamento ao longo tempo para a reação de hidrólise, o que de certa forma já era esperado uma vez que na secção de caracterização dos óleos, estes já se comportavam de forma semelhante.

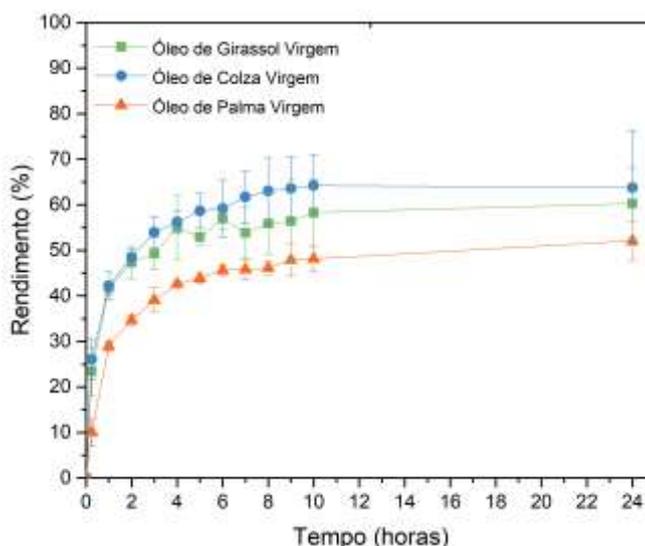


Figura 43 - Rendimento da reação de hidrólise ao longo do tempo durante 24 horas para o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. Condições de reação: proporção óleo/água 2:1 (peso total da reação de 80g), com uma concentração de SLE₂S de 0.07 mM, Lipex a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 60°C e velocidade de agitação de 1500 rpm.

3.2.2.2. Estudo de Condições de Referência para a Reação de Hidrólise

Este estudo permite perceber o comportamento dos diferentes óleos face às variáveis que lhes são impostas durante a reação de hidrólise. A Figura 44 agrupa os resultados obtidos para este estudo. Antes de analisar detalhadamente cada gráfico, é de notar que as condições de referência de reação usadas foram: proporção óleo/água 2:1 (peso total da reação de 30g), com uma

concentração de SLE₂S de 0.07 mM, Lipex a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 20 °C para óleo de colza e óleo de girassol e 60 °C para óleo de palma, velocidade de agitação de 1500 rpm, 5 horas. A reação de hidrólise para o óleo de palma foi realizada a 60 °C, pois como explicado anteriormente, este óleo é sólido à temperatura ambiente. O facto de estarmos a comparar rendimentos de hidrólise de reações com temperaturas diferentes pode induzir no erro de interpretação de que o óleo de palma tem maior rendimento para a reação de hidrólise, mas isso apenas se deve à temperatura padrão de reação ser mais elevada. Confrontando com o gráfico do rendimento em função da temperatura torna-se explícito que a temperatura é um factor de grande influência para a reação de hidrólise.

Começando a análise de resultados pelo parâmetro da proporção óleo/água, observa-se que o comportamento dos diferentes óleos é muito semelhante, para proporções em que a água está em maioria, o rendimento é baixo, passa a ser máximo quando temos quantidades iguais de óleo e de água e posteriormente há um decréscimo de rendimento à medida que a proporção óleo/água aumenta. Este decréscimo pode dever-se a uma inibição de enzima devido à alta concentração de óleo, como também pode estar relacionado com o facto do aumento do produto de hidrólise no meio reacional leve a uma alteração de polaridade deste meio e consequentemente isto influencia a conformação ativa da lipase.⁷⁶

Relativamente à percentagem de Lipex na reação de hidrólise, podemos observar que à medida que se aumenta a quantidade de lipase, o rendimento também aumenta. No entanto, verifica-se que até cerca de 5% o aumento é significativo, mas a partir daí é bastante pequeno, quase constante. Assim sendo, podemos dizer que a partir de aproximadamente 5% de Lipex se deu uma inibição de produto, este fenómeno pode significar que se atingiu um máximo de concentração de lipase na interface, ficando assim a interface saturada de moléculas de lipase e levando talvez a uma erosão mecânica causada entre elas e posteriormente à dessorção de algumas destas moléculas da interface.⁷⁶

A variação da temperatura na reação de hidrólise, permitiu perceber que a um aumento de temperatura está associado um aumento de rendimento até 60 °C e a partir daí há um decréscimo acentuado no rendimento da reação. O que significa que até 60 °C com o aumento da temperatura, aumenta a velocidade das moléculas do sistema e por isso a colisão substrato-enzima, mas a partir de 60 °C a taxa de hidrólise diminui porque a velocidade de inativação da proteína torna-se superior à velocidade de colisão entre o substrato e a enzima. Por outro lado, também é possível verificar que devido ao acumular de moléculas de glicerol no sistema reacional, se tenha formado uma camada que provoque algum impedimento hidrofílico, limitando assim a difusão do substrato.⁷⁶

Por fim, observou-se também que com o aumento da velocidade de agitação, aumenta o rendimento da reação de hidrólise. Este facto é facilmente explicável tendo em conta que o aumento da velocidade de agitação promove mais colisões entre a enzima e o substrato no sistema,

aumentando assim o produto de reação. É de notar que isto só acontece porque a enzima consegue encontrar estabilidade suficiente para resistir à agitação do sistema.

Este estudo permite concluir que os diferentes óleos em estudo expostos às mesmas variáveis de reação têm um comportamento bastante semelhante entre si ao longo da reação de hidrólise, o que é positivo pois indica que à partida poderão ser tratados da mesma forma para a otimização de condições desta reação e posteriormente na confeção dos detergentes.

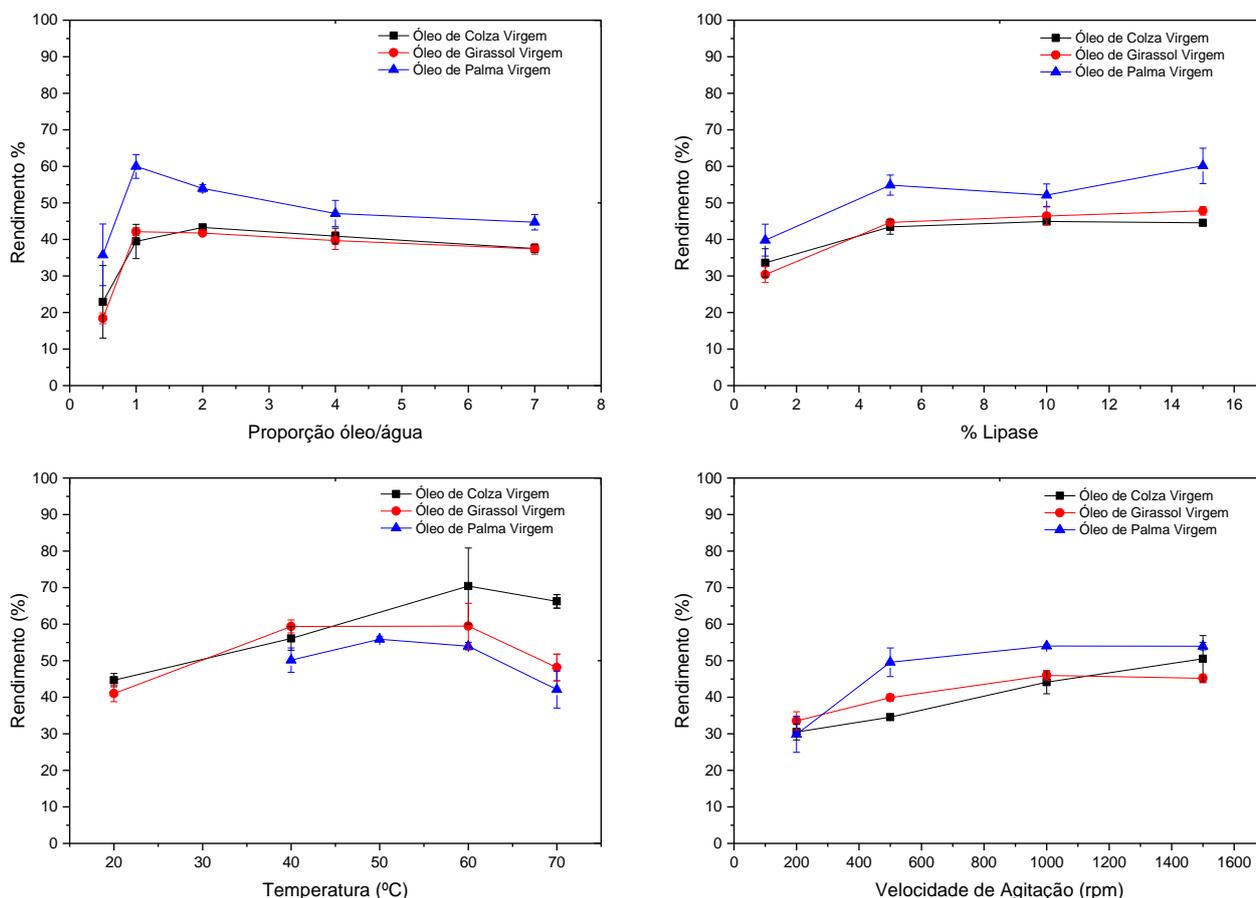


Figura 44 - Efeito da proporção óleo/água, % de Lipex (em relação à massa de óleo), temperatura e velocidade de agitação na reação de hidrólise para o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma. Condições padrão de reação: proporção óleo/água 2:1 (peso total da reação de 30g), com uma concentração de SLE₂S de 0.07 mM, Lipex a 2.5% m/V do óleo, temperatura a 20°C para óleo de colza e óleo de girassol e 60°C para óleo de palma, velocidade de agitação de 1500 rpm, 5 horas.

3.2.2.3. Planeamento Factorial da Reação de Hidrólise

Nas secções 3.2.2.1. e 3.2.2.2. vimos que os diferentes óleos se comportam de forma bastante semelhante face às diferentes variáveis impostas nos sistemas. Desta forma, por questões práticas e sustentáveis, decidiu-se avançar para o planeamento factorial apenas com o óleo de colza. Apesar do óleo de palma ser o mais consumido no mundo, este tem a particularidade de ser sólido à temperatura ambiente, pelo que o óleo eleito para este estudo foi o óleo de colza, sendo o terceiro

óleo mais consumido no mundo e muito mais fácil de trabalhar. As condições ótimas apuradas através do planeamento factorial serão posteriormente testadas nos restantes óleos em estudo virgens e usados.

Os resultados obtidos para as reações do planeamento factorial estão apresentados na Tabela 9. A reação com maior rendimento foi a reação 4 com 73% e com menor rendimento foi a reação 28 com 37%.

Tabela 9 - Reações do planeamento factorial e respectivos rendimentos.

Reação	Tempo (horas)	% Lipex	Temperatura (°C)	Proporção Óleo/Água	Rendimento (%)	Desvio-Padrão
1	5	15	60	1	71	5.6
2	5	8.75	40	1	59	4.1
3	5	8.75	40	1	64	10
4	5	8.75	60	1.5	73	6.1
5	2.5	8.75	60	1	64	10
6	2.5	8.75	40	1.5	49	4.9
7	7.5	15	40	1	68	5.7
8	5	15	20	1	49	2.3
9	5	2.5	20	1	38	0.6
10	2.5	2.5	40	1	48	1.2
11	7.5	8.75	20	1	52	1.3
12	5	8.75	40	1	60	6.4
13	5	8.75	20	0.5	48	0.5
14	7.5	2.5	40	1	56	1.3
15	5	2.5	40	0.5	43	4.8
16	7.5	8.75	40	1.5	64	2.7
17	5	8.75	20	1.5	45	1.4
18	5	15	40	1.5	59	4.2
19	7.5	8.75	40	0.5	63	2.5
20	2.5	15	40	1	51	2.3
21	2.5	8.75	40	0.5	52	3.1
22	5	2.5	40	1.5	53	1.7
23	5	8.75	40	1	56	7.5
24	7.5	8.75	60	1	68	7.3
25	5	2.5	60	1	63	1.9
26	5	8.75	60	0.5	59	8.7
27	5	8.75	40	1	57	4.3
28	2.5	8.75	20	1	37	0.3
29	5	15	40	0.5	61	3.0

Os resultados obtidos através do planeamento factorial ajustaram-se num modelo quadrático, através do qual foi possível criar uma superfície de resposta. A Figura 45 reúne vários gráficos

de superfície de resposta da interação entre duas variáveis do planejamento factorial. Na Figura 45 (a) observa-se que o rendimento da reação de hidrólise aumenta à medida que aumenta o tempo de reação e com o aumento da percentagem de Lipex (embora não haja grande alteração em relação ao rendimento quando a Lipex aumenta de 10% para 15%). A interação destas duas variáveis tem o seu máximo de rendimento a 15% de Lipex e 7.5 horas de reação. A Figura 45 (b) mostra a interação entre a temperatura e o tempo de reação, à medida que estas variáveis aumentam, o rendimento da reação também aumenta, e por isso a superfície de resposta indica como rendimento máximo a temperatura a 60 °C e o tempo a 7.5 horas. A Figura 45 (c) ilustra a interação entre a proporção óleo/água e o tempo de reação. Já tínhamos visto que o rendimento da hidrólise aumenta ao longo do tempo. No que diz respeito à proporção óleo/água, não se verifica uma grande tendência no rendimento, no entanto para proporções abaixo de 1 o rendimento é inferior. Desta forma o rendimento máximo na interação destas variáveis acontece às 7.5 horas e na proporção óleo/água entre 1 e 1.5. A interação entre a temperatura e a percentagem de Lipex está descrita na Figura 45 (d), como já tinha sido observado de forma independente, tanto o aumento de temperatura como de Lipex levam a um aumento de rendimento, desta forma observa-se que o rendimento máximo atingido na interação destas variáveis é a temperatura a 60 °C e a lipase a 15%. A Figura 45 (e) representa a interação da proporção óleo/água com a percentagem de Lipex. Ambas as variáveis não têm uma tendência individual muito acentuada no que diz respeito ao rendimento da reação, no caso da percentagem de Lipex, o rendimento é máximo a 15%, já na proporção óleo/água ronda a proporção 1. Assim sendo, o rendimento máximo de interação entre estas variáveis acontece quando a Lipex está a 15% e a proporção óleo/água é cerca de 1. A interação entre a temperatura e a proporção óleo/água está representada na Figura 45 (f), o rendimento máximo desta interação acontece a 60 °C e numa proporção óleo/água entre 1 e 1.5.

De forma geral, as tendências observadas nos gráficos da Figura 45 já se tinham manifestado quando se fez o estudo de condições de referência na secção 3.2.2.2.. A grande vantagem desta análise é poder conjugar diferentes variáveis e ter uma previsão das condições ótimas. Por exemplo, com este estudo descobrimos que conjugando a temperatura de 60 °C com 7,5 horas de reação resulta num rendimento bastante alto (Figura 45 (b)), tal como a temperatura de 60°C e a percentagem de Lipex entre 10% e 15% (Figura 45 (d)), e para um rendimento ainda superior resulta bem conjugar a temperatura de 60°C com a proporção óleo/água 1,5.

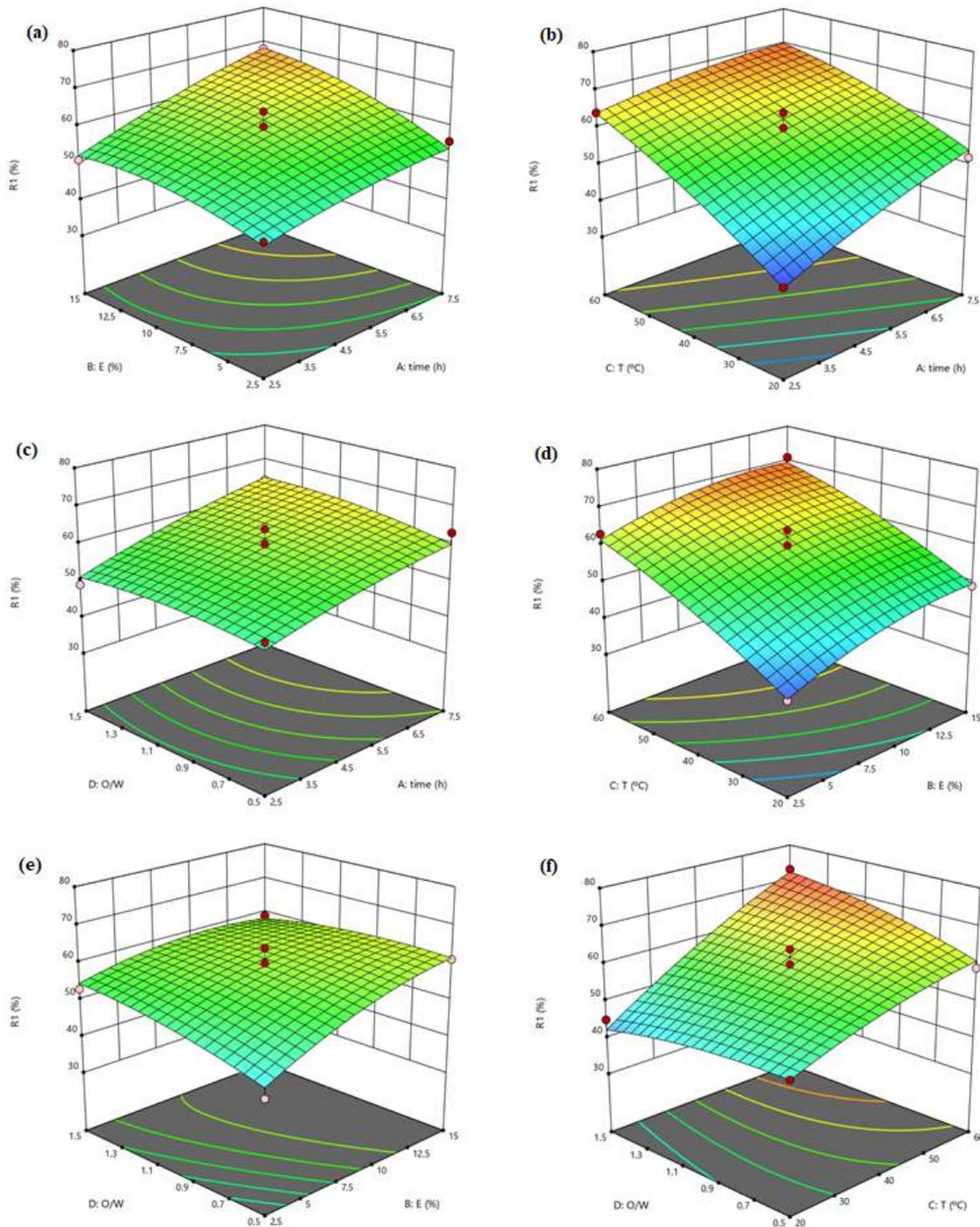


Figura 45 - Gráficos de superfície de resposta, que mostram a interação mútua de quaisquer duas variáveis no rendimento da hidrólise do óleo de colza. (a) % Lipex e tempo de reação. (b) temperatura e tempo de reação. (c) proporção óleo/água e tempo de reação. (d) temperatura e % Lipex. (e) proporção óleo/água e % Lipex. (f) proporção óleo/água e temperatura.

Analisando os resultados da Tabela 9, é possível fazer algumas comparações entre reações, por exemplo para a reação 10 tendo em conta o gráfico 45 (a) seria expectável que o rendimento fosse mais semelhante ao da reação 28. Por outro lado estas reações têm temperaturas diferentes e pelo gráfico 45 (d) sabe-se que a influência da temperatura é muito mais significativa do que a

da percentagem de Lipex, o que pode explicar o rendimento mais elevado na reação 10. Na reação 14 poderia ser expectável um rendimento superior ao obtido (56%) tendo em conta o tempo de reação, mas por um lado a percentagem de Lipex é baixa e também sabemos através dos estudos cinéticos (Figura 43) que o maior aumento de rendimento de hidrólise se dá até às 5 horas de reação, a partir daí torna-se quase constante, o que pode justificar o facto desta reação não ter um rendimento tão elevado. O mesmo se aplica à pouca diferença de rendimentos entre as reações 5 e 24 que têm rendimentos de 64% e 68%, e tempos de reação 2.5 horas e 7.5 horas respectivamente, pois observando a curva do óleo de colza na Figura 43, a diferença de rendimento entre a quantificação às 2.5 horas e às 7.5 horas é apenas de aproximadamente 5%. É de notar que as reações com proporção óleo/água 0.5 se tornaram difíceis de quantificar, uma vez que esta proporção não permitiu que a reação se tornasse totalmente homogénea, o que como consequência pode ter induzido numa quantificação com erros experimentais associados. Levando por exemplo a diferenças de rendimento elevadas em reações, como é o caso da 19 e 21, que apesar de terem tempos de reação bastante diferentes, sabemos pelas experiências anteriores que este factor não leva a uma enorme diferença de rendimento.

Uma vez analisados os resultados obtidos do planeamento factorial, e tendo em conta a informação que a Tabela 9 e a Figura 45 nos dão, procedeu-se ao cálculo de otimização das condições da reação de hidrólise. Seriam possíveis inúmeros cenários de otimização, e por isso começou-se por otimizar as condições do ponto de vista operacional, ou seja, tentar maximizar-se o rendimento. Como este projeto pretende atender às necessidades de uma empresa, foi também importante otimizar as condições de reação através de um ponto de vista mais económico, ou seja, minimizar a quantidade de enzima. Os cenários de otimização propostos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Cenários de otimização obtidos através do software Design Expert.

Otimização	Tempo (horas)	% Lipex	Temperatura (°C)	Proporção Óleo/Água	Rendimento
1	7.229	14.526	59.391	1.151	74.125
2	2.5	7.4	60	1.5	67.11
3	7.5	12.764	60	1.5	76.184
4	2.5	7.4	60	1.5	67.11
5	11.673	15	60	1.5	79.124
6	6.9	2.5	60	1.5	69.193

O cenário de otimização 1 foi o primeiro a ser criado, e por isso apenas se considerou a janela de valores correspondente aos extremos das variáveis testados no planeamento factorial, de forma a maximizar o rendimento de reação, o que significa que o tempo desejado seria entre 2.5 e 7.5 horas, a percentagem de Lipex entre 2.5% e 15%, a temperatura entre 20 °C e 60 °C, a proporção

óleo/água entre 1/2 e 3/2, e por fim o rendimento entre 37% e 73%. O cálculo obteve assim o cenário 1 exposto na Tabela 11 para um rendimento a aproximadamente 74%. Os próximos cenários de otimização obtidos tiveram por base a otimização 1. Para se obter a otimização 2 mantiveram-se os parâmetros da otimização 1 e apenas se minimizou a variável tempo de reação, originando um rendimento de cerca de 67%. A otimização 3 manteve os parâmetros da otimização 1, mas o rendimento foi permitido variar até 100%, originando assim um rendimento de aproximadamente 76%. A otimização 4 é semelhante à otimização 2, mas permitindo-se também variar o rendimento de reação até 100%, prevendo-se assim um rendimento de aproximadamente 67%. A otimização 5 tem por base a 3, mas o tempo de reação foi deixado variar até às 17.5 horas, tendo sido obtido um rendimento de cerca de 79%. E a otimização 6 é bastante semelhante à 5, mas com um objetivo mais económico, minimizando por isso a percentagem de Lipex, e resultando num rendimento de aproximadamente 69%.

Através desta análise de otimização percebeu-se que a influência do tempo na reação dada pelo modelo não é tão significativa quanto era esperado, pois quando se maximizou até 17.5 horas, o modelo apenas permitiu atingir 11.67 horas. Dos cenários de otimização apresentados, aquele que prevê um maior rendimento é a otimização 5, no entanto, do ponto de vista económico não é o melhor, uma vez que tanto o tempo de reação como a percentagem de Lipex são elevados. O mesmo acontece com os cenários de otimização 1 e 3, desta forma e tendo em conta que os restantes cenários de otimização têm rendimentos significativamente mais baixos, optou-se por escolher como condições ótimas para a reação de hidrólise, as condições da reação 4 do planeamento factorial (Tabela 9). Esta reação apresenta um rendimento de 73%, e um tempo de reação e percentagem de Lipex mais baixos (5 horas e 8.75% respectivamente) que os propostos pelos melhores cenários de otimização da Tabela 11. Para além disto, estamos perante a vantagem destas condições já terem sido testadas experimentalmente, o que não acontece com os cenários apresentados na Tabela 11.

As condições selecionadas para prosseguir o trabalho (Reação 4 da Tabela 10) foram testadas nos diferentes óleos e os resultados dos rendimentos estão apresentados no gráfico da Figura 46.

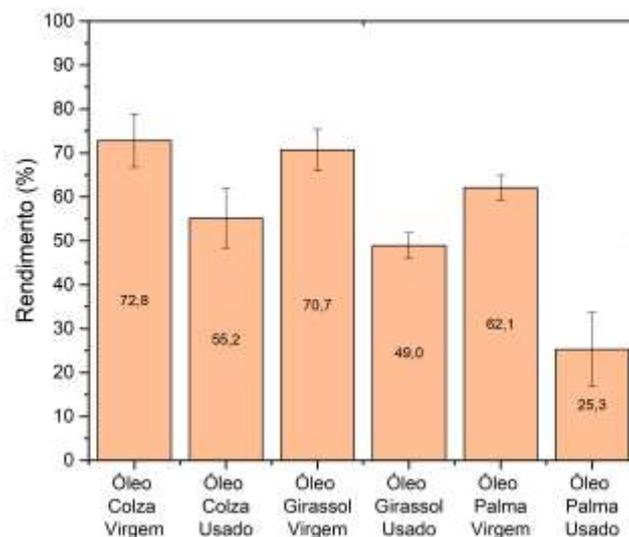


Figura 46 - Rendimento nas condições ótimas selecionadas (5 horas, 8.75% m/v de Lipex em relação à massa de óleo, 60°C, proporção óleo/água 1.5, 1500 rpm, 0.07Mm de SLE₂S) da reação de hidrólise para cada óleo.

Analisando o gráfico da Figura 46 observa-se que os óleos usados têm rendimentos inferiores para a reação de hidrólise nas mesmas condições de reação que os óleos virgens. O maior rendimento pertence ao óleo de colza virgem, sendo bastante semelhante ao do óleo de girassol virgem, e o menor rendimento pertence ao óleo de palma usado. Os rendimentos mais baixos nos óleos usados podem estar relacionados com o teor de subprodutos formados ao longo das frituras. Embora estes rendimentos não sejam tão altos quanto desejado, já representam um grande avanço na sustentabilidade do produto final.

Para o futuro será pertinente realizar um planejamento factorial diretamente com óleos usados para tentar maximizar os rendimentos de hidrólise. Por enquanto, ter um rendimento de 55% de hidrólise enzimática para o terceiro óleo mais consumido no mundo é um resultado bastante promissor, que nos mostra que devemos apostar neste tipo de economia circular.

3.2.3. Caracterização dos Detergentes

Uma vez otimizado o processo de hidrólise, passou-se à preparação dos detergentes. Para tal foram usadas as misturas hidrolisadas obtidas das reações da Figura 46, que representam 4% da massa total de detergente, adicionou-se 10% de NaOH (em relação à massa de óleo usada na mistura hidrolisada), 1.4% de SLE₂S, 1.75% de isopropanol, e a restante percentagem corresponde à massa de água.

Foram preparados seis detergentes nomeadamente para o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma virgens e usados (submetidos a 5 ciclos de frituras), e estão apresentados na Figura 47.



Figura 47 - Detergentes de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados, preparados em laboratório.

Ao longo desta secção os detergentes serão caracterizados e comparados com um detergente comercial lava-tudo da marca continente.

3.2.3.1. pH

O pH é um parâmetro importante quando se fala de um detergente, não só porque se relaciona com o poder de limpeza como também pode ou não representar um risco para a pele do utilizador que ronda um pH de 5.5. Foi medido o pH de cada detergente e o resultado está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - pH final das formulações de detergente do chão preparadas e do detergente do chão comercial.

Detergente	Colza Virgem	Colza Usado	Girassol Virgem	Girassol Usado	Palma Virgem	Palma Usado	Comercial
pH	9.27	11.54	11.63	9.16	9.10	11.86	5.10

Através dos resultados da Tabela 11 conclui-se que todos os detergentes provenientes dos óleos em estudo têm um pH acima de 9, o que é positivo porque garante que os tensoativos provenientes dos ácidos gordos permanecem desprotonados. Ainda em relação a estes detergentes, os que são constituídos por óleo de girassol têm um comportamento diferente dos restantes, ou seja, enquanto que nos óleos de colza e palma o pH do detergente se torna mais

básico quando provém de óleo usado, no óleo de girassol o pH do detergente é mais básico quando provém de óleo virgem.

Comparando o pH dos detergentes produzidos em laboratório com o comercial, existe uma grande diferença, o que é normal porque é comum em detergentes comerciais existir muitos aditivos nomeadamente para controlar o pH evitando danos quando estes detergentes entram em contacto com a pele. Geralmente detergentes com pH básico ou com pH ácido são caracterizados por serem mais eficazes a nível de desinfeção e limpeza dos espaços, no entanto, é necessário o utilizador adotar determinadas precauções como por exemplo o uso de luvas para impedir reações dermatológicas indesejadas.

3.2.3.2. Teste de Espuma

A espuma é um factor pouco importante no que diz respeito ao poder de limpeza dos detergentes. No entanto, em muitos produtos de limpeza, o facto de fazerem espuma aquando da lavagem torna-se num aspecto determinante para o utilizador.⁸⁷ Embora este seja um factor psicológico nos consumidores, as marcas continuam a investir em detergentes que façam espuma, em vez de reeducar o mercado de consumo.

A espuma ao entrar na rede de esgotos pode ter efeitos muito negativos no meio ambiente, como por exemplo o facto de restringir o contacto entre a água e o ar, dificultando a oxigenação, o que prejudica a fotossíntese necessária à vida da flora aquática. Para além disto, ainda causa danos nas estações de tratamento de águas residuais e constitui um risco microbiológico indirecto devido à possível transferência de bactérias e vírus.⁸⁸ Devido ao impacto da espuma no nosso meio ambiente, é importante que os detergentes comecem a produzir menos espuma e que se opte por detergentes com tensioativos biodegradáveis, como é o caso dos detergentes da EcoXperience.

O gráfico da Figura 48 compila os resultados do teste de espuma para os diferentes detergentes.

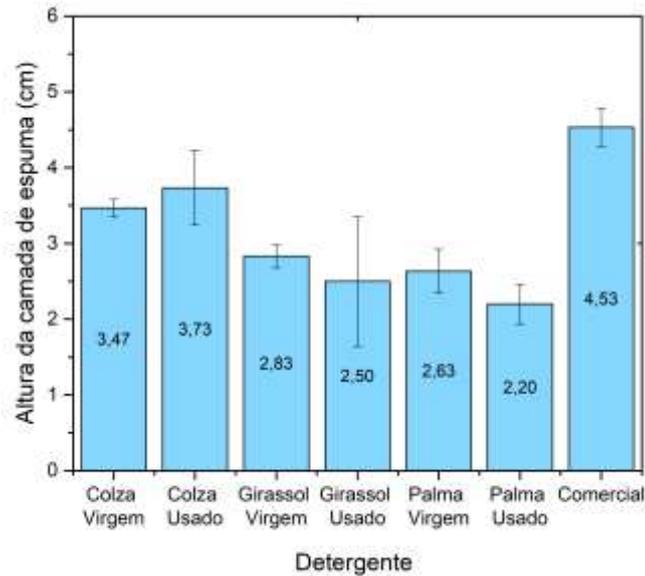


Figura 48 - Resultados obtidos para o teste da espuma para os detergentes do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados, e para um detergente comercial.

Através dos resultados da Figura 48, observa-se que o detergente comercial forma muito mais espuma do que os detergentes preparados em laboratório. Dos detergentes produzidos, os de óleo de colza são os que formam mais espuma, e os de palma formam menos. A diferença de quantidade de espuma entre óleos virgens e óleos usados não parece ser significativa.

Os grandes desvios-padrão observados no gráfico estão muito possivelmente relacionados com o facto de este ser um método com agitação manual, e por isso depender dos movimentos do utilizador, podendo não ser exatamente igual entre os diferentes replicados.

Com os resultados da Figura 48, conclui-se que os detergentes confeccionados em laboratório produzem menos espuma do que o detergente comercial e por isso têm um menor impacto ambiental.

3.2.3.3. Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação de um detergente está diretamente ligado com o seu poder de detergência, quanto mais alto é o índice, mais facilmente o detergente emulsifica a sujidade. A Figura 49 apresenta o índice de emulsificação para os detergentes em estudo ao longo de três dias.

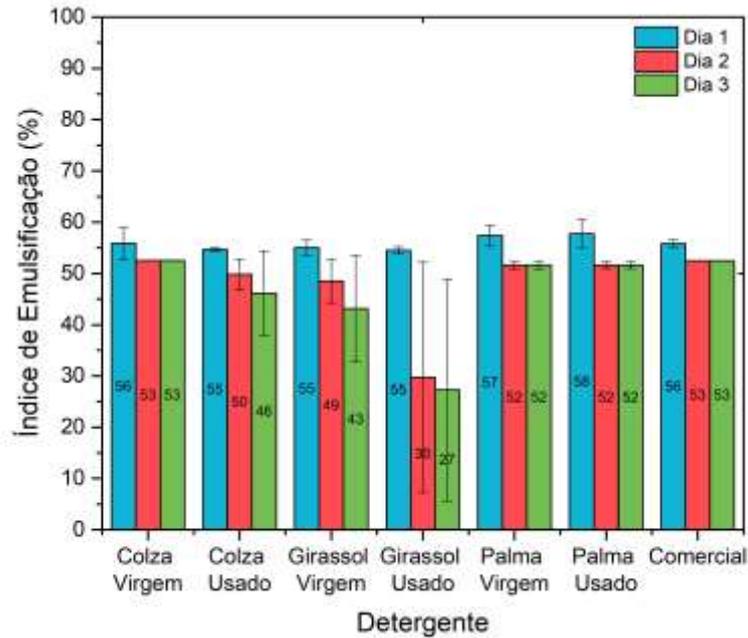


Figura 49 - Índice de emulsificação das formulações de detergente do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e do detergente do comercial, ao longo de 3 dias.

Os resultados da Figura 49 mostram que os diferentes detergentes têm índices de emulsificação bastante semelhantes entre si e semelhantes com o detergente comercial, o que é bastante positivo, uma vez que o detergente comercial não é tão rapidamente biodegradável e foi possível obter o mesmo índice de emulsificação para detergentes mais sustentáveis. Estes resultados permitem também perceber a estabilidade das emulsões, uma vez que o índice de emulsificação foi medido durante 3 dias, com medições espaçadas de 24 horas. De forma geral o índice de emulsificação apresenta um decréscimo ao longo dos dias, no entanto, não é uma diferença muito significativa, podendo-se afirmar que as emulsões são bastante estáveis. Os detergentes de óleo de girassol, mais especificamente o de óleo de girassol usado, parecem ser os menos estáveis a nível de emulsificação.

3.2.3.4. Reologia

A viscosidade dos detergentes é uma propriedade física importante, nomeadamente para os consumidores, uma vez que os produtos devem ser de fácil manuseamento e utilização. Por outro lado, os consumidores já estão habituados a determinadas viscosidades para determinados detergentes, como é o caso da alta viscosidade de um detergente lava-louça, ou da baixa viscosidade de um detergente lava-tudo. A viscosidade é portanto um factor bastante importante e que se deve ter em conta quando um produto é lançado para o mercado, pois pode ser

determinante para o sucesso comercial do mesmo. O gráfico da Figura 50 representa os resultados da viscosidade em função da tensão aplicada para os detergentes em estudo.

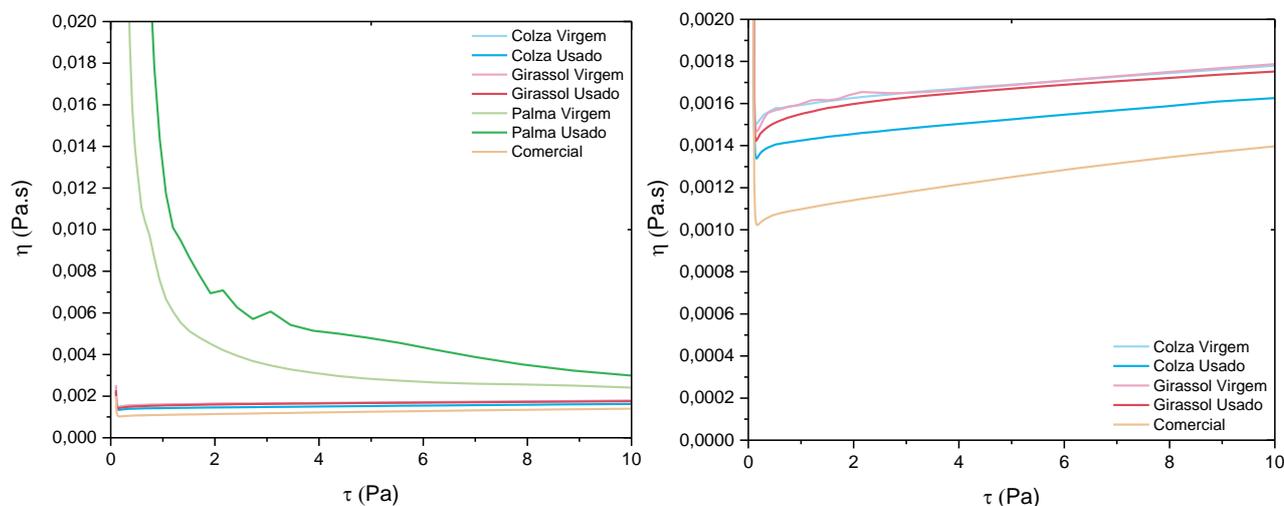


Figura 50 – Gráfico do lado esquerdo: resultados da viscosidade dos em função da tensão para os detergentes de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e para o detergente comercial. Gráfico do lado direito: ampliação da escala para os resultados dos detergentes de óleo de colza e girassol virgens e usados e para o detergente comercial.

Analisando os resultados da Figura 50, observa-se que todos os detergentes com exceção dos detergentes de óleo de palma virgem e usado, exibem um comportamento de fluido newtoniano.⁸⁹ Visivelmente, os detergentes de óleo de palma já apresentavam um aspecto mais viscoso que os restantes.

À exceção dos detergentes de óleo de palma, os detergentes em estudo apresentam viscosidades muito semelhantes, sendo o detergente comercial aquele que tem menor viscosidade, a tender para 0.00139 Pa.s, e o detergente de óleo de girassol virgem o que tem maior viscosidade a tender para 0.00178 Pa.s. São diferenças de viscosidade muito pouco significativas, sendo por isso bastante positivo que a maioria dos detergentes preparados em laboratório sejam muito semelhantes ao comercial.

3.2.3.5. Tensiometria

A tensão superficial dos detergentes é um factor muito importante para o seu poder de detergência, uma vez que baixam a tensão superficial da água, sendo por isso necessária menos energia para que os tensioativos possam ligar-se à sujidade. Quanto menor for a tensão superficial dos detergentes, mais facilmente é removida a sujidade.⁹⁰ A Figura 51 reúne os resultados da tensão superficial dos detergentes em estudo.

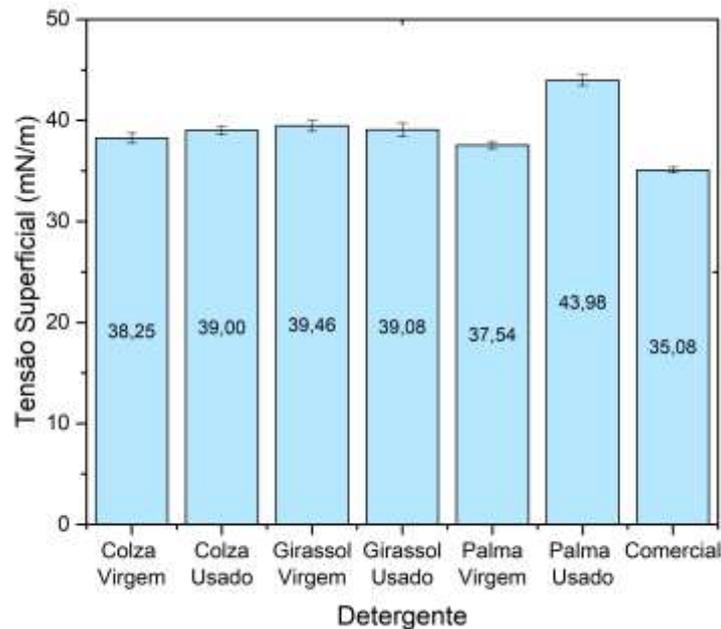


Figura 51 - Resultados para a tensão superficial das soluções de concentração 1g/L das formulações de detergente do chão de óleo de colza, girassol e palma virgens e usados e do detergente do chão comercial.

Através dos resultados do gráfico da Figura 51, observa-se que a tensão superficial é bastante semelhante para todos os detergentes em estudo, sendo que é mais alta para o detergente de óleo de palma usado (43.98 mN/m) e mais baixa para o detergente comercial (35.08 mN/m). Já seria de esperar que o detergente comercial tivesse uma tensão superficial mais baixa porque este tipo de detergente costuma ter uma lista extensa de constituintes, nomeadamente diferentes tipos de tensioativos, e quanto mais tensioativos tiver, mais baixa é a tensão superficial. Ainda assim, estes detergentes ecológicos e biodegradáveis confeccionados em laboratório conseguem ter uma tensão superficial muito semelhante à do detergente comercial.

Capítulo 4

Conclusão

4. Conclusão

Nos dias que correm, é cada vez mais emergente o tema da sustentabilidade, seja em contexto empresarial, em contexto económico ou até político. O nosso planeta está em contagem decrescente no que diz respeito à destruição dos seus ecossistemas, e só de mãos dadas com a sustentabilidade o poderemos salvar. O presente projeto científico visa contribuir um pouco mais para este mundo mais sustentável e amigo do ambiente, através da transformação de óleos alimentares usados em detergentes ecológicos.

Os óleos alimentares estudados neste trabalho foram o óleo de colza, óleo de girassol e óleo de palma, que são os mais consumidos no mundo e ainda não foram estudados para esta finalidade. Este projeto envolve uma componente computacional de dinâmica molecular para estudar o comportamento da lipase *Thermomyces Lanuginosus* nos diversos sistemas óleo/água, e uma componente experimental que passa pela caracterização físico-química dos óleos virgens e usados, otimização da reação de hidrólise enzimática, preparação dos detergentes do chão e a sua caracterização.

No que diz respeito à dinâmica molecular, aquando da análise de estabilidade das proteínas, estas demonstraram um comportamento semelhante e mantiveram-se estáveis ao longo das simulações. Foram apuradas como enzimas mais eficazes a 1EIN e 1EIN_hybrid. Uma vez submetidas a simulação com os modelos dos diferentes óleos estudados em laboratório, os resultados entre as duas enzimas não foram muito diferentes, nomeadamente no que diz respeito aos tipos de resíduos que interagem com o óleo. A proteína mutada apresentou mais interações com os triglicéridos dos óleos, no entanto, comparada com a 1EIN a diferença não parece ser assim tão grande que justifique um investimento financeiro nesta mutação experimentalmente. Para a enzima 1EIN houve mais interações com o óleo de colza a 25 °C, óleo de palma a 25 °C e com o óleo de palma a 60 °C. Já na enzima 1EIN_hybrid houve mais interações com o óleo de colza a 25 °C e a 60 °C, o óleo de girassol a 60 °C, e o óleo de palma a 60 °C. Através da dinâmica molecular concluiu-se que os diferentes óleos têm um comportamento bastante semelhante ao longo das simulações, e por isso também se espera este comportamento em laboratório. A proteína 1EIN tem um comportamento favorável ao longo da simulação, no que diz respeito a estabilidade e interações com os triglicéridos, o que leva a crer que este comportamento se reproduzirá durante a reação de hidrólise em meio laboratorial.

Relativamente à caracterização físico-química dos óleos, no índice de acidez apresentou uma tendência crescente ao longo das frituras para o óleo de girassol, e descendente para os restantes. Em relação ao índice de saponificação, o comportamento das diferentes amostras foi muito semelhante. Já no índice de iodo apesar de não haver grande diferença entre óleos virgens e usados, o óleo de palma apresentou um índice muito mais baixo que os restantes. As espectroscopias demonstraram que os óleos virgens e usados são muito semelhantes, sendo que

no FTIR foi possível identificar os principais grupos funcionais dos ácidos gordos, e o UV-Vis apresentou um espectro com as bandas esperados para as amostras em questão. De forma geral os resultados obtidos foram bastante semelhantes entre os óleos virgens e usados, corroborando com a literatura. O comportamento dos diferentes óleos também se demonstrou semelhante.

A otimização da reação de hidrólise dividiu-se em várias etapas, primeiro realizaram-se estudos cinéticos, depois foi estudado o comportamento dos óleos quando sujeitos a variações das condições de reação e por fim realizou-se o planejamento factorial. Nas duas primeiras etapas apenas se usaram os óleos virgens, uma vez que através da caracterização físico-química das amostras se concluiu que não existiam diferenças significativas de comportamento entre óleos virgens e usados. Tanto nos estudos cinéticos como no estudo de variação de parâmetros experimentais, os diferentes óleos virgens tiveram comportamentos semelhantes, sendo que para os estudos cinéticos, o maior aumento de rendimento se deu até às 5 horas de reação, e o óleo de colza exibiu um rendimento superior aos restantes óleos atingindo 65%. O estudo de variação de parâmetros da reação de hidrólise resultou num melhor rendimento para a proporção óleo/água 1:1, temperatura de 60°C, velocidade de agitação de 1500 rpm, e percentagem de Lipex entre 10% e 15%. Estes resultados foram semelhantes para todos os óleos. Posto isto, passou-se ao planejamento factorial apenas com o óleo de colza virgem, que acabou por confirmar as tendências comportamentais dos óleos durante a variação de parâmetros da reação de hidrólise. Através do planejamento factorial consideraram-se como as condições de referência para a reação de hidrólise, 5 horas, 8.75% de Lipex (m/v em relação à massa de óleo), temperatura de 60°C e proporção óleo/água 3:2. Estas condições experimentais foram aplicadas nos óleos virgens e usados, sendo que os melhores rendimentos foram obtidos para os óleos virgens. O melhor rendimento foi de 73% com o óleo de colza virgem.

Encerrada a fase de otimização da reação de hidrólise, passou-se à preparação dos detergentes a partir das misturas hidrolisadas da fase anterior. Neste caso avançou-se para o detergente do chão usando a formulação já otimizada da EcoXperience. Os detergentes obtidos foram caracterizados através de pH, teste de espuma, índice de emulsificação, viscosidade e tensão superficial. Os resultados foram comparados com os obtidos para um detergente comercial. Em relação ao pH, foi onde se verificou a maior diferença entre o detergente comercial e os preparados em laboratório, uma vez que o comercial apresenta um pH de aproximadamente 5 e os restantes apresentam pH entre 9 e 12. A altura da espuma do detergente comercial é de 4.53 cm e a das restantes formulações varia entre 2.20 cm e 3.73 cm. O índice de emulsificação é muito semelhante para todos os detergentes, embora os de óleo de girassol apresentem menor estabilidade ao longo do tempo. Em relação aos estudos reológicos concluiu-se que os detergentes de óleo de palma não exibem um comportamento de fluido newtoniano, no entanto os restantes exibem e têm viscosidades muito semelhantes, sendo que a menor é a do detergente comercial (a tender para 0.00139 Pa.s) e a maior é do detergente de girassol virgem (a tender para 0.00178 Pa.s). Em relação à tensão superficial, os detergentes também são todos muito semelhantes, sendo

que com menor tensão superficial temos o detergente comercial com 35.08 mN/m e maior o detergente de óleo de palma com 43.98 mN/m. Resumidamente, os detergentes ecológicos preparados em laboratório são bastante semelhantes ao detergente comercial.

Com este trabalho foi possível estudar e desenvolver uma nova forma de valorização para alguns dos óleos alimentares usados mais consumidos no mundo, transformando-os em detergentes, que por sua vez apresentam propriedades físico-químicas bastante semelhantes às de detergentes comerciais. Os detergentes produzidos desta forma, apresentam algumas vantagens, nomeadamente, de terem uma menor pegada de carbono na sua produção, e serem biodegradáveis, reduzindo assim o seu impacto ambiental face aos detergentes comerciais, constituídos por surfactantes de origem petroquímica, quando descartados.

Referências

1. <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> acessado a 25 de março de 2020.
2. <https://bit.ly/38lsUoY> acessado a 25 de março de 2020.
3. Wallace, T., Gibbons, D., O'Dwyer, M. & Curran, T. P. International evolution of fat, oil and grease (FOG) waste management – A review. *J. Environ. Manage.* **187**, 424–435 (2017).
4. Redmond, J., Walker, E. & Wang, C. Issues for small businesses with waste management. *J. Environ. Manage.* **88**, 275–285 (2008).
5. https://ec.europa.eu/environment/waste/oil_index.htm acessado a 17 de novembro de 2020.
6. Tang, D. *et al.* Ecological response of phytoplankton to the oil spills in the oceans. *Geomatics, Nat. Hazards Risk* **10**, 853–872 (2019).
7. Zhang, B. *et al.* (2018). *World Seas: an Environmental Evaluation*. 2nd Edition, Elsevier Ltd.
8. Bucas, G. & Saliot, A. Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 1388–1396 (2002).
9. <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html> acessado a 17 de novembro de 2020.
10. Salimon, J., Salih, N. & Yousif, E. Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals. *Arab. J. Chem.* **5**, 135–145 (2012).
11. Lopes, M., Miranda, S. M. & Belo, I. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production—a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **50**, 2583–2616 (2020).
12. Feng, G. *et al.* An efficient bio-based plasticizer for poly (vinyl chloride) from waste cooking oil and citric acid: Synthesis and evaluation in PVC films. *J. Clean. Prod.* **189**, 334–343 (2018).
13. Orjuela, A. & Clark, J. Green chemicals from used cooking oils: Trends, challenges, and opportunities. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **26**, 100369 (2020).
14. Canakci, M. & Sanli, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 431–441 (2008).
15. <https://quercus.pt/fileiras-residuos/3617-oleos-alimentares-usados> acessado a 26 de março de 2020.
16. Mandolesi De Araújo, C. D., De Andrade, C. C., De Souza E Silva, E. & Dupas, F. A. Biodiesel production from used cooking oil: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **27**, 445–452 (2013).
17. Félix, S., Araújo, J., Pires, A. M. & Sousa, A. C. Soap production: A green prospective. *Waste Manag.* **66**, 190–195 (2017).
18. Mota, C. J. A., Silva, C. X. A. D. & Gonçalves, V. L. C. Liceroquímica: Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quim. Nova* **32**, 639–648 (2009).
19. Long, J. H., Aziz, T. N., Reyes, F. L. D. L. & Ducoste, J. J. Anaerobic co-digestion of fat,

- oil, and grease (FOG): A review of gas production and process limitations. *Process Saf. Environ. Prot.* **90**, 231–245 (2012).
20. Queiroz, A. A., Martins, J. A. S. & Cunha, J. P. R. A. Adjuvantes E Qualidade Da Água Na Aplicação De Agrotóxicos. *Biosci. J.* **24**, 8–19 (2008).
 21. Agência Portuguesa do Ambiente. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. *Gestão de Óleos Alimentares Usados*. Nota técnica conjunta. 1–8 (2019).
 22. Mba, O. I., Dumont, M. J. & Ngadi, M. Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry - A review. *Food Biosci.* **10**, 26–41 (2015).
 23. Aider, M. & Barbana, C. Canola proteins: Composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 21–39 (2011).
 24. Ghazani, S. M. & Marangoni, A. G. Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: A review. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 923–932 (2013).
 25. Szydłowska-Czerniak, A. Rapeseed and its Products-Sources of Bioactive Compounds: A Review of their Characteristics and Analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 307–330 (2013).
 26. Canola Council of Canada. Canola Seed and Oil Processing. *Ted Mag.*
 27. Arshad, M. & Amjad, M. Medicinal Use of Sunflower Oil and Present Status of Sunflower in Pakistan : A Review Study. *Sci. Tech. Dev.* **31**, 99–106 (2012).
 28. <https://www.statista.com/statistics/263928/production-of-sunflower-seed-since-2000-by-major-countries/> acedido a 18 de abril de 2020.
 29. Raß, M., Schein, C. & Matthäus, B. Virgin sunflower oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **110**, 618–624 (2008).
 30. Ayerdi, G. A. & Larbi, R. Effects of refining process on sunflower oil minor components : a review. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids.* **23**, 1-10 (2016).
 31. <http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm#TopOfPage> acedido a 18 de novembro de 2020.
 32. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº 106/2005 de 29 de junho. *Diário Da República — I Série-a Nº 123*, 4034–4042 (2005).
 33. Gunstone, F. (2002). *VEGETABLE OILS IN FOOD TECHNOLOGY: Composition, Properties and Uses*. Blackwell Publishing Ltd.
 34. Ziaififar, A. M., Achir, N., Courtois, F., Trezzani, I. & Trystram, G. Review of mechanisms, conditions, and factors involved in the oil uptake phenomenon during the deep-fat frying process. *Int. J. Food Sci. Technol.* **43**, 1410–1423 (2008).
 35. Nayak, P. K., Dash, U., Rayaguru, K. & Krishnan, K. R. Physio-Chemical Changes During Repeated Frying of Cooked Oil: A Review. *J. Food Biochem.* **40**, 371–390 (2016).
 36. Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B. & Lindman, B. (2004). *Surfactant Micellization. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
 37. Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology*. 3rd Edition, John Wiley & Sons Inc. Hoboken.
 38. Hamberger, A. & Landfester, K. Influence of size and functionality of polymeric nanoparticles on the adsorption behavior of sodium dodecyl sulfate as detected by

- isothermal titration calorimetry. *Colloid Polym. Sci.* **289**, 3–14 (2011).
39. Lombardo, D., Kiselev, M. A., Magazù, S. & Calandra, P. Amphiphiles self-assembly: Basic concepts and future perspectives of supramolecular approaches. *Adv. Condens. Matter Phys.* 1–22 (2015).
 40. Stache, H. Introduction and Historical Review. *Acta Med. Scand.* **106**, 7–20 (1941).
 41. Smulders, E. (2013). *Laundry Detergents*. volume 3. Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim.
 42. Holmberg, K. Interactions between surfactants and hydrolytic enzymes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **168**, 169–177 (2018).
 43. <https://bit.ly/2IesSUS> acedido a 10 de abril de 2020.
 44. Bhairi, S. M. & Mohan, C. A Guide to the properties and uses of Detergents in biology and biochemistry. *Calbiochem*. 1–42 (2001)
 45. Abdelmoez, W. & Mustafa, A. Oleochemical industry future through biotechnology. *J. Oleo Sci.* **63**, 545–554 (2014).
 46. Skjold-Jørgensen, J., Vind, J., Svendsen, A. & Bjerrum, M. J. Lipases That Activate at High Solvent Polarities. *Biochemistry* **55**, 146–156 (2016).
 47. Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **62**, 197–212 (2010).
 48. Gelb, M. H., Min, J. H. & Jain, M. K. Do membrane-bound enzymes access their substrates from the membrane or aqueous phase: Interfacial versus non-interfacial enzymes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1488**, 20–27 (2000).
 49. Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. & Miller, R. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **147–148**, 237–250 (2009).
 50. Skjold-Jørgensen, J., Vind, J., Svendsen, A. & Bjerrum, M. J. Altering the activation mechanism in *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Biochemistry* **53**, 4152–4160 (2014).
 51. Willems, N., Lelimosin, M., Skjold-Jørgensen, J., Svendsen, A. & Sansom, M. S. P. The effect of mutations in the lid region of *Thermomyces lanuginosus* lipase on interactions with triglyceride surfaces: A multi-scale simulation study. *Chem. Phys. Lipids* **211**, 4–15 (2018).
 52. Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H. & Shaw, D. E. Biomolecular Simulation: A Computational Microscope for Molecular Biology. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 429–452 (2012).
 53. Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G. & Andricopulo, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*. **20**, 13384–13421 (2015).
 54. Ingólfsson, H. I. *et al.* The power of coarse graining in biomolecular simulations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **4**, 225–248 (2014).
 55. Marrink, S. J. & Tieleman, D. P. Perspective on the martini model. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6801–6822 (2013).
 56. Filipe, H. A. L., Esteves, M. I. M., Henriques, C. A. & Antunes, F. E. Effect of Protein Flexibility from Coarse-Grained Elastic Network Parameterizations on the Calculation of Free Energy Profiles of Ligand Binding. *J. Chem. Theory Comput.* **16**, 4734–4743 (2020).
 57. Periolo, X., Cavalli, M., Marrink, S. J. & Ceruso, M. A. Combining an elastic network with a coarse-grained molecular force field: Structure, dynamics, and intermolecular

- recognition. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 2531–2543 (2009).
58. Díaz-Cruz, J. *et al.* (2019). *Chemometrics in Electroanalysis*. Springer Nature Switzerland.
 59. Müller, A. *et al.* (2020). *Design of experiments and method development*. Elsevier.
 60. Abraham, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Elsevier*. **1–2**, 19–25 (2015).
 61. Marrink, S. J., *et al.* The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **111**, 7812–7824 (2007).
 62. Berendsen, H. J. C., *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
 63. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, (2007).
 64. M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, GROMACS User Manual version 5.1.4, www.gromacs.org (2016).
 65. Regulamento (CEE) N.º 2568/91 da Comissão de 11 de Julho de 1991 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados. 1–137 (2011).
 66. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-tec> acessado a 10 de novembro de 2020.
 67. Stuart, B. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. volume 53. John Wiley & Sons, Ltd.
 68. Owen, T. (2000). *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*. Agilent Technologies.
 69. De Caro, C. UV / VIS Spectrophotometry. *Mettler-Toledo Int.* 4–14 (2015).
 70. Paquot, C. (1982). *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 6th Edition, Pergamon Press.
 71. Zheng, C. *et al.* Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 44–51 (2012).
 72. Rao, M. (2007). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods Principles and Applications*. 2nd Edition, Springer Science+Business Media, LLC. Washington.
 73. O’Callaghan, D. J. & Guinee, T. P. Rheology and Texture of Cheese BT - Starter cultures: General aspects. *Cheese - Chem. Phys. Microbiol.* **1**, 511–540 (2004).
 74. Ullmann, K., Poggemann, L., Nirschl, H. & Lenewit, G. Adsorption process for phospholipids of different chain lengths at a fluorocarbon/water interface studied by Du Noüy ring and spinning drop. *Colloid Polym. Sci.* **298**, 407–417 (2020).
 75. Hall, A., Repakova, J. & Vattulainen, I. Modeling of the triglyceride-rich core in lipoprotein particles. *J. Phys. Chem. B.* **112**, 13772–13782 (2008).
 76. Chen, W. *et al.* Lipase-catalyzed hydrolysis of linseed oil: Optimization using response surface methodology. *J. Oleo Sci.* **63**, 619–628 (2014).
 77. Vescovi, V. *et al.* Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel by Hydrolysis of Waste

- Cooking Oil Followed by Esterification of Free Fatty Acids. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* **93**, 1615–1624 (2016).
78. Albino, C. S. S. (2016). *Produção de sabão líquido a partir de óleo alimentar usado para utilização na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*. Tese de Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.
 79. Saguy, I. S. & Dana, D. Integrated approach to deep fat frying: Engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J. Food Eng.* **56**, 143–152 (2003).
 80. Zhang, Q. *et al.* Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chem.* **132**, 1607–1613 (2012).
 81. Dantas, M. B. *et al.* Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel. *Fuel* **90**, 773–778 (2011).
 82. Kulås, E. & Ackman, R. G. Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1724–1729 (2001).
 83. Oliveira, I. (2013). *Estudo da Degradação Térmica de Misturas dos Óleos da Macaúba (crocómia aculeata) por Espectroscopia Molecular*. Tese de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Federal da Grande Dourados.
 84. Wan, L. *et al.* Effect of barrel temperature and moisture content on the composition and oxidative stability of extruded palm oil in an oil-starch model system. *Lwt* **98**, 398–405 (2018).
 85. Réblová, Z. *et al.* Effect of rosemary extracts on the stabilization of frying oil during deep fat frying. *J. Food Lipids* **6**, 13–23 (1999).
 86. Marmesat, S. *et al.* Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites* **60**, 155–160 (2009).
 87. Chen, Y. F., *et al.* Foam properties and detergent abilities of the saponins from *Camellia oleifera*. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 4417–4425 (2010).
 88. Tsoler, U. (2004). *Handbook of Detergents*. Taylor & Francis Routledge.
 89. Wang, Q. J., Chung, Y. W. (2013). *Encyclopedia of Tribology*. Springer Science+Business Media. New York.
 90. Wang, Z., Shen, Y., Ma, J. & Haapasalo, M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J. Endod.* **38**, 948–953 (2012).