

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA UTILIZANDO
SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO EM SISTEMAS LIVRE DE
SOLVENTE**

ALEXSANDRA VALÉRIO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

MARÇO DE 2009
ERECHIM, RS - BRASIL

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA UTILIZANDO SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO EM SISTEMAS LIVRE DE SOLVENTE

Alexsandra Valério

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Débora de Oliveira, D. Sc.
Orientador

Prof. José Vladimir de Oliveira, D. Sc.
Orientador

Prof. Marco Antônio Zachia Ayubi ,D. Sc.

Prof. Helen Treichel, D. Sc.

Erechim, 11 de março de 2009

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*Este trabalho é dedicado a todos aqueles
que acreditaram e que estiveram
verdadeiramente ao meu lado, sem
interesses, trapaças, mentiras ou
manipulações.*

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, todos que trabalham com pesquisa, sabem que sozinhos não o fazem. O resultado deste trabalho só foi possível pela ajuda de algumas pessoas as quais desejo expressar aqui os meus sinceros agradecimentos.

Inicialmente agradeço aos meus orientadores Débora e Vladimir pela orientação, ajuda e por acreditarem no meu trabalho. As minhas bolsistas Suzi, Mel e Manu que ajudaram na parte experimental e mais que isso foram amigas.

Quero agradecer aos colegas do mestrado pela amizade e boas risadas nas aulas. Aos colegas do Laboratório de Termodinâmica por tornarem meus dias mais felizes e meu trabalho mais agradável! Aos bons amigos que fiz neste período, principalmente a Cris, Clarisse, Clari, Élton, Sté, Gustavo, Marcus, Lisa e a Roberta os quais estiveram sempre ao meu lado e que sempre estarão em meu coração.

Aproveito para agradecer também a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a minha formação. Especialmente aos professores Marcos e Fernanda Corazza que foram além de tudo grandes amigos e mesmo sem saber me deram a mão e ajudaram quando eu mais precisei. Obrigado Família Corazza!!!

Agradeço muito a minha família, que sempre me deu força e incentivo e que mesmo longe esteve sempre em pensamento e em meu coração, ao meu namorado Jarbas que me apoiou e que esteve sempre ao meu lado quando a vida se mostrou cruel.

Agradeço a todos que de alguma forma estiveram comigo me ajudando ou não e foi principalmente com estes que aprendi muito sobre a vida e sobre as pessoas o que possibilitou ainda mais meu amadurecimento.

Obrigada!!

“Saímos pelo mundo em busca de nossos sonhos. Mesmo nos afastando do caminho, a certeza de que um dia o encontraremos nos dá força para continuar lutando, pois quando trilhamos o caminho escolhido na busca de plenitude o universo conspira para isso”.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA UTILIZANDO SURFACTANTES DE GRAU ALIMENTÍCIO EM SISTEMAS LIVRE DE SOLVENTE

Alexsandra Valério

Março/2009

Orientadores: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

Este trabalho reporta a glicerólise enzimática do óleo de oliva com um lipase imobilizado (Novozym 435) usando os surfactantes Tween 40, Tween 65, Tween 80, Tween 85, Triton X-100 e lecitina de soja como surfactantes em sistema livre de solvente. Inicialmente, foram escolhidos os melhores surfactantes para a produção de MAG e DAG sob condição operacional preestabelecida em 2 horas de reação. Em seguida, um planejamento de experimentos foi utilizado para otimizar a produção de MAG e DAG usando os surfactantes Tween 65 e Triton X-100. Os resultados obtidos no segundo planejamento mostraram que a melhor condição experimental para os surfactantes foi razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1 (mol/mol), 70°C, 600rpm, 16% (m/m) de surfactante e 9,0% (m/m) de enzima imobilizada em duas horas de reação, possibilitando a obtenção de 37,4% e 41,8% de MAG+DAG para o surfactante Triton X-100 e Tween 65, respectivamente. A partir destas condições efetuou-se um estudo cinético avaliando os efeitos das concentrações de enzima imobilizada, surfactante, razão molar glicerol:óleo de oliva e temperatura na conversão em MAG e DAG. Os resultados obtidos na avaliação cinética mostraram que temperaturas amenas, excesso de glicerol, concentrações intermediárias de enzima e de surfactante conduzem à maiores conversões de MAG e DAG.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

ENZYMATIC GLYCEROLYSIS OF THE OLIVE OIL IN THE PRESENCE OF SURFACTANT FOOD GRADE IN SYSTEM SOLVENT FREE

Alexsandra Valério

March/2009

Advisors: Débora de Oliveira

José Vladimir de Oliveira

This work reports solvent-free enzymatic glycerolysis of olive oil with an immobilized lipase (Novozym 435) using Tween 40, Tween 65, Tween 80, Tween 85, Triton X-100 and soy lecithin as surfactants. The first step was the screening of two better surfactants for MAG and DAG production with a pre-established operating condition and reaction time of 2 hours. Afterwards, a sequential experimental design strategy was carried out in order to optimize MAG and DAG production using Tween 65 and Triton X-100 as surfactants. Then, the operating condition that optimized MAG and DAG yield were determined as being 70°C, stirring rate of 600 rpm, glycerol:olive oil molar ratio of 6:1, 16 wt% of surfactant and 9.0 wt% of Novozym 435, leading to a content of 37.4 wt% and 41.8 wt% of MAG and DAG, respectively to Triton X-100 and Tween 65. From these conditions, kinetics study was accomplished to evaluate the effects of immobilized enzyme and surfactant concentrations, glycerol:olive oil molar ratio and temperature. The results obtained in the kinetic study showed that intermediary temperatures, glycerol excess, intermediary concentrations of enzyme and surfactant lead to higher MAG and DAG content.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Óleos e gorduras	15
2.2 Monoglicerídeos	17
2.3 Diglicerídeos	18
2.4 Glicerol	19
2.5 Enzimas como catalisadores	20
2.5.1 Lipases	21
2.5.2 Características, propriedades e aplicações das lipases	22
2.6 Glicerólise	23
2.6.1 Glicerólise enzimática	24
2.7 Surfactantes	26
2.8 Microemulsões e Sistemas micelares	28
2.9 Considerações Finais	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Especificações dos materiais	31
3.2 Métodos	32
3.2.1 Descrição do aparato experimental	32
3.2.2 Procedimento experimental	33
3.2.3 Determinação do conteúdo de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos.	33
3.2.4 Determinação da atividade enzimática	34
3.2.5 Estratégia seqüencial de planejamento experimental	35
3.2.6 Avaliação do pH da reação	36
3.2.7 Avaliação da cinética reacional para produção de MAG	37
3.2.8 Determinação da taxa inicial da reação	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Avaliação do tipo de surfactante utilizado na glicerólise enzimática	39
4.2 Avaliação da atividade enzimática	43
4.3 Avaliação do pH da reação na produção de MAG+DAG	45

4.4	Otimização da produção de MAG+DAG utilizando Tween 65 e Triton X-100 como surfactantes	49
4.5	Estudo cinético da glicerólise enzimática para produção de MAG e DAG em sistema livre de solvente	63
4.5.1	Efeito da concentração de enzima imobilizada na produção de MAG+DAG	65
4.5.2	Efeito do teor de surfactante Triton X-100 na produção de MAG+DAG	69
4.5.3	Efeito da temperatura na produção de MAG+ DAG	73
4.5.4	Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva na produção de MAG e DAG	77
4.6	Considerações finais	81
5	CONCLUSÕES E sugestões	82
5.1	CONCLUSÕES	82
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRAFICAS	96
	APÊNDICE B	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação de uma molécula de triglicerídeo.....	16
Figura 2 - Formação da molécula de monoglicerídeo.....	18
Figura 3 – Tipos de Microemulsões; a) Água/Óleo (micela reversa); b) Óleo/Água.....	29
Figura 4 - Vista da unidade experimental utilizada na reação de glicerólise enzimática.	32
Figura 5 - Avaliação do pH dos sistemas reacionais utilizando os surfactantes Tween 80 (A), Tween 40 (B), Tween 65 (C) e Tween 85 (D) em 120 minutos de reação sob condições reacionais de 70°C, razão molar glicerol:óleo 2:1, 16% (m/m) de surfactante, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada e 600rpm.....	46
Figura 6 - Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis no conteúdo de MAG+DAG no primeiro planejamento de experimentos utilizando Tween 65 como surfactante	51
Figura 7 - Superfície de resposta e curva de contorno para o conteúdo de MAG (%) em função da concentração de enzima imobilizada e Triton X-100 (A), enzima imobilizada e razão molar glicerol:óleo de oliva (B) e razão molar glicerol:óleo e Triton X-100 (C).....	56
Figura 8 - Superfície de resposta e curva de contorno para o conteúdo de MAG (%) em função da concentração de enzima imobilizada e Tween 65 (A), enzima imobilizada e razão molar glicerol:óleo de oliva (B) e razão molar glicerol:óleo e Tween 65 (C).....	60
Figura 9 - Perfil de consumo dos substratos e formação dos produtos no estudo cinético. Condição reacional: razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1 (mol/mol), concentração de Triton X-100 16% (m/m), concentração de enzima imobilizada 9% (m/m), 600rpm e 70°C.....	64
Figura 10 - Efeito da concentração de enzima imobilizada na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1, 16% (m/m) de Triton X-100.	66
Figura 11 - Efeito da concentração de enzima no conteúdo de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de Triton X-100 16% (m/m).....	68
Figura 12 - Efeito da concentração de Triton X-100 na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1 e 9% de enzima imobilizada.	70

Figura 13 - Efeito da adição de Triton X-100 no conteúdo de MAG+DAG em 45 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de enzima imobilizada 9% (m/m).	72
Figura 14 - Efeito da temperatura na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1, 9% (m/m) de enzima imobilizada e 16% (m/m) de Triton X-100.	74
Figura 15 - Efeito da temperatura na produção de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de enzima imobilizada de 9% (m/m) e 16% (m/m) de Triton X-100.	76
Figura 16 - Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, 9% (m/m) de enzima imobilizada e 16% (m/m) de Triton X-100.	78
Figura 17 - Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva no conteúdo de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, 600rpm, concentração de enzima imobilizada de 9% (m/m) e 16% (m/m) de Triton X-100.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.	27
Tabela 2. Nível das variáveis investigadas no primeiro e segundo planejamento de experimentos.	36
Tabela 3. Conteúdo de MAG, DAG, MAG+DAG e TAG obtidos usando diferentes surfactantes. Condição reacional: 600rpm, 70°C, razão molar glicerol:óleo de oliva 2:1, 7,5% (m/m) enzima imobilizada e 16% (m/m) surfactante (FIAMETTI, 2008).....	40
Tabela 4. Surfactantes não-iônicos e valor do balanço hidrofílico-lipofílico teórico.	43
Tabela 5. Atividade enzimática em função do surfactante utilizado.....	44
Tabela 6. Conteúdo de MAG, DAG, MAG+DAG e TAG obtidos na reação de glicerólise em pH 7,0 (A) e pH 5,0 (B) utilizando como condição reacional 70°C, razão molar glicerol:óleo 2:1, 16% (m/m) de surfactante, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada, 600rpm em 2 horas de reação.	47
Tabela 7. Matriz do primeiro planejamento experimental completo (valores reais e codificados) em termos de MAG+DAG usando Tween 65 e Triton X-100 como surfactante. Condição experimental: 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.	50
Tabela 8. Matriz do segundo planejamento fatorial 2^3 completo com pontos axiais (valores reais e codificados) com as respostas do conteúdo de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG usando Triton X-100 como surfactante. Condição experimental 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.....	53
Tabela 9. Coeficientes e probabilidade (p) do modelo para a glicerólise enzimática do óleo de oliva utilizando Triton X-100 como surfactante.	54
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para o conteúdo de MAG+DAG.	55
Tabela 11. Matriz do segundo planejamento fatorial 2^3 completo com pontos axiais (valores reais e codificados) com as respostas do conteúdo de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG usando Tween 65 como surfactante. Condição experimental 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.....	58
Tabela 12. Coeficientes e probabilidade (p) do modelo para a glicerólise enzimática do óleo de oliva utilizando Tween 65 como surfactante.	59
Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para o conteúdo de MAG+DAG.	59

Tabela 14. Validação experimental do modelo predito usando Tween 65 e Triton X-100 como surfactantes em termos de MAG+DAG.....	62
Tabela 15. Taxa inicial de reação em função da concentração de enzima imobilizada.	69
Tabela 16. Taxa inicial de reação em função da concentração de Triton X-100.....	73
Tabela 17. Taxa inicial de reação em função da variável temperatura.....	77
Tabela 18. Taxa inicial de reação em função da razão molar glicerol:óleo de oliva.	81

1 INTRODUÇÃO

A atual situação mundial e a urgente necessidade de encontrar soluções para as grandes crises de escassez que são previstas para um futuro não distante, provocaram o rápido avanço em pesquisas que visam o desenvolvimento de tecnologias limpas, assim como a busca por combustíveis alternativos provindos de fontes renováveis, como o biodiesel.

Com a rápida expansão da produção de biodiesel vem um excesso de glicerina bruta. E como consequência, a necessidade de encontrar um destino para toda a glicerina gerada da produção de biodiesel, assim como a vinda de outras fontes como a indústria de sabão. Um crescente interesse que vem surgindo é a síntese de monoglicerídeos (MAG) a partir de rotas envolvendo o glicerol. Segundo KIRK-OTHMER (2007) a demanda pela glicerina vem crescendo mais nos mercados de uso pessoal, higiene dental e alimentos, onde o produto tem maior pureza e valor agregado, correspondendo a 64% do total da glicerina utilizada em diferentes áreas.

O governo do Canadá planejou produzir 500 milhões de litros de biodiesel por ano até 2010. Isto significaria cerca de 55,4 milhões de litros de glicerol/ano só no mercado canadense. Na reação de transesterificação do óleo de canola, por exemplo, são obtidos aproximadamente 90% de ésteres de metil (biodiesel) e o restante 10% consiste no subproduto glicerol (LANG et al., 2001).

Monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG) representam uma importante classe de emulsificantes na indústria de alimentos e farmacêutica. Na indústria de alimentos são amplamente utilizados como emulsificantes principalmente em produtos de panificação, margarinas e produtos da indústria leiteira. Na indústria de cosméticos, os MAG são usados como agentes de textura em cremes, pastas e loções (BORNSCHEUER, 1995). Na área da saúde, os DAG são classificados como alimentos funcionais que auxiliam principalmente no combate à altas taxas de colesterol e triglicérides (SEONG-KOON et al., 2007). Com base na ampla utilização em diferentes áreas, a produção de MAG e DAG vem recebendo grande atenção nas últimas duas décadas.

Industrialmente, os MAG são produzidos via glicerólise química de óleos e gorduras. No entanto, esta reação requer o uso de altas temperaturas, em torno de 250°C, na presença de catalisador alcalino (SONTAG, 1982). Algumas limitações desse processo são os baixos rendimentos, alto custo energético para a reação e a necessidade de alto capital de investimento (YANG et al., 2005b). DAG são obtidos via reações enzimáticas utilizando como catalisador geralmente uma lipase 1,3-específica. Industrialmente a produção de DAG ainda é limitada devido ao baixo rendimento e a complexidade do processo (SEONG-KOON et al., 2007).

Por se tratarem de aditivos utilizados na indústria de alimentos é indispensável que o produto obtido na reação, no caso os MAG e DAG, apresentem alto grau de pureza. A produção de MAG ou DAG por rotas químicas apresenta produtos de coloração escura, aroma indesejável e baixa pureza, o que requer uma etapa posterior de purificação (FERREIRA-DIAS et al, 2001). Assim, surge o grande interesse em estudos para obtenção principalmente de MAG através de síntese enzimática.

As principais vantagens destes processos que tem como catalisador da reação uma enzima são as condições amenas tanto de temperatura, próximas a temperatura ambiente, quanto de pH, próximo a neutralidade. Essas condições diminuem o custo energético da reação, diminuem a formação de subprodutos da reação, minimizando também a formação de produto com características indesejáveis, como a coloração escura e aroma desagradável, assim como possibilita a obtenção de monoglicerídeo em maiores rendimentos e concentrações (ROSU et al., 1997; RENDO'N et al., 2000; FERREIRA-DIAS et al., 2003).

A combinação dos componentes envolvidos na produção de MAG e DAG através da glicerólise enzimática apresenta um fator limitante devido à natureza polar do glicerol e apolar dos óleos vegetais, levando tais compostos a apresentar miscibilidade bastante limitada (KAEWTHONG & H-KITTIKUN, 2004). Uma alternativa para dispersar o glicerol no óleo é utilizar uma molécula com característica anfifílicas, ou seja, a utilização de um agente tensoativo ou surfactante. O surfactante, por sua característica molecular, tem a capacidade de formar sistemas micelares. Reações catalisadas por lipases normalmente ocorrem

em interfaces, sendo assim, a área interfacial e a qualidade da interface são variáveis importantes na taxa de reação (BALASHEV et al., 2001). O uso de intensa agitação mecânica e emulsificantes em reatores ajudam a promover o aumento da área interfacial. Com a formação de microemulsões, o meio reacional glicerol/óleo/enzima torna-se mais atrativo para a produção de MAG e DAG.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal investigar o processo de produção de MAG e DAG a partir da reação de glicerólise enzimática com óleo de oliva usando diferentes surfactantes com grau alimentício como agente tensoativos em sistema livre de solvente.

Especificamente, os objetivos deste trabalho podem ser sumarizados em:

1. Estudo de diferentes surfactantes de grau alimentício na produção de mono e diglicerídeos;
2. Avaliação da atividade enzimática do catalisador ao final da glicerólise;
3. Estudo do comportamento do pH do meio reacional e avaliação da influência da alteração do pH no conteúdo de MAG e DAG obtido ao final da reação;
4. Estudo do efeito das variáveis de processo como razão molar glicerol/óleo, concentração de enzima imobilizada e de surfactante para a produção de MAG e DAG através do uso da técnica de planejamento de experimentos;
5. Estudo cinético da reação na condição experimental selecionada na etapa anterior.

O presente trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: o capítulo 2 apresenta o estado da arte concernente à produção de MAG e DAG abordando as características de cada composto assim como as rotas de produção e vantagem da utilização de catalisadores enzimáticos no sistema reacional. No capítulo 3 os materiais e métodos são explicitados. No capítulo 4 são apresentadas as discussões referentes aos resultados encontrados ao longo do trabalho. Por fim, o capítulo 5 apresenta as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo tem como objetivo contextualizar os principais interesses e a relevância no qual o trabalho se insere. A seguir será apresentada uma breve explanação sobre a produção de MAG e DAG através da reação de glicerólise de óleos e gorduras, mostrando a ampla aplicação dos produtos desta reação. Posteriormente serão ressaltados os principais aspectos da glicerólise, assim como as características do catalisador enzimático, as vantagens de sua utilização e o relato de alguns trabalhos relacionados à glicerólise enzimática. Neste capítulo também serão brevemente contextualizadas algumas definições com relação a microemulsões, sistemas micelares e emulsionantes.

2.1 Óleos e gorduras

Óleos e gorduras são classificados como lipídeos e são reconhecidos como nutrientes essenciais tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal. Além de serem uma das fontes de energia utilizadas na alimentação também agem como veículo para vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, assim como são uma excelente fonte de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico, contribuindo para a palatabilidade dos alimentos (ZILLER, 1996).

Por definição, os lipídeos podem ser divididos em duas classes de compostos, os mais simples como ácidos graxos, acilgliceróis (MAG, DAG e triglicerídeos (TAG)) e lipídeos mais complexos como as ceras, fosfolipídeos, esfingolipídeos, lipoproteínas, esteróis e vitaminas lipossolúveis. Na natureza, estes ácidos graxos são encontrados na forma de triglicerídeos, que são moléculas formadas a partir de uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos (Figura 1), sendo este o principal constituinte da maioria dos óleos e gorduras (O'KEEFE, 1998).

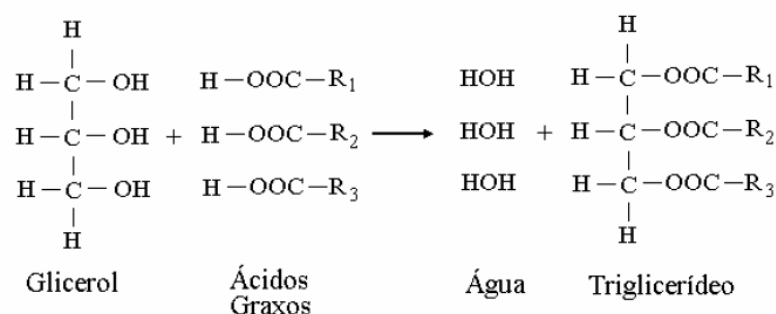


Figura 1 - Formação de uma molécula de triglicerídeo.

No entanto, os lipídeos assim como encontrados na natureza têm sua aplicação industrial limitada devido à distribuição e composição de seus ácidos graxos, sendo necessário submetê-los a processos de modificação antes de sua utilização, tais como hidrogenação, interesterificação e fracionamento, para que as características físico-químicas sejam alteradas (ROUSSEAU & MARANGONI, 1998). Dentre os óleos e gorduras, o óleo de oliva produzido a partir da azeitona, fruto da oliveira, tem ganhado grande destaque principalmente nas áreas relacionadas à saúde. As principais características deste óleo são as altas quantidades de gordura insaturada e por ser rico em polifenóis (antioxidantes) e ácido oléico (70%) (APARICIO & HARWOOD, 2003; GARCÍA-MESA et al., 2008).

Os principais ácidos graxos presentes no azeite de oliva são: ácido oléico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1) e ácido esteárico (C18:0). Outros ácidos graxos, como o ácido linolênico (C18:3), normalmente estão presentes na constituição do azeite de oliva, mas em quantidades inferiores a 1% (Codex Alimentarius, 2003). Já os compostos não glicerídicos incluem os hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, ceras, ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos, esteróis, álcoois e diálcoois triterpênicos e outros constituintes e contaminantes, tais como fenóis e metais (RUIZ-GUTIERREZ & PÉREZ-CAMINO, 2000).

Atualmente, os processos mais importantes e utilizados na modificação de óleos e gorduras podem ser citados como sendo a glicerólise, a hidrólise de triglicerídeos e a esterificação direta do glicerol com ácidos graxos livres e visam a

quebra dos triglicerídeos em ácidos graxos de cadeias menores, ou seja, a produção de monoglicerídeos (POUILLoux et al., 1999).

2.2 Monoglicerídeos

Monoglicerídeos são cadeias formadas por uma molécula de glicerol ligada a uma molécula de ácido graxo. Atualmente, há no Brasil uma grande demanda por MAG de alta concentração devido a suas excelentes propriedades emulsificantes, pois sua cadeia apresenta um balanço hidrofílico-hidrofóbico em suas estruturas (sendo o glicerol hidrofílico e o ácido graxo hidrofóbico), fazendo com que possuam importantes aplicações industriais. No entanto, apesar do grande número de indústrias consumidoras deste tipo de produto no país, não há conhecimento de nenhum fabricante nacional (FERREIRA-DIAS et al., 2001).

Monoglicerídeos representam uma importante classe de emulsificantes na indústria de alimentos e farmacêutica, representando cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados. Na indústria de alimentos são amplamente utilizados em produtos de panificação, margarinas e produtos da indústria leiteira. Na indústria cosmética, MAG são usados como agentes de textura em cremes, pastas e loções. Devido a sua ampla utilização, a produção de MAG vem recebendo grande atenção nas últimas duas décadas (FERREIRA-DIAS et al., 2001; FREGOLENTE, 2006; NEGI et al., 2006).

A síntese de MAG pode ser conduzida através de diversas formas como, por exemplo, a esterificação direta de glicerol com ácidos graxos, transesterificação de ésteres de ácido graxos com glicerol e glicerólise de triglicerídeos. Industrialmente, a produção de MAG ocorre através de reações de glicerólise, sendo que estas reações são conduzidas normalmente a temperaturas acima de 200°C, na presença de catalisadores químicos. Nestas condições, normalmente obtém-se uma mistura composta por 50% de MAG, 40% de DAG e 10% de TAG (SONNTAG, 1982; RENDO'N et al., 2000). Para a produção de 3 moles de MAG são necessários 2 moles de glicerol para cada mol de TAG, como mostra a Figura 2 (FREGOLENTE, 2006).

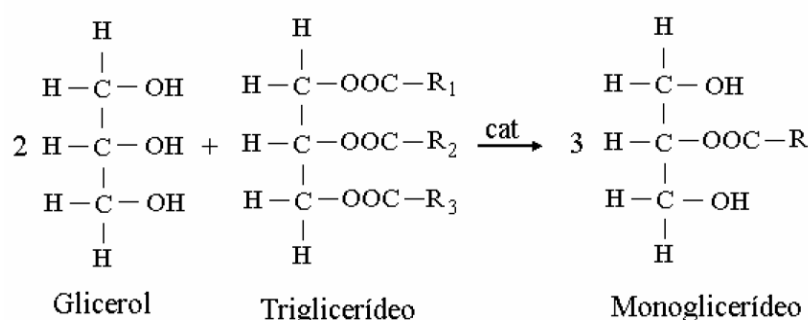


Figura 2 - Formação da molécula de monoglicerídeo.

Recentemente, tem-se destacado na literatura o interesse pelo desenvolvimento de processos enzimáticos que possam substituir as tradicionais rotas químicas para a produção de MAG. As principais vantagens destes processos catalisados por enzimas são que estas atuam em condições amenas de temperatura e de pH, ou seja, baixas temperaturas (40-70°C) e pH próximo do neutro (FERREIRA-DIAS et al., 2003). Tais condições reduzem o custo energético da reação, diminuem a formação de subprodutos da reação, minimizando também a formação de produtos com características indesejáveis, como a coloração escura e aroma desagradável, assim como possibilita a obtenção de MAG em maiores rendimentos e concentrações (YANG et al., 2005a).

2.3 Diglicerídeos

Diglicerídeos são ésteres de glicerol presentes em óleos e gorduras (2–10%) de diferentes fontes, são formados por dois ácidos graxos unidos covalentemente por ligação éster a uma molécula de glicerol. As moléculas de DAG podem apresentar isomeria de posição em seus ácidos graxos dando origem aos isômeros 1,2-DAG e 1,3-DAG (SEONG-KOON et al., 2007).

Várias rotas para produção de DAG vêm sendo apresentadas na literatura. Em geral, DAG podem ser obtidos através da glicerólise entre um TAG e o glicerol

utilizando lipases 1,3-específicas como catalisador, esterificação de ácidos graxos ou hidrólise do TAG. No entanto, ainda existem poucos relatos de processos de produção de DAG em grande escala. Os países detentores da maior parte das pesquisas e patentes com relação à produção e consumo de DAG são Japão e Estados Unidos (SAITO et al., 2007; SEONG-KOON et al., 2007).

A versatilidade do DAG é evidente em numerosas aplicações, como por exemplo, enriquecimento em óleo de cozinha, molho para salada e maionese, margarinas, chocolates, sorvete e formulações de produtos com benefícios fisiológicos específicos. Estudos têm mostrado que óleos compostos principalmente por DAG são metabolizados pelo organismo diferentemente do modo como os TAG são metabolizados, o que promove um efeito benéfico com relação à prevenção da obesidade, assim como a prevenção e redução do acúmulo de gordura no corpo (YASUKAWA & YASUNAGA, 2001; YAMAMOTO et al., 2001; TAKEI et al., 2001; MAKI et al., 2002). No ano de 1991, no Japão, por exemplo, óleos para cozinha contendo 80% (m/m) ou mais de DAG em sua composição foram denominados pelas autoridades japonesas como sendo “Alimentos específicos para a saúde” (NAGAO et al., 2000; SEONG-KOON et al., 2007).

2.4 Glicerol

Glicerol ou Propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool. É líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada, ou seja, ligado a ácidos graxos tais como o ácido estereárico, oleico, palmítico e láurico para formar a molécula de triacilglicerol (IUPAC, 1993).

Todo o glicerol produzido no mundo, até 1949, era proveniente da indústria de sabão. Atualmente, 70% da produção de glicerol nos Estados Unidos ainda provém dos glicerídeos (óleos e gorduras naturais) e o restante, da produção do glicerol sintético (subproduto da fabricação de propileno), da produção de ácidos

graxos e também de ésteres de ácidos graxos (biodiesel). No ano de 2000 a produção mundial de glicerol foi estimada em 800 mil toneladas, sendo que 10% deste total são oriundos de indústrias responsáveis pela produção de biodiesel (KIRK-OTTMER, 2007; VALLIYAPPAN et al., 2008).

Dos métodos disponíveis para produção de biodiesel, a transesterificação de óleos e gorduras é o mais comum. Transesterificação é a reação de uma gordura com um álcool formando ésteres, conhecidos como biodiesel (DEMIRBAS, 2002a; SHARMA et al., 2004). Na reação de transesterificação do óleo de canola, por exemplo, são obtidos aproximadamente 90% de ésteres metílicos (biodiesel) e o restante 10% é o subproduto glicerol (LANG et al., 2001). Com a rápida expansão da produção de biodiesel vem um excesso de glicerina bruta.

O glicerol que deixa o sistema de reação comumente empregando catalisador químico, geralmente tem uma pureza de 50%. Esta mistura contém o excesso de metanol, sabão e catalisador. Primeiramente, esta mistura é acidulada para transformar o sabão em ácidos graxos livres e neutralizar o catalisador. Como estes ácidos não são miscíveis com o glicerol, podem ser facilmente retirados do sistema nesta etapa. Após a acidulação, o excesso de álcool é retirado do glicerol do sistema. Tanto este álcool como o retirado do biodiesel, normalmente, são purificados e retornam para a nova transesterificação (FELICIANO & PEREIRA, 2007).

2.5 Enzimas como catalisadores

Há muitos anos, enzimas vêm sendo usadas na modificação de gorduras, proteínas e carboidratos. A descoberta da capacidade das lipases catalisarem reações de síntese e sua grande estabilidade em diversos solventes orgânicos possibilitou grandes avanços e mudanças no campo da síntese química, na indústria farmacológica e alimentícia (BUGG, 2004; DIXON & WEBB, 1979).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente. Entre os processos de maior interesse estão as reações de

hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial biotecnológico dessas enzimas incluem fatos relacionados com sua alta estabilidade em solventes orgânicos, não requerem a presença de co-fatores, possuem grande especificidade pelo substrato e exibem uma alta enantiosseletividade (AEHLE, 2007). Assim, o reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (LÉON et al., 1998; CASTRO et al., 2004).

2.5.1 Lipases

Lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre ligações éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. As lipases são comumente encontradas na natureza oriundas de várias fontes tais como animais, vegetais e microbianas (MACRAE & HAMMOND, 1985). No entanto, atualmente as lipases são produzidas preferencialmente a partir de microrganismos devido à facilidade de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução dos custos de obtenção.

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C (CASTRO et al., 2004). Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (VULFSON, 1994). As lipases microbianas são atualmente utilizadas em processos industriais, pois além de apresentarem as vantagens anteriormente citadas, como a sua facilidade de obtenção, normalmente apresentam maior diversidade e estabilidade quando comparadas com lipases oriundas de outras fontes (CARVALHO et al., 2003; JAEGER & REETZ, 1998).

A obtenção de lipases a partir de microrganismos vem sendo largamente estudada e os microrganismos mais utilizados para obtenção de lipases microbianas são fungos, principalmente do gênero *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Geotrichum* e *Mucor* (OLIVEIRA, 1999) e levedura dos gêneros *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodotorula*, entre outras (SHARMA et al., 2001). Recentemente, a obtenção de lipases a partir de bactérias, principalmente do gênero *Pseudomonas*, vem ganhando atenção especial devido a sua alta especificidade e termoresistência, como mostram estudos realizados por KAEWTHONG et al. (2005), os quais testaram nove enzimas comerciais imobilizadas para produção de MAG a partir da reação de glicerólise de palmoleína.

2.5.2 Características, propriedades e aplicações das lipases

A versatilidade das lipases vem sendo largamente explorada na área de alimentos, química, farmacologia, entre outras áreas com o intuito de substituir processos convencionais já existentes principalmente no que diz respeito à produção de compostos atualmente somente obtidos por via química.

As lipases têm como seus substratos naturais triglicerídeos e seu modo de ação se assemelha ao das esterases, porém, sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresentam maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. Estas enzimas são proteínas que possuem um complexo mecanismo catalítico chamado de ativação interfacial. A teoria atualmente mais aceita para este fenômeno diz que uma parte da superfície da enzima se encontra em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar e que esta conformação coloca o sítio ativo da enzima em posição favorável para catálise (BORGSTON & BROCKMAN, 1984; ERICSON et al., 2008).

Embora a grande maioria das aplicações industriais das lipases esteja concentrada nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm sendo estabelecidas nos campos da indústria alimentícia, farmacêutica, química fina,

cosméticos, couros, polpa de celulose e papel e no tratamento de resíduos industriais (XU, 2000; SHARMA et al., 2001).

Na indústria de laticínios, lipases em conjunto com proteases, têm a função de acelerar a maturação de queijos melhorando a textura e o aroma destes produtos (FARAHAT et al., 1990). A hidrólise seletiva da gordura do leite também é um bom exemplo da aplicação das enzimas na indústria de laticínios, sendo que neste caso estas são responsáveis pela formação de aromas distintos de queijo Cheddar (BALCÃO & MALCATA, 1998). Na área de panificação, a adição de lipases a massas de pães e bolos aumenta a capacidade de retenção de ar e o aroma, aumenta o volume do pão, melhora a textura do miolo, conferindo uma cor mais branca à massa, além de retardar a sinerese, aumentando a vida de prateleira (GANDHI, 1997; BALCÃO & MALCATA, 1998).

Segundo GANDHI (1997), as lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização. Esta flexibilidade, aliada à diferentes possibilidades de especificidade de substrato existentes entre as diferentes lipases, confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações. Atualmente entre os processos industriais de maior interesse estão reações de hidrólise da gordura do leite, aceleração do processo fermentativo na produção de cerveja, síntese de ésteres e desenvolvimento de aromas, transesterificação de lipídeos, entre outros. Outro processo de grande interesse para aplicação de enzimas como catalisador é a reação de glicerólise industrial em substituição ao uso de catalisador químico e altas temperaturas para produção de MAG. A substituição do catalisador químico por enzimas, especificamente lipases, visa à utilização de condições operacionais mais amenas, principalmente de temperatura.

2.6 Glicerólise

Para produção de monogliceróis grande atenção tem sido dada a uma reação em específico, a glicerólise. Isto ocorre, pois entre todas as formas possíveis de se obter monoglicerídeos é a glicerólise que oferece maior rendimento teórico, uma vez

que cada mol de triglicerídeo pode gerar três moles de monoacilgliceróis, na presença de excesso de glicerol (FREGOLENTE, 2006).

Atualmente, a produção de monoglicerídeos é realizada através de métodos químicos, onde ocorre a esterificação (glicerólise) entre glicerol e ácidos graxos. No entanto, estes processos dependem de altas temperaturas (170°C-250°C), presença de catalisadores alcalinos (KOH ou NaOH), atmosfera de nitrogênio e excesso molar de glicerol (SONNTAG, 1982; TÜTER & AKSOY, 2000). O inconveniente desta reação a altas temperaturas além do seu custo energético, é a geração de subprodutos com características indesejadas tais como cor escura, odor desagradável e sabor de queimado. Em virtude disso o produto obtido deve, obrigatoriamente, passar por etapas de purificação como a destilação molecular para remoção dos subprodutos e obtenção de um produto com pureza de aproximadamente 90%, seguindo assim os padrões exigidos para uso em alimentos e fármacos (MCNEIL & YAMANE, 1991).

Mais recentemente, diferentes métodos de glicerólise enzimática, na presença ou ausência de um solvente orgânico, com enzimas livres ou imobilizadas, e ainda em sistemas microemulsionados vêm sendo reportados na literatura como alternativa à tradicional glicerólise química (BORNSCHEUER, 1995; YANG et al., 2005a; YANG et al., 2005b). As principais vantagens destes processos, que tem como catalisador da reação uma enzima, são as condições amenas tanto de temperatura, próxima a ambiente, quanto de pH, próximo a neutralidade (ROSU et al., 1997).

2.6.1 Glicerólise enzimática

A substituição de catalisadores inorgânicos por lipases é um atrativo potencial, visto que processos enzimáticos evitam a formação de produtos secundários, os quais conferem sabor e coloração indesejáveis ao produto. Além disso, o uso de lipases leva a uma redução energética, perante a utilização de condições mais suaves de pH e temperatura (FERREIRA-DIAS et al., 2001). Estas

condições minimizam o custo energético da reação, diminuem a formação de subprodutos, levando a obtenção de um produto isento de características indesejáveis, tais como coloração escura e aroma desagradável. Ainda, tal rota produtiva acentua a possibilidade de alta seletividade em relação à produção de monoglicerídeos. Dentro deste contexto, destaca-se a utilização de lipases como promotores da reação entre óleos vegetais e glicerol (TÜTER & AKSOY, 2000; KAEWTHONG, et al., 2005; FERREIRA-DIAS. et al., 2001).

Muitos trabalhos presentes na literatura, utilizando diferentes condições experimentais em diferentes sistemas, na presença ou não de solvente orgânico, catalisador enzimático, entre outras condições vêm relatando a obtenção de MAG através da glicerólise enzimática. Um exemplo desses estudos é o trabalho de GHAMGUI et al. (2006), que estudaram a produção de MAG pela esterificação direta de ácido oléico com glicerol usando lipase imobilizada de *Staphylococcus simulans*. A reação foi conduzida na ausência de solvente. O máximo rendimento obtido nas condições otimizadas neste trabalho foi de 71,68% em termos de MAG obtido em 24 horas de reação a 37°C. O sistema era constituído por uma razão molar ácido oléico/glicerol de 0,2 e adição inicial de água de 5%.

YANG et al. (2005a) verificaram a síntese de MAG via glicerólise enzimática usando um sistema simples e eficiente de reação. Os autores verificaram a eficiência de três enzimas comerciais na reação de glicerólise do óleo de girassol, sendo que das três enzimas testadas a que apresentou melhor eficiência para a reação foi a lipase imobilizada comercial Novozym 435. As condições reacionais do estudo da glicerólise em reator batelada foram razão molar glicerol/óleo 4,5:1, 15% de enzima, sem adição de solvente ou surfactante, conduzido a 40°C com agitação de 500rpm. Em 24 horas de reação o rendimento obtido pelos autores foi menor que 20%.

Em estudo realizado por PAWONGRAT et al. (2007), para a produção enzimática de MAG a partir de óleo de atum, em sistema utilizando solvente orgânico MTBE (terc-butil metil éster), os autores obtiveram 15% de MAG em 24 horas de reação sob as condições reacionais de 45°C, 300rpm, com adição de 4% (w/w) de água ao glicerol.

Um sistema típico de glicerólise utilizando lipase imobilizada como catalisador apresenta-se como um sistema trifásico sendo uma fase hidrofóbica de óleo, uma fase hidrófila de glicerol e a fase sólida de enzima. Com a formação de um sistema trifásico a transferência de massa do sistema torna-se limitada. Devido a esta razão, a eficiência da reação é normalmente baixa (YANG et al., 2005b).

O processo de glicerólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface óleo/glicerol e a absorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando taxas de reação mais elevadas (BALCÃO et al., 1996). Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de reação de gorduras usando lipases como catalisadores. Alguns aspectos estudados são a relação entre a fase aquosa/fase oleosa, eventual ação inibitória dos produtos formados, efeito dos íons cálcio e sódio na velocidade de reação, influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo e efeito da agitação na velocidade de reação (OLIVEIRA et al., 1999; FREITAS et al., 2006).

A utilização de agentes tensoativos e solventes orgânicos para formação de micelas reversas é um bom exemplo de sistema reacional alternativo. Este artifício proporciona o aumento da área de contato entre enzima e substratos, proporciona também uma maior miscibilidade do glicerol em solventes apolares (NITSCHKE & PASTORE, 2002; ROSEN, 2004).

2.7 Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, formadas por uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cadeia por vezes denominada cauda carbônica apolar (hidrofóbica), sendo que a cabeça pode ser carregada positiva ou negativamente (catiônica ou aniônica), pode ser dipolar (anfotéricas) ou não carregada. Por definição, surfactante significa um agente que atua na superfície. Isto mostra uma importante propriedade dos surfactantes: a formação de um filme molecular,

ordenado na interface, que reduz a tensão interfacial e superficial (HAMLEY, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002; ROSEN, 2004).

Surfactantes são compostos de grande versatilidade na indústria química, podendo atuar em diversos produtos, desde óleos para motores até fármacos e detergentes usados para limpeza. Um surfactante é uma substância que, quando presente em baixa concentração em um sistema, possui a capacidade de diminuir a tensão interfacial entre as fases imiscíveis em contato por ocasionar a diminuição da energia interfacial livre do sistema. Nas últimas décadas os surfactantes vêm sendo muito utilizados nas áreas de alta tecnologia como eletrônica e biotecnologia (ROSEN, 2004).

Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais (Tabela 1), sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana (DESAI & DESAI, 2002). Os biosurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos e podem ser utilizados em muitas aplicações industriais. Entretanto, sua utilização ainda é restrita devido aos altos custos de produção, recuperação do produto e ao uso de substratos caros para sua obtenção.

Tabela 1. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betainas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

FONTE: Nitschke & Pastore (2002).

A utilização de surfactantes tem como objetivo promover ao sistema óleo/glicerol/enzima o aumento da área interfacial, promovendo altas taxas da reação, aumentando assim a eficiência do biocatalisador, principalmente das lipases por serem caracterizadas como enzimas de interface. A principal característica do uso de tensoativo está na formação de sistemas micelares. A formação de micela reversa propicia o aumento da resistência do catalisador enzimático frente a condições do processo como temperatura e pH, assim como o aumento da conversão em produto ocasionado pelo aumento da solubilidade dos substratos a enzima (HAMLEY, 2000; ROSEN, 2004).

2.8 Microemulsões e Sistemas micelares

O termo microemulsão foi introduzido para descrever os sistemas identificados por Hoar e Schulman (1943), que ao titularem um sistema emulsionado contendo água e óleo com uma mistura de tensoativo e cotensoativo obtendo um sistema micro-heterogêneo e macroscopicamente homogêneo. As microemulsões são definidas como dispersões aquosas estáveis com tamanho variando de 50 a 500nm, grande estabilidade, baixa viscosidade aparente (aproximadamente 10cP), geralmente apresentam-se opticamente transparentes (SOMA & PAPADOPOULOS, 1996).

Estruturalmente, as microemulsões são ditas como agregados de surfactantes (micelas) de água dispersos em óleo (A/O) ou micelas normais, microemulsões de óleo dispersos em água (O/A) ou micelas inversas (Figura 3), ou como bicontínuas. Em uma micela, as moléculas de surfactante estão organizadas em monocamadas com seus grupos polares (cabeça) orientadas na direção da água e suas caudas na direção do óleo (LAWRENCE et al., 2000).

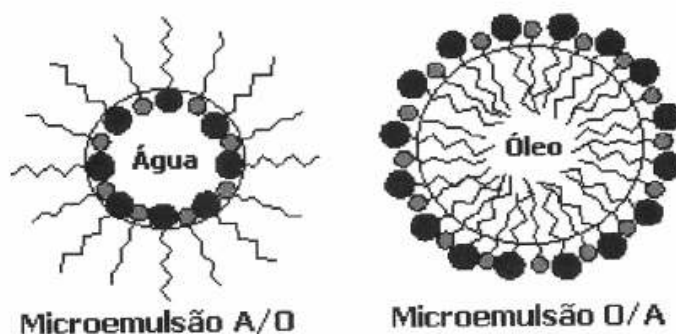


Figura 3 – Tipos de Microemulsões; a) Água/Óleo (micela reversa); b) Óleo/Água.

A estrutura da micela normal formada indica que o grupo cabeça hidrofílico está direcionado para o contato com a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia linear hidrofóbica (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central apolar (CARVALHO & CABRAL, 2000). A interface do sistema O/A é estabilizada por um terceiro componente, o surfactante. As moléculas de surfactantes interagem espontaneamente com as interfaces e separam a fase não-polar e aquosa, diminuindo assim a tensão superficial (STAMATIS et al., 1999).

Uma importante propriedade dos surfactantes é a sua capacidade de ser absorvido na interface, ou seja, a capacidade de formar micela. A formação de micela é um fenômeno de grande importância, pois é este fenômeno que vai determinar a detergência e a solubilização da solução pela redução da tensão interfacial (ROSEN, 2004). A utilização das microemulsões no ramo de fármacos é relativamente recente e devido às potenciais vantagens oferecidas, tem despertado grande interesse, principalmente, nos sistemas de liberação controlada de drogas. O interesse na aplicação das microemulsões se deve à capacidade desses sistemas de solubilizar substâncias hidrofílicas e lipofílicas ao mesmo tempo, e, também, de melhorar a solubilidade e estabilidade dos fármacos (OLIVEIRA et al., 2004).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura sobre microemulsões de A/O em sistemas biológicos faz uso de surfactantes sintéticos que apresentam como característica algum grau de toxicidade. No entanto há vários tipos de surfactantes naturais (Tabela 1) ainda pouco explorados e pouco reportados. Assim como os surfactantes sintéticos, os surfactantes naturais apresentam também capacidade de formar micelas reversas.

Segundo FREITAS et al. (2006) em geral as lipases requerem uma ativação interfacial para sua total atividade catalítica. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação das lipases nas interfaces, como por exemplo, a mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa, uma

maior concentração do substrato local e um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeos representa uma proteção às ligações ésteres.

A atividade catalítica das lipases é sensivelmente reduzida na ausência de uma interface, o que é evidenciado pela baixa conversão da hidrólise de ésteres solúveis em água pelas lipases. Portanto, uma das principais dificuldades na compreensão do mecanismo da lipólise é devido ao fato da atividade das lipases depender fortemente de como os substratos lipofílicos são apresentados à enzima, isto é, das propriedades físicas da emulsão (FREITAS et al., 2006; BORGSTROM & BROCKMAN, 1984).

2.9 Considerações Finais

O estado da arte revelou o potencial em utilizar lipases imobilizadas como catalisadores da reação de glicerólise para produção de MAG e DAG, assim como a utilização de surfactantes de grau alimentício para substituição de tensoativos sintéticos e estudo da atuação destes surfactantes naturais em sistemas reacionais catalisados por enzimas, devido à escassez de informações a esse respeito.

Neste contexto, o presente trabalho aborda a produção de MAG e DAG através da glicerólise enzimática do óleo de oliva, utilizando lipase imobilizada como catalisador e surfactantes dos grupos sorbitol e ésteres de sorbitol, ésteres de sacarose e lecitina, todos classificados como surfactantes de grau alimentício, em sistemas livres de solvente. O sistema reacional foi definido em função das características dos compostos envolvidos na reação, das condições ótimas para atuação do catalisador enzimático e com base em alguns dados existentes na literatura para sistemas semelhantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e a metodologia empregada no desenvolvimento das etapas relativas a este trabalho. Após exposição dos materiais utilizados, será apresentada a metodologia e o aparato experimental empregado para realização das reações de glicerólise enzimática na presença de surfactante, assim como a metodologia para determinação da atividade enzimática, análise dos produtos formados na reação e cálculos da taxa inicial da reação em termos de MAG e DAG.

3.1 Especificações dos materiais

Para a realização da reação de glicerólise enzimática, este trabalho utilizou como catalisador a lipase comercial imobilizada Novozym 435 (Novozymes S.A) produzida por *Candida antarctica*. Como substratos da reação foram utilizados óleo de oliva extra virgem marca Arisco proveniente do mercado local e glicerol PA (Merck, 99%). Os agentes tensoativos testados neste trabalho foram Polioxietileno sorbitol monopalmitato (nome comercial Tween 40, Vetec), Polioxietileno glicol sorbitan monoestearato (nome comercial Tween 65, Fluka), Polioxietileno glicol sorbitan monooleato (nome comercial Tween 80, Vetec), Polioxietileno sorbitol trioleato (nome comercial Tween 85, Fluka), Triton X-100 (Éster de sacarose, Difco) e Lecitina de soja (Inlab), todos classificados como surfactantes de grau alimentício. Padrões de 1-(cis-9-Octadecenoil)-*rac*-glicerol (Sigma), glicerol-1,2 e 1,3-dioleato (Sigma) e gliceril trioleato (Sigma) foram usados para determinação do conteúdo de produtos formados na reação.

Na quantificação da atividade enzimática foram utilizados os reagentes ácido láurico (Sigma-Aldrich, 98%), álcool n-propílico (Merck, 99,3%), acetona PA (Merck) e etanol PA (Merck, 99,9%). Para quantificação dos produtos da reação por cromatografia líquida fez-se uso de n-hexano (Sigma-Aldrich, 98,5%), acetona (Sigma-Aldrich, 99,8%), acetonitrila (Sigma-Aldrich, 99,9%) e NaOH 0,01N.

3.2 Métodos

3.2.1 Descrição do aparato experimental

A unidade experimental utilizada para condução das reações de glicerólise enzimática na presença de surfactante consiste em um reator de vidro encamisado com capacidade de 60mL dotado de um agitador mecânico, conectado a um banho termostático, com a finalidade de manter constante a temperatura.

A Figura 4 apresenta o diagrama esquemático do aparato experimental utilizado na realização das reações de glicerólise enzimática na presença de surfactante e a vista da unidade experimental, respectivamente.



Figura 4 - Vista da unidade experimental utilizada na reação de glicerólise enzimática.

3.2.2 Procedimento experimental

Para a produção de MAG e DAG em sistemas livres de solvente inicialmente foi realizada a ativação da enzima imobilizada em estufa a 40°C por 1 hora. Depois de transcorrido o período de ativação, a quantidade necessária de biocatalisador, surfactante e os substratos glicerol e óleo de oliva eram devidamente pesados em balança analítica e adicionados ao reator de vidro encamisado conectado a um banho termostático com temperatura ajustada e constante. Em seguida, acoplava-se o agitador, ajustava-se a agitação desejada e iniciava-se a reação. Ao final da reação, o agitador e o banho termostático eram desligados e o agitador retirado do reator.

As condições experimentais primeiramente utilizadas neste trabalho para produção de MAG foram conduzidas a temperatura de 70°C, razão molar glicerol:óleo de oliva de 2:1, 16% (m/m) de surfactante, 7,5% (m/m) de enzima Novozym 435 em 2 horas de reação com agitação mecânica de 600rpm (FIAMETTI, 2008). Posteriormente, as quantidades dos substratos óleo de oliva e glicerol, teor de surfactante e concentração de enzima imobilizada foram variadas conforme planejamento experimental.

Ao final do tempo de reação as amostras eram coletadas e lavadas com n-hexano em sistema de filtragem acoplado com bomba de sucção usando vácuo para remoção da enzima. Após remoção da enzima, o filtrado era transferido para frascos âmbar de amostragem, sendo os mesmos dispostos em estufa a vácuo sob temperatura de 60°C durante 24h para evaporação do solvente até peso constante a fim de eliminar o n-hexano residual.

3.2.3 Determinação do conteúdo de monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos.

Para a determinação do teor de MAG, DAG e TAG, as amostras foram analisadas em HPLC (High-Performance Liquid Chromatography system) – Agilent 1100 series, com bomba quaternária e injetor automático, forno de coluna e detector de índice de refração, com temperatura do forno da coluna de 35°C e temperatura do detector de 40°C, com coluna modelo C18 (Zorbax SB-C18), volume de injeção

de 20µL e fluxo de 1mL/min e fase móvel de acetonitrila/acetona (1:1 v/v), segundo metodologia descrita pela AOAC (1996).

Ao final do tempo de reação as amostras foram preparadas pesando 0,3g de amostra em um balão volumétrico de 10mL. Após pesagem das amostras adicionou-se 200µL de clorofórmio e completou-se o volume do balão com fase móvel de acetonitrila/acetona (1:1 v/v). As amostras nas condições cromatográficas descritas acima foram agitadas em agitador vortex antes da coleta pelo HPLC para correta homogeneização da solução a ser injetada.

As amostras foram injetadas em duplicata nas condições cromatográficas descritas acima, possibilitando a determinação do conteúdo de MAG, DAG e TAG, expresso em conteúdo percentual mássico, em base livre de surfactante. Os dados referentes à calibração e cálculos encontram-se descritos no Apêndice A.

3.2.4 Determinação da atividade enzimática

O procedimento adotado para determinação da atividade enzimática das lipases foi descrito por OLIVEIRA et al. (2006). A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico e álcool n-propílico com a razão molar ácido:álcool de 3:1, à temperatura de 60°C, com 5% (m/m) de enzima imobilizada, adicionada ao meio reacional disposto em um reator de vidro de 50mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Alíquotas de 150µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20mL de acetona:etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e extrair ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada pela titulação de hidróxido de sódio 0,01N até pH 11. Uma unidade de atividade foi determinada como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A atividade enzimática foi determinada no início e ao final das reações. A medida da atividade teve como objetivo acompanhar alterações da atividade da enzima devido ao emprego na reação de glicerólise do óleo de oliva. A atividade de esterificação da lipase imobilizada foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$Atividade(U / g) = \frac{\left[\left(V_{NaOH}^0 \right) - \left(V_{NaOH}^{40} \right) \cdot N \right]}{t \cdot m a} \cdot 10^3 \quad (1)$$

onde:

N = normalidade do NaOH;

V_{NaOH}^0 = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL);

V_{NaOH}^{40} = Volume de NaOH gasto na titulação da amostra ao final da reação;

ma = massa de enzima imobilizada utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (minutos);

1U = 1 μ mol de ácido/min.

3.2.5 Estratégia seqüencial de planejamento experimental

A utilização da ferramenta estatística na forma de planejamento de experimentos permite determinar as variáveis que exercem maior influência em um determinado processo, assim como avaliar as relações entre variáveis deste processo. Além disto, esta ferramenta permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de minimizar ou maximizar uma resposta.

Com o objetivo de avaliar a influência das variáveis concentração de enzima imobilizada, razão molar glicerol:óleo de oliva e concentração de surfactante na produção enzimática de MAG em sistemas livres de solvente, realizou-se inicialmente um planejamento 2^3 completo com triplicata no ponto central para avaliar a influência das variáveis envolvidas no processo. Em seguida, com base nos resultados anteriores, realizou-se um planejamento 2^3 completo com pontos axiais e triplicata do ponto central, em um total de 17 experimentos, com a finalidade de otimizar a produção de MAG.

Os níveis das variáveis investigadas no planejamento tiveram como base experimentos prévios, resultados estes apresentados no próximo capítulo deste trabalho. Para o delineamento experimental utilizou-se o planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) ajustando os níveis de concentração de enzima imobilizada, razão molar glicerol:óleo de oliva e concentração de surfactante, de acordo com os ensaios previamente realizados. As variáveis do

processo agitação, temperatura e tempo de reação foram fixados em 600rpm, 70°C e 2h de reação, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta os níveis das variáveis investigadas no primeiro e segundo planejamentos experimentais para a produção de MAG, utilizando Tween 65 e Triton X-100 como surfactantes. Os resultados foram analisados com o auxílio do software Statistica® 6.0 Statsoft Inc.

Tabela 2. Nível das variáveis investigadas no primeiro e segundo planejamento de experimentos.

	Primeiro planejamento experimental				
Níveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicerol:óleo de oliva (mol/mol)	-	1:1	2:1	3:1	-
Surfactante (% m/m)	-	10	13	16	-
Enzima imobilizada (% m/m)	-	6,5	7,5	8,5	-
	Segundo planejamento experimental				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicerol:óleo de oliva (mol/mol)	3:1	4:1	6:1	8:1	9:1
Surfactante (% m/m)	13	14	16	18	19
Enzima imobilizada (% m/m)	7,5	8,0	9,0	10,0	10,5

O modelo empírico codificado foi gerado pela análise de regressão com eliminação dos parâmetros não significativos. O ajuste do modelo foi avaliado pela análise de variância e determinação do coeficiente de regressão (R^2).

3.2.6 Avaliação do pH da reação

A avaliação do comportamento do pH do meio reacional ao longo do tempo da reação foi realizada utilizando um pHmetro da marca Micronal (modelo B474). As medidas de pH foram tomadas dispondo o eletrodo do pHmetro na mistura reacional, estando esta completamente agitada, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120

minutos. Os surfactantes avaliados nesta etapa foram Tween 40, Tween 65, Tween 80 e Tween 85.

3.2.7 Avaliação da cinética reacional para produção de MAG

Com a finalidade de avaliar o comportamento da reação ao longo do tempo, realizou-se um estudo cinético da produção de MAG e DAG através da glicerólise enzimática por um tempo reacional de 6 horas. A avaliação cinética foi realizada na condição experimental otimizada para o surfactante Triton X-100, como descrito anteriormente no qual foram avaliados os efeitos razão molar glicerol:óleo de oliva (3:1-9:1), concentração de enzima imobilizada de 2,5 a 18% (m/m), concentração de surfactante de 10 a 20% (m/m) e temperatura de 30°C a 70°C na produção de MAG e DAG.

As amostras foram retiradas nos tempos de 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos de reação com o auxílio de um pipetador automático. Após amostragem as alíquotas foram tratadas e analisadas, conforme metodologia descrita anteriormente nos itens 3.2.2 e 3.2.3. A metodologia de amostragem do sistema reacional foi checada através de testes preliminares com amostragem destrutiva e não-destrutiva do meio reacional, e verificou-se que a amostragem não-destrutiva apresentou conteúdos de MAG, DAG e TAG semelhantes à amostragem destrutiva. A boa reprodutibilidade nos ensaios realizados nos planejamentos de experimentos permitiu que os dados cinéticos fossem coletados sem a necessidade de duplicata.

3.2.8 Determinação da taxa inicial da reação

O cálculo da taxa inicial de reação tem grande relevância, pois através dela, pode-se avaliar se a reação ocorre instantaneamente, além de comparar as diferentes condições avaliadas no estudo cinético. O cálculo é feito dividindo-se a variação de conversão num determinado tempo pela variação do tempo na faixa

linear da curva cinética. A velocidade inicial de reação (r) foi calculada através da equação abaixo.

$$r = \left. \frac{dC}{dt} \right|_{t=0} \quad (2)$$

onde:

r = taxa inicial de reação (min^{-1});

C = conteúdo de MAG no tempo t (%);

C_0 = conteúdo de MAG no tempo zero (%);

t = tempo (min);

t_0 = tempo do início da reação (min).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no decorrer deste trabalho referente à glicerólise enzimática do óleo de oliva para produção de MAG e DAG utilizando surfactante. O objetivo principal foi avaliar o comportamento dos surfactantes testados no meio reacional, a concentração do catalisador enzimático e a razão molar dos substratos glicerol:óleo de oliva. Nesta etapa foram testados seis diferentes surfactantes, todos caracterizados como de grau alimentício. Estes surfactantes foram avaliados com relação a sua capacidade de auxiliar na produção de MAG e DAG, pela facilidade de homogeneização do sistema, assim como sua influência na atividade final do catalisador enzimático.

Ao final dos estudos preliminares, os surfactantes que apresentaram o maior conteúdo em MAG+DAG teve sua condição experimental otimizada pela metodologia de superfície de resposta com o objetivo de maximizar o conteúdo de MAG+DAG. Em seguida, são apresentados dados com relação ao estudo cinético da produção de MAG+DAG.

Neste ponto cabe mencionar que os resultados obtidos para MAG, DAG e TAG ao final da reação serão sempre reportados em termos de conteúdo mássico percentual (%). Detalhes acerca dos cálculos e da curva de calibração do equipamento HPLC podem ser encontrados no Apêndice A.

4.1 Avaliação do tipo de surfactante utilizado na glicerólise enzimática

Na realização do trabalho foram avaliados seis diferentes surfactantes na mesma condição reacional, definida previamente por FIAMETTI (2008), sendo eles Tween 40, Tween 65, Tween 80, Tween 85, Triton X-100 e lecitina de soja, todos classificados como surfactantes de grau alimentício. Uma propriedade importante dos surfactantes é a sua capacidade de formar sistema micelar. Este fenômeno tem grande importância, pois é quem vai determinar a detergência e a solubilidade entre soluções imiscíveis pela redução da tensão interfacial (ROSEN, 2004).

Segundo DESAI & DESAI (2002) características do surfactante como o tamanho dos grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos na molécula, ramificações, ligações duplas, anel aromático, entre outras características fazem com que os surfactantes se distribuam nas interfaces óleo/água (O/A) e água/óleo (A/O) com diferentes graus de solubilidade. Sendo assim, quando diferentes surfactantes são avaliados em um mesmo sistema reacional, diferentes respostas podem ser encontradas devido à características moleculares de cada surfactante.

Os experimentos foram realizados conforme metodologia descrita no capítulo anterior com a utilização do aparato experimental apresentado nas Figuras 4 e 5. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos com relação ao conteúdo de MAG, DAG, MAG+DAG e TAG através da glicerólise utilizando os diferentes surfactantes testados.

Tabela 3. Conteúdo de MAG, DAG, MAG+DAG e TAG obtidos usando diferentes surfactantes. Condição reacional: 600rpm, 70°C, razão molar glicerol:óleo de oliva 2:1, 7,5% (m/m) enzima imobilizada e 16% (m/m) surfactante (FIAMETTI, 2008).

Surfactante	MAG (%)	DAG (%)	MAG + DAG (%)	TAG (%)
Sem surfactante	6,80 ^c ± 0,32	4,31 ^c ± 0,28	11,11 ^d ± 0,42	68,77 ^a ± 0,31
Tween 40	11,60 ^b ± 0,37	9,52 ^b ± 0,35	21,12 ^c ± 0,72	57,96 ^b ± 0,18
Tween 65	17,56 ^a ± 0,71	19,15 ^a ± 0,58	36,21 ^a ± 1,29	43,45 ^d ± 0,47
Tween 80	10,80 ^b ± 0,34	8,50 ^b ± 0,13	19,30 ^c ± 0,47	63,51 ^a ± 0,98
Tween 85	15,55 ^a ± 0,16	14,54 ^a ± 0,23	31,09 ^{a,b} ± 0,08	55,99 ^b ± 1,49
Lecitina de soja	10,19 ^b ± 0,10	8,66 ^b ± 0,16	18,85 ^c ± 0,26	59,72 ^b ± 0,76
Triton X-100	12,51 ^b ± 0,83	18,91 ^a ± 1,04	31,42 ^b ± 1,87	45,36 ^c ± 1,62

* Médias ± desvio padrão seguido por letras diferentes nas colunas, são estatisticamente diferentes (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Através dos resultados apresentados na tabela anterior, é possível verificar que dentre os surfactantes avaliados, o sistema reacional utilizando Tween 65 conduziram ao maior conteúdo em MAG+DAG em duas horas de reação, atingindo valor de 36,21%, seguido pelos surfactantes Triton X-100 e Tween 85 que levaram ao conteúdo de 31,42% e 31,09% em termos de MAG+DAG, respectivamente. Por

outro lado, observa-se que os surfactantes Tween 80 (19,30%) e lecitina de soja (18,85%) apresentaram os menores conteúdos em termos de MAG+DAG em duas horas de reação. A variação no conteúdo de MAG+DAG observada entre os diferentes surfactantes avaliados, estando estes em condições experimentais idênticas, pode ser explicado pela diferença existente na conformação molecular e nas características químicas de cada surfactante, conforme discutido anteriormente.

Ainda na Tabela 3 observa-se que para o sistema reacional livre de surfactante o conteúdo de MAG+DAG obtido ao final de 2 horas de reação foi de 11,1% o que sugere que o sistema apresenta uma pequena miscibilidade auxiliada também pela forte agitação, entre tanto, para que maiores conteúdos em termos de MAG e DAG possam ser alcançados, a reação requer um tempo maior para atingir o mesmo conteúdo obtido em sistemas utilizando surfactante. Como mencionado anteriormente, a utilização de surfactante em sistemas com essas características é justificado pela baixa miscibilidade entre as fases glicerol e óleo, o que dificulta não somente a ação do catalisador mas também a homogeneidade do sistema.

Quando comparam-se os resultados obtidos até o momento, referente à produção de MAG e DAG em sistemas livre de solvente e surfactante com alguns trabalhos da literatura, relatos semelhantes são encontrados. O trabalho realizado por YANG et al. (2005a) reporta 22% de conversão de MAG em uma reação de 24 horas conduzida a temperatura de 40°C, razão molar glicerol:óleo 4,5:1, agitação de 500rpm utilizando a Novozym 435 como catalisador. Em estudo realizado por KAEWTHONG et al. (2005) usando a lipase imobilizada obtidas de *Pseudomonas* sp. (IM-PS) em sistema batelada conversões de 20,74% em MAG foram obtidas sob condições de 45°C, razão molar glicerol:palmoleína de 2:7, 4,0% (m/m) em água, agitação magnética de 300rpm durante 24h de reação. Com isso verifica-se que a utilização de surfactante em sistemas reacionais para produção de MAG e DAG livre de solvente oferece uma maior transferência de massa ocasionada pelo aumento da miscibilidade entre as fases, sendo possível a obtenção de altos conteúdos de MAG+DAG em um curto tempo de reação.

O uso de solventes orgânicos em sistemas reacionais contínuos também tem sido descrito como um fator responsável para o aumento das taxas de reação na

produção de monoglicerídeos. DAMSTRUP et al. (2006b) avaliaram a utilização da mistura de dois solventes orgânicos (terc-butanol e terc-pentanol) em sistema contínuo tendo como condições reacionais razão molar glicerol:óleo de 4:1, 30% de enzima (m/m) em relação ao óleo e temperatura de 50°C, obtendo nessas condições conversões de aproximadamente 55% de MAG em 20 minutos de reação quando a relação de solvente terc-butanol:terc-pentanol usada foi 80:20 (v/v). FERREIRA-DIAS et al. (2001) avaliaram a ação de duas lipases comerciais imobilizadas (Lipozyme IM e Novozym 435) como catalisadores na glicerólise do resíduo de óleo de oliva usando como solvente n-hexano. Em seu trabalho, os autores obtiveram em 1 hora de reação a conversão de 48% em MAG com 12% (m/m) da enzima Novozym 435, razão molar glicerol:óleo 1:2, com temperatura de 30°C.

Segundo OLIVEIRA & SCARPA (2004), a formação da microemulsão requer normalmente a presença de um tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e quando necessário um co-tensoativo, sendo que a orientação para sistemas A/O ou O/A é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, principalmente pelo seu balanço hidrofílico/lipofílico (BHL). O valor de BHL é representado por um número que varia de zero a 40 e indica características do processo de emulsificação. A Tabela 4 apresenta os valores de BHL teórico para os surfactantes utilizados neste trabalho. O valor do BHL tem sido muito usado na descrição de surfactantes comerciais podendo ser calculado através de dados experimentais ou com base na estrutura molecular deste surfactante, sendo que teoricamente emulsificantes com alto valor de BHL são recomendados para uso em sistemas O/A já para surfactantes com baixo valor de BHL a recomendação é para uso em sistemas A/O (ROSEN, 2004).

O sistema utilizado neste trabalho é formado por duas fases, sendo que a porção glicerol (polar) apresenta-se em maior quantidade que a porção óleo (apolar) sendo o sistema caracterizado como A/O, o que requer teoricamente o uso de um surfactante com baixo valor de HBL. Com isso, os resultados apresentados anteriormente (Tabela 3) podem ter uma parte de sua explicação baseado no valor do BHL, sendo que os surfactantes que conduziram a maiores valores de conteúdo de MAG+DAG são os surfactantes que apresentam os menores valores de BHL.

Tabela 4. Surfactantes não-iônicos e valor do balanço hidrofílico-lipofílico teórico.

Surfactante	HBL Teórico
Tween 40 - Polioxietileno sorbitol monopalmitato	15,6
Tween 65 - Polioxietileno glicol sorbitol monoestearato	10,5
Tween 80 – Polioxietileno glicol sorbitol Monooleato	15,0
Tween 85 - Polioxietileno sorbitol trioleato	11,0
Triton X-100 - 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) fenil-polietileno glicol	13,5
Lecitina de soja	-

Com isso, verifica-se que para o sistema reacional glicerol/óleo utilizado na glicerólise enzimática neste trabalho, os surfactantes que apresentaram melhor eficiência foram Tween 65, Tween 85 e Triton X-100 com valores de HBL 10,5, 11,0 e 13,5, respectivamente.

Como demonstrado anteriormente, o surfactante que apresentou melhor conteúdo em MAG+DAG ao final de 2 horas de reação foi o surfactante Tween 65, contudo, o surfactante Triton X-100 também apresentou um alto conteúdo em termos de MAG+DAG ao final da reação e apresenta-se como um surfactante de baixo custo quando comparado com os surfactantes Tween 65 e Tween 85. Neste contexto, os surfactantes escolhidos para o estudo de otimização das condições reacionais para a maximização da produção de MAG+DAG foram os surfactantes Tween 65 e Triton X-100.

4.2 Avaliação da atividade enzimática

A medida da atividade enzimática ao final da reação é um dado importante para a avaliação do desempenho do catalisador quando presente em um dado meio reacional, assim como possibilita a avaliação da existência de agentes inibidores ou competitivos no meio reacional identificados pela diminuição da atividade enzimática ou pela redução do conteúdo de MAG obtido. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a atividade enzimática da lipase imobilizada Novozym 435 ao final de 2 horas de reação.

Tabela 5. Atividade enzimática em função do surfactante utilizado

Surfactante	Perda ou Ganho de atividade (%) [*]
Tween 40	6,60
Tween 65	5,02
Tween 80	7,15
Tween 85	7,80
Lecitina de soja	-3,48
Triton X-100	-2,31

^{*}% Perda ou Ganho atividade (atividade inicial-atividade final)/atividade inicial*100

A atividade enzimática apresentou variações menores que 10% para mais ou para menos, quando em contato com os surfactantes utilizados neste trabalho, mostrando assim não exercer grande influência no valor da atividade enzimática ao final de 2 horas de reação, sendo que os surfactantes Tween 80, Tween 85, Tween 40 e Tween 65 conduziram a ganhos de atividade de 7,15%, 7,80%, 6,60% e 5,02%, respectivamente.

O tipo de surfactante usado na formação de sistema micelar pode exercer grande influência na atividade enzimática. REES et al. (1995) em seu trabalho, compararam a atividade de cinco diferentes lipases microbianas em microemulsão água em óleo (A/O) e verificaram que a atividade de lactonização foi maior para os sistemas baseados em surfactantes aniônicos (bis(2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio - AOT) que para sistemas baseados em surfactantes catiônicos (brometo de cetiltrimetil amônio - CTAB). FIAMETTI (2008) verificou que a atividade enzimática é inversamente proporcional à adição de AOT, sendo que com o aumento da concentração de surfactante observou-se um decréscimo na atividade residual da enzima Novozym 435.

XIU-GONG et al. (2000) avaliaram a estabilidade de uma nova lipase identificada e isolada de uma bactéria da espécie *Pseudomonas* incubada em diferentes tipos de surfactantes. Os resultados observados pelos autores mostram que em condições de pH 9,0, 0,1% (m/v) surfactante e 30°C, os surfactantes Tween 20 e Tween 80 apresentaram total redução da atividade enzimática em 90 minutos

de incubação. Por outro lado, a exposição da lipase ao surfactante Triton X-100 apresentou redução de 10% em 90 minutos de incubação.

YAMADA et al. (1993) utilizaram surfactantes não iônicos (Tween, Triton e Spam) para o sistema AOT/isooctano para o aumento da formação de micelas. A atividade hidrolítica da lipase *Chromobacterium viscosum* aumentou na presença do surfactante não iônico. AVRAMIOTIS et al. (1996) observaram a estabilidade da enzima *Pepacia* em microemulsão água/lecitina/isooctano/propanol em função do tempo, pH, temperatura e relação molar água/surfactante e verificaram que a lipase reteve 60% de sua atividade depois de 120 minutos.

Os resultados apresentados neste trabalho revelaram que os surfactantes testados não apresentaram grande influência na atividade do biocatalisador em 2 horas de reação. Os resultados obtidos podem ser explicados pela característica atóxica destes surfactantes. Assim, a exposição da lipase imobilizada a um sistema reacional contendo surfactante de grau alimentício traz a vantagem da possibilidade da reutilização deste biocatalisador ao longo de vários ciclos, reutilização esta que proporciona redução do custo do processo.

4.3 Avaliação do pH da reação na produção de MAG+DAG

Como mencionado anteriormente, cada surfactante apresenta características próprias. Com isso, o sistema micelar formado apresentará diferentes formas de atuação, as quais poderão apresentar variação tanto com a concentração e composição do surfactante quanto com a temperatura e pH do sistema. Com a finalidade de avaliar a influência do pH do meio reacional na produção de MAG+DAG foram testados os surfactantes Tween 40, Tween 65, Tween 80 e Tween 85, todos pertencentes à classe dos sorbitol e éster de sorbitol.

Os principais fatores que influenciam a velocidade de uma reação biocatalisada em sistema homogêneo é a concentração de enzima, o pH do meio reacional, concentração de substrato e temperatura da reação (BAILEY & OLLIS, 1986; PETERSEN et al., 2001). Com isso, a avaliação do pH do meio reacional ganha maior atenção, pois este pode estar diretamente relacionado com o conteúdo

de MAG obtido na glicerólise enzimática. A Figura 6 (A, B, C e D) apresenta os gráficos de pHs para os sistemas utilizando Tween 80, Tween 40, Tween 85 e Tween 65.

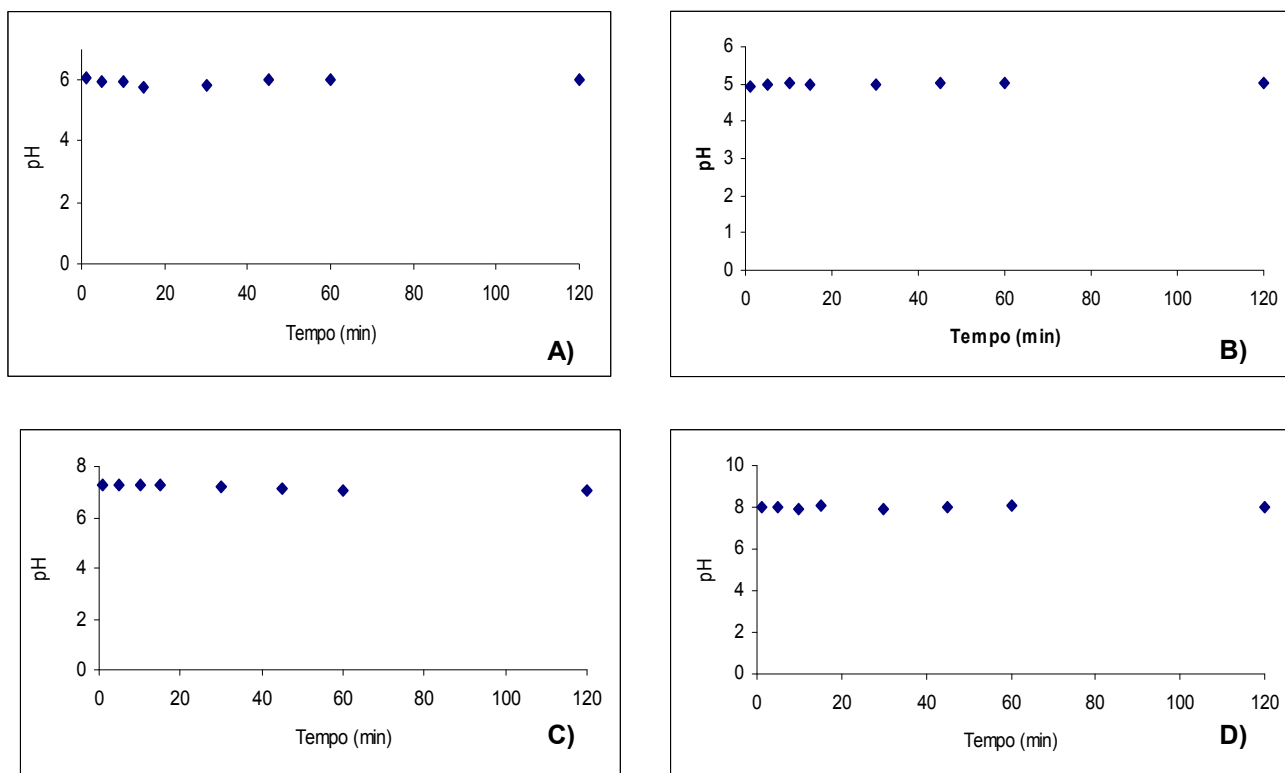


Figura 5 - Avaliação do pH dos sistemas reacionais utilizando os surfactantes Tween 80 (A), Tween 40 (B), Tween 65 (C) e Tween 85 (D) em 120 minutos de reação sob condições reacionais de 70°C, razão molar glicerol:óleo 2:1, 16% (m/m) de surfactante, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada e 600rpm.

Com a avaliação do pH do sistema reacional, verificou-se que os valores de pH dos sistemas reacionais com diferentes surfactantes, mantiveram-se constantes durante os 120 minutos de reação em 6,0, 5,0, 7,0 e 8,0, respectivamente, para os surfactantes Tween 80, Tween 40, Tween 85 e Tween 65. Segundo o fabricante, a faixa de pH ótimo para a atuação da lipase imobilizada Novozym 435 varia de 6 a 8, sendo assim, exceto para o surfactante Tween 40, observa-se que os surfactantes proporcionam sistemas reacionais com pH dentro da faixa ótima para a atuação desta lipase.

Para estarem ativas, algumas enzimas requerem que os resíduos catalíticos estejam na forma protonada para que ocorra interação com os substratos. Existem vários fatores que influenciam na carga eletrostática de cada um desses resíduos catalíticos como, por exemplo, constantes dielétricas, força iônica do solvente e a proximidade de outros sítios ativos carregados (PETERSEN et al., 2001). O resultado da escolha de um determinado pH afeta diretamente no equilíbrio das cargas protonadas e não protonadas. Assim, o pH é uma importante chave para atividade de enzima.

Para a avaliação da influência do pH sobre os surfactantes testados, o meio reacional foi perturbado com a adição de tampão fosfato ao meio reacional até o pH desejado. Com esta variação foi possível verificar que quando o pH do meio reacional foi alterado para valores menores ou maiores o conteúdo de MAG+DAG ao final da glicerólise também foi alterado, conforme resultados apresentados na Tabela 6 (A e B).

Tabela 6. Conteúdo de MAG, DAG, MAG+DAG e TAG obtidos na reação de glicerólise em pH 7,0 (A) e pH 5,0 (B) utilizando como condição reacional 70°C, razão molar glicerol:óleo 2:1, 16% (m/m) de surfactante, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada, 600rpm em 2 horas de reação.

(A)

Surfactante	pH 7,0			
	MAG (%)	DAG (%)	MAG+DAG (%)	TAG (%)
Tween 40	4,20	2,44	6,64	65,99
Tween 65	10,56	3,21	13,77	59,45
Tween 80	4,09	2,12	6,21	63,96
Tween 85	13,12	11,04	24,16	50,29

(B)

Surfactante	pH 5,0			
	MAG (%)	DAG (%)	MAG+DAG (%)	TAG (%)
Tween 40	10,59	8,32	18,91	57,96
Tween 65	3,42	2,03	5,45	62,15
Tween 80	3,85	1,56	5,41	63,08
Tween 85	2,20	0,23	2,43	69,12

É possível verificar pela Tabela 6 que, quando o pH do meio reacional foi perturbado os surfactantes apresentaram redução no conteúdo de MAG+DAG. Para valores de pH 7,0, ocorreram redução no conteúdo de MAG+DAG para valores de 6,21%, 13,77% e 6,64%, respectivamente para os surfactantes Tween 80, Tween 65 e Tween 40. O mesmo comportamento foi observado quando o pH do meio reacional foi alterado para pH 5,0, no qual os valores obtidos para o conteúdo de MAG+DAG foram de 2,43%, 5,41% e 5,45%, respectivamente para os surfactantes Tween 85, Tween 80 e Tween 65.

A redução no conteúdo de MAG+DAG ao final do tempo de reação quando o pH foi alterado, pode ser explicado pela existência de alguma alteração na conformação estrutural do surfactante e também pela interferência do alto teor de água presente no meio adicionada através da adição do tampão fosfato. Este aumento pode ser explicado pelo aumento da atuação do biocatalisador por estar em um meio reacional com pH ótimo para sua atuação. Segundo PETERSEN et al. (2001) quando o pH é alterado para condições mais ácidas ocorre uma polarização crescente do sítio ativo que apresenta um potencial mais positivo, o mesmo ocorre para mudanças de pH para condições mais básicas o potencial de sítio ativo se torna mais negativo.

Os resultados encontrados neste trabalho comprovaram a hipótese de que mudanças no valor do pH alteram o potencial elétrico do sítio ativo, agindo de forma negativa com o ácido graxo.

O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa, quando há ligação do substrato na superfície da enzima,

esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface. A intensidade do sinal eletrostático como função do valor do pH determina assim o perfil de atividade de pH da enzima (DEREWENDA et al., 1994; RODRIGUES et al., 2009).

Sabendo que enzimas são proteínas, mudanças de pH ocasionam alterações no caráter iônico dos grupos aminos e nos grupos carboxilados da proteína, afetando o sítio catalítico e a conformação desta enzima. Tais mudanças afetam diretamente a interação enzima-substrato afetando assim a taxa de reação e a estabilidade da enzima. Além de mudanças no caráter iônico, mudanças do pH podem provocar a inativação da proteína enzimática. Assim, cada enzima possui uma faixa ótima de pH, onde sua velocidade de reação é máxima (BAILEY & OLIS, 1986). Sendo assim, é possível verificar que para os sistemas reacionais que apresentaram pH próximo a neutralidade, proporcionaram a obtenção de maiores conteúdos em termos de MAG+DAG.

4.4 Otimização da produção de MAG+DAG utilizando Tween 65 e Triton X-100 como surfactantes

Considerando que inúmeras variáveis possam estar envolvidas em processos enzimáticos, existe uma tendência pelo emprego da metodologia de planejamento estatístico como forma de minimização do esforço experimental exigido na obtenção de dados relevantes. A utilização desta ferramenta possibilita verificar a influência de inúmeras variáveis envolvidas bem como a interação entre elas na resposta de um determinado processo (BOX et al., 1978).

Sendo assim, com o objetivo de otimizar a produção de MAG+DAG em meio reacional livre de solvente utilizando os surfactantes Tween 65 e Triton X-100, primeiramente utilizou-se um planejamento 2^3 completo com triplicata no ponto central onde foram avaliadas as variáveis concentração de enzima imobilizada, concentração de surfactante e razão molar glicerol:óleo. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados para o primeiro

planejamento 2³ completo, com suas respectivas respostas em termos de conteúdo de MAG+DAG.

Tabela 7. Matriz do primeiro planejamento experimental completo (valores reais e codificados) em termos de MAG+DAG usando Tween 65 e Triton X-100 como surfactante. Condição experimental: 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.

Exp.	G:O (mol/mol)	Concentração Surfactante (% m/m)	Concentração Enzima (% m/m)	MAG + DAG (%)	
				Tween 65	Triton X-100
1	1:1 (-1)	10 (-1)	6,5 (-1)	18,55	21,79
2	3:1 (+1)	10 (-1)	6,5 (-1)	21,75	22,90
3	1:1 (-1)	16 (+1)	6,5 (-1)	25,00	24,15
4	3:1 (+1)	16 (+1)	6,5 (-1)	16,01	22,23
5	1:1 (-1)	10 (-1)	8,5 (+1)	18,76	23,40
6	3:1 (+1)	10 (-1)	8,5 (+1)	22,18	24,32
7	1:1 (-1)	16 (+1)	8,5 (+1)	22,58	20,56
8	3:1 (+1)	16 (+1)	8,5 (+1)	32,78	25,44
9	2:1 (0)	13 (0)	7,5 (0)	28,91	25,07
10	2:1 (0)	13 (0)	7,5 (0)	28,80	24,33
11	2:1 (0)	13 (0)	7,5 (0)	28,83	25,35

Através dos resultados apresentados na Tabela 7, nas faixas investigadas para cada variável, verifica-se que o conteúdo de MAG+DAG aumenta com o aumento da razão molar glicerol:óleo de oliva, assim como com o aumento da concentração de enzima imobilizada e da concentração de surfactante. Ainda na Tabela acima é possível observar a boa reprodutibilidade dos dados experimentais observados através dos experimentos do ponto central. Os maiores conteúdos em termos de MAG+DAG foram obtidos no ensaio 8 (Tabela 7) alcançando valores de 32,78% e 25,44%, respectivamente para os surfactantes Tween 65 e Triton X-100 sob condição reacional de razão molar glicerol:óleo de oliva 3:1, 16% de surfactante, 8,5% de enzima, 70°C, 600rpm em 2 horas de reação.

Ainda na Tabela 7, pode-se verificar que para o surfactante Triton X-100 os conteúdos de MAG+DAG nos diferentes ensaios apresentam-se muito próximos, isso pode ser explicado pela compensação dos valores de MAG e DAG que quando somados, o conteúdo de MAG+DAG obtido apresentou valores semelhantes.

Os resultados obtidos no primeiro planejamento de experimentos utilizando Tween 65 como surfactante foram tratados estatisticamente e os efeitos encontrados para as variáveis podem ser observados no Gráfico de Pareto apresentado na Figura 7, permitindo observar que a variável concentração de enzima imobilizada apresentou influência positiva no conteúdo de MAG+DAG, seguida da razão molar glicerol:óleo de oliva e da concentração de surfactante Tween 65, a nível de 95% de confiança, o que indica que um deslocamento dos níveis de concentrações de enzima imobilizada, surfactante e razão molar glicerol:óleo para valores superiores acarretariam em um incremento no conteúdo de MAG+DAG.

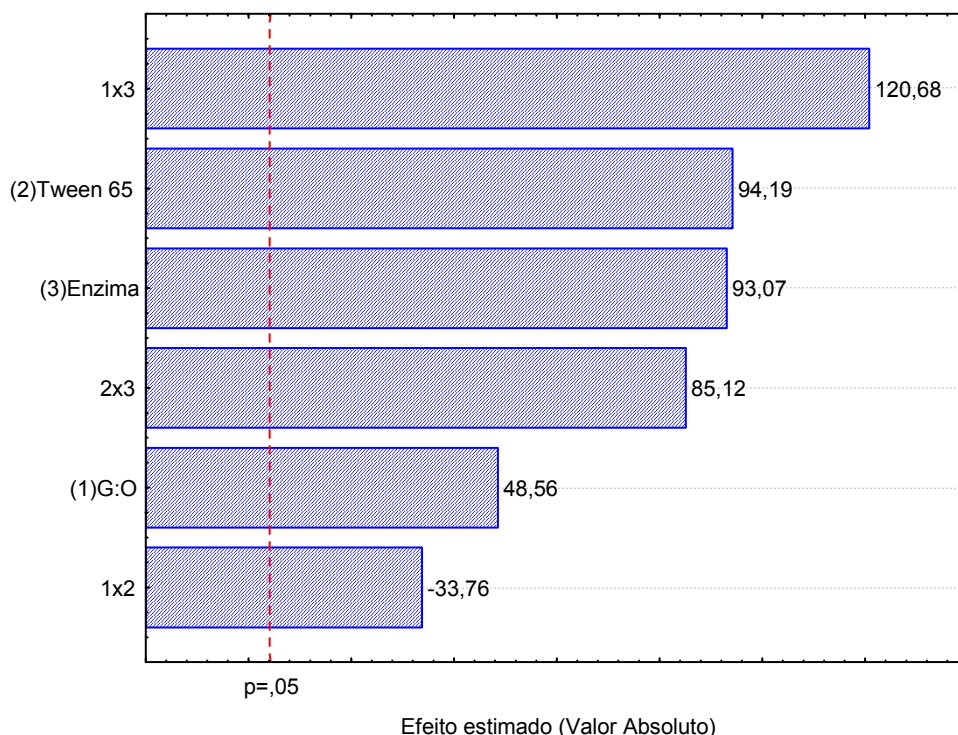


Figura 6 - Gráfico de Pareto para análise de efeito das variáveis no conteúdo de MAG+DAG no primeiro planejamento de experimentos utilizando Tween 65 como surfactante

Pela figura acima pode ser sugerido que maiores concentrações de enzima imobilizada e de Tween 65 bem como maior razão molar glicerol:óleo de oliva, proporcionem a obtenção de maiores conteúdos de MAG+DAG. Segundo STAMATIS et al. (1999), sistemas microemulsionados contribuem para a formação de micelas reversas, este fator pode aumentar a área interfacial e o substrato ser catalisado mais facilmente.

Como o objetivo principal desta etapa foi incrementar o conteúdo de MAG e DAG, realizou-se um segundo planejamento fatorial completo 2^3 , baseado nas respostas das variáveis independentes obtidas no planejamento anterior. Para tanto, as variáveis independentes tiveram seus níveis deslocados para valores superiores. Nesta etapa, as variáveis agitação, temperatura e tempo de reação foram fixadas em 600rpm, 70°C e 2 horas, respectivamente, para todos os experimentos.

A matriz do segundo planejamento fatorial completo 2^3 , com os níveis adotados para a razão molar glicerol:óleo de oliva, a concentração de enzima imobilizada e concentração de surfactante com seus respectivos resultados em termos do conteúdo de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, para os surfactantes Tween 65 e Triton X-100, respectivamente.

Tabela 8. Matriz do segundo planejamento fatorial 2^3 completo com pontos axiais (valores reais e codificados) com as respostas do conteúdo de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG usando Triton X-100 como surfactante. Condição experimental 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.

Exp.	G:O (mol/mol)	Surfactante (%m/m)	Enzima (%) m/m)	MAG (%)	DAG (%)	MAG + DAG (%)	TAG (%)
1	4:1 (-1)	14 (-1)	8,0 (-1)	8,97	9,61	18,58	45,64
2	8:1 (+1)	14 (-1)	8,0 (-1)	12,39	9,84	22,23	39,17
3	4:1 (-1)	18 (+1)	8,0 (-1)	9,75	10,72	20,47	43,54
4	8:1 (+1)	18 (+1)	8,0 (-1)	14,65	9,70	24,35	39,03
5	4:1 (-1)	14 (-1)	10 (+1)	10,65	9,73	20,38	47,37
6	8:1 (+1)	14 (-1)	10 (+1)	12,79	10,05	22,84	40,21
7	4:1 (-1)	18 (+1)	10 (+1)	10,82	8,82	19,64	46,22
8	8:1 (+1)	18 (+1)	10 (+1)	17,44	9,15	26,59	35,12
9	3:1 (-1,68)	16 (0)	9,0 (0)	13,51	8,99	22,5	49,01
10	9:1 (1,68)	16 (0)	9,0 (0)	14,78	12,28	27,06	38,77
11	6:1 (0)	13 (-1,68)	9,0 (0)	11,61	11,38	22,99	41,00
12	6:1 (0)	19 (1,68)	9,0 (0)	17,31	10,24	27,55	48,23
13	6:1 (0)	16 (0)	7,5 (-1,68)	16,52	6,74	23,26	39,52
14	6:1 (0)	16 (0)	10,5 (1,68)	24,45	12,58	37,03	41,22
15	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	27,63	11,08	38,71	38,73
16	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	26,77	10,25	37,02	37,98
17	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	27,02	9,61	36,63	38,54

Através da observação dos resultados obtidos no segundo planejamento de experimentos, utilizando o surfactante Triton X-100, verifica-se que os maiores conteúdos de MAG+DAG foram obtidos nos ensaios 15, 16 e 17 relativos ao ponto central, caracterizando a otimização da produção de MAG+DAG. A condição otimizada obtida através do planejamento de experimentos, possibilitou a obtenção de 37,4% em termos de MAG+DAG para o surfactante Triton X-100, sob condição reacional de 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo 6:1, 16% (m/m) de surfactante, 9% (m/m) de enzima imobilizada em 2 horas de reação.

Os dados obtidos no segundo planejamento de experimentos foram analisados estatisticamente. A Tabela 9 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta do conteúdo de MAG+DAG em função das variáveis independentes analisadas (razão molar glicerol:óleo de oliva, concentração de enzima imobilizada e concentração de Triton X-100), dentro da faixa estudada.

Tabela 9. Coeficientes e probabilidade (p) do modelo para a glicerólise enzimática do óleo de oliva utilizando Triton X-100 como surfactante.

Variáveis*	MAG + DAG (%)	
	Coeficiente	p
Média/Interação	37,73	0,0002
(1) glicerol:óleo de oliva (L)	1,80	0,0264
glicerol:óleo de oliva (Q)	-5,42	0,0036
Triton X-100 (Q)	-5,24	0,0039
(3) Enzima imobilizada (L)	1,97	0,0221
Enzima imobilizada (Q)	-3,52	0,0086

*Coeficiente de determinação=0,92.

O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 10. O coeficiente de determinação obtido de 0,92 e o F calculado 3,3 vezes maior que o valor tabelado permitiu a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 8 (A, B e C).

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para o conteúdo de MAG+DAG.

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	607,68	5	121,53	10,67
Resíduos	125,24	11	11,38	
Falta de ajuste	122,80	9		
Erro	2,44	2		
Total	732,92	16		

Resíduo = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 3,2$; Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,92$

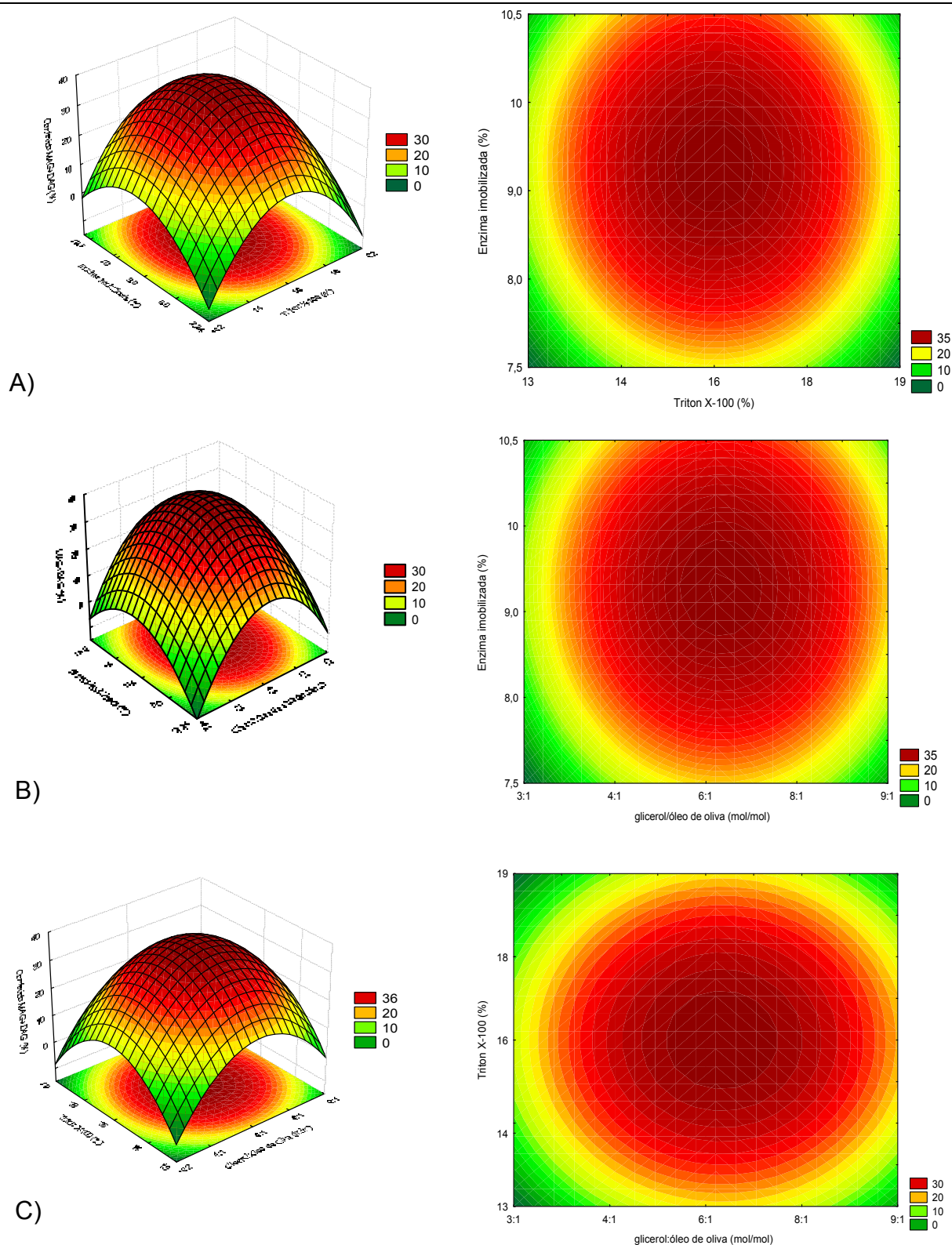


Figura 7 - Superfície de resposta e curva de contorno para o conteúdo de MAG (%) em função da concentração de enzima imobilizada e Triton X-100 (A), enzima imobilizada e razão molar glicerol:óleo de oliva (B) e razão molar glicerol:óleo e Triton X-100 (C).

As superfícies de respostas e curvas de contorno apresentadas mostram a influência da adição de enzima imobilizada, surfactante Triton X-100 e razão molar glicerol:óleo de oliva ao conteúdo final de MAG+DAG. Através do segundo planejamento de experimentos foi possível otimizar a produção de MAG+DAG obtido nos ensaios 15, 16 e 17, relativos ao ponto central do planejamento, tendo como condições experimentais concentração de enzima imobilizada, Triton X-100 e razão molar glicerol:óleo de oliva de 9,0% (m/m), 16% (m/m) e 6:1, respectivamente.

Tabela 11. Matriz do segundo planejamento fatorial 2^3 completo com pontos axiais (valores reais e codificados) com as respostas do conteúdo de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG usando Tween 65 como surfactante. Condição experimental 70°C, 600rpm e 2 horas de reação.

Exp.	G:O (mol/mol)	Surfactante (% m/m)	Enzima (%m/m)	MAG (%)	DAG (%)	MAG + DAG (%)	TAG (%)
1	4:1 (-1)	14 (-1)	8,0 (-1)	11,37	9,36	20,73	51,51
2	8:1 (+1)	14 (-1)	8,0 (-1)	13,90	7,15	21,05	58,12
3	4:1 (-1)	18 (+1)	8,0 (-1)	10,09	10,23	20,32	59,41
4	8:1 (+1)	18 (+1)	8,0 (-1)	14,17	9,37	23,54	51,63
5	4:1 (-1)	14 (-1)	10 (+1)	15,33	11,19	26,52	57,29
6	8:1 (+1)	14 (-1)	10 (+1)	18,18	9,15	27,33	46,95
7	4:1 (-1)	18 (+1)	10 (+1)	12,50	12,46	24,96	56,14
8	8:1 (+1)	18 (+1)	10 (+1)	19,04	13,26	32,30	52,61
9	3:1 (-1,68)	16 (0)	9,0 (0)	10,64	8,73	23,37	45,75
10	9:1 (1,68)	16 (0)	9,0 (0)	18,47	13,43	31,90	54,30
11	6:1 (0)	13 (-1,68)	9,0 (0)	18,44	12,38	30,82	47,05
12	6:1 (0)	19 (1,68)	9,0 (0)	17,28	12,25	29,53	46,07
13	6:1 (0)	16 (0)	7,5 (-1,68)	15,76	19,87	35,63	45,68
14	6:1 (0)	16 (0)	10,5 (1,68)	22,04	16,41	38,45	45,32
15	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	25,27	15,56	40,83	48,39
16	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	26,62	17,55	43,17	35,79
17	6:1 (0)	16 (0)	9,0 (0)	26,03	14,43	40,46	46,34

O mesmo tratamento estatístico apresentado anteriormente foi aplicado aos dados obtidos no segundo planejamento de experimentos (Tabela 11) utilizando o surfactante Tween 65. A Tabela 12 apresenta o modelo codificado não linear de segunda ordem, que descreve a resposta do conteúdo de MAG+DAG em função das variáveis independentes analisadas (razão molar glicerol:óleo de oliva, concentração de enzima imobilizada e concentração de Tween 65), dentro da faixa estudada.

O modelo foi validado pela análise de variância ANOVA apresentados na Tabela 13. O coeficiente de determinação obtido foi de 0,92 e o F calculado apresentou-se 2,9 vezes maior que o valor tabelado permitiu a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na Figura 9 (A, B e C).

Tabela 12. Coeficientes e probabilidade (p) do modelo para a glicerólise enzimática do óleo de oliva utilizando Tween 65 como surfactante.

Variáveis*	MAG + DAG (%)	
	Coeficiente	P
Média/Interação	41,87	0,0004
G:O (Q)	-6,89	0,0040
Tween 65 (Q)	-5,28	0,0068
Enzima (Q)	-2,84	0,0229

*Coeficiente de determinação=0,92.

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) para o conteúdo de MAG+DAG.

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F calculado
Regressão	663,75	3	221,25	9,98
Resíduos	288,18	13	22,16	
Falta de ajuste	279,82	11		
Erro	8,35	2		
Total	951,93	16		

Resíduo = Falta de Ajuste + Erro puro; $F_{\text{tab},95\%} = 3,4$; Coeficiente de determinação: $R^2 = 0,92$

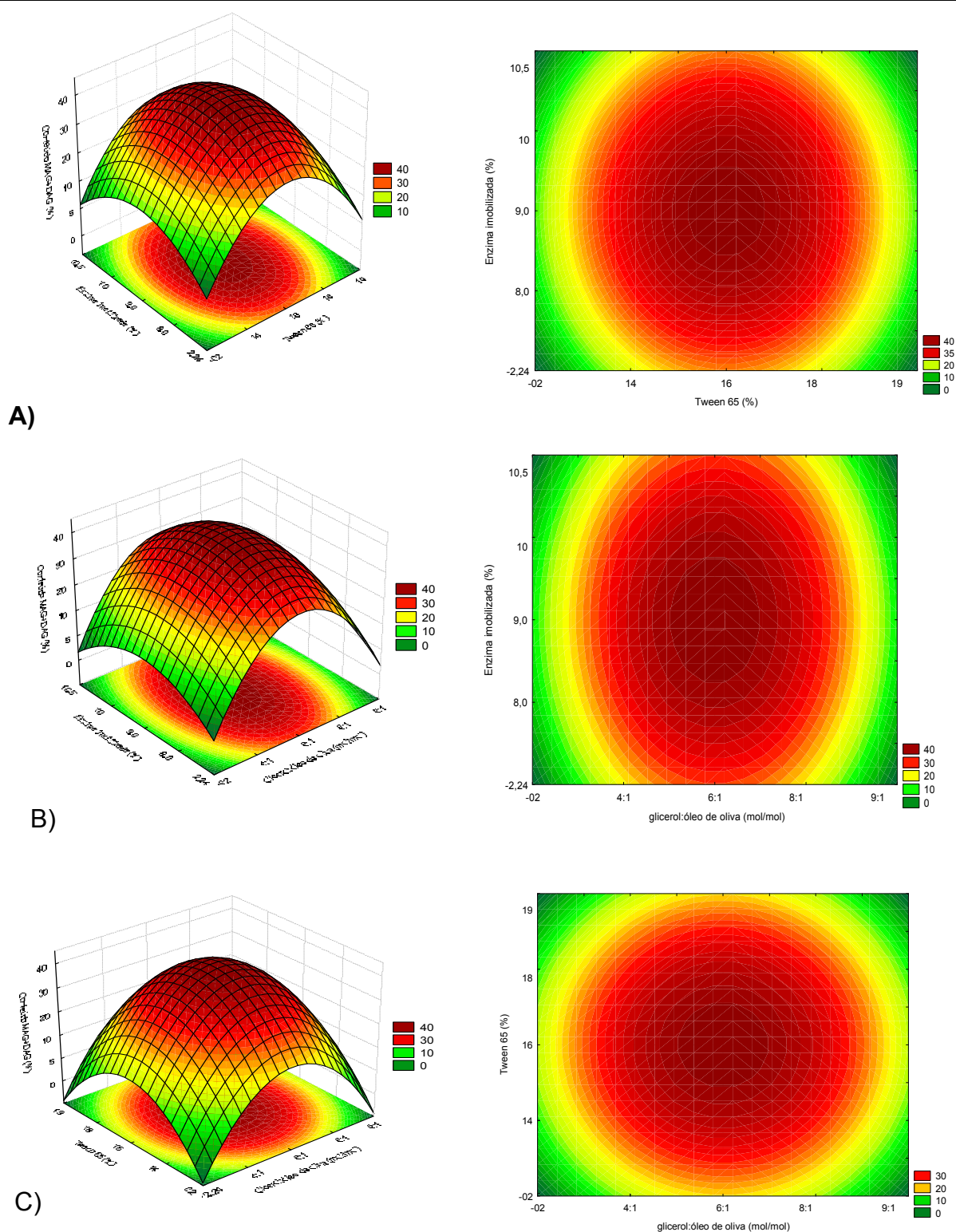


Figura 8 - Superfície de resposta e curva de contorno para o conteúdo de MAG (%) em função da concentração de enzima imobilizada e Tween 65 (A), enzima imobilizada e razão molar glicerol:óleo de oliva (B) e razão molar glicerol:óleo e Tween 65 (C).

As superfícies de respostas e curvas de contorno apresentadas na figura anterior mostram a influência da adição de enzima imobilizada, surfactante Tween 65 e razão molar glicerol:óleo de oliva ao conteúdo final de MAG+DAG. Com o segundo planejamento de experimentos foi possível otimizar a produção de MAG+DAG obtido nos ensaios 15, 16 e 17, relativos ao ponto central do planejamento, tendo como condições experimentais concentração de enzima imobilizada, Tween 65 e razão molar glicerol:óleo de oliva de 9,0% (m/m), 16% (m/m) e 6:1 respectivamente.

O modelo matemático capaz de ajustar um conjunto de dados experimentais deve ser validado em condições diferentes as empregadas no planejamento experimental. Esta é uma regra válida, principalmente para modelos empíricos, como é o caso dos apresentados nas Tabelas 9 e 12 deste trabalho. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura gera um modelo empírico através de metodologia de planejamento experimental validado pela ANOVA e considera isto suficiente para validar o modelo. O ANOVA é uma ferramenta muito útil por conferir confiabilidade ao modelo, mas é crucial avaliar a predição do modelo em condições não empregadas no planejamento experimental. Esta é a garantia que o modelo gerado é realmente válido dentro da faixa investigada, podendo ser usado como uma ferramenta fidedigna.

A Tabela 14 apresenta a validação do modelo para o glicerólise enzimática na faixa de concentrações estudada. Seis condições experimentais diferentes das adotadas anteriormente nos planejamentos experimentais foram avaliadas. Em todos os casos o modelo predito apresentou resultados satisfatórios e próximos aos valores experimentais. Os resultados obtidos durante a ANOVA e na validação permitem concluir que os modelos empíricos são válidos para predição do conteúdo de MAG+DAG na faixa experimental estudada, delineadas pelo planejamento de experimentos.

Tabela 14. Validação experimental do modelo predito usando Tween 65 e Triton X-100 como surfactantes em termos de MAG+DAG.

G:O (mol/mol)	Surfactante (% m/m)	Enzima (% m/m)	Tween 65		Triton X-100	
			Conteúdo predito (%)	Conteúdo experimental (%)	Conteúdo predito (%)	Conteúdo experimental (%)
5:1	15	7,0	36,16	36,38 ± 0,73	36,08	36,16 ± 0,92
7:1	15	7,0	37,69	39,99 ± 0,25	35,6	37,69 ± 0,89
7:1	17	7,0	38,43	40,52 ± 0,78	36,04	37,85 ± 0,93
5:1	15	9,5	38,01	40,01 ± 0,56	34,73	38,01 ± 1,05
7:1	15	9,5	40,11	41,79 ± 0,51	34,65	39,82 ± 1,22
7:1	17	9,5	40,43	43,39 ± 0,89	37,80	41,02 ± 0,99

Como mencionado anteriormente, na literatura, os trabalhos que relatam a produção de MAG através da reação de glicerólise fazem comumente uso de solventes orgânicos como surfactantes da reação, como o trabalho de KAEWTHONG & H-KITTIKUN (2004). Os referidos autores realizaram a glicerólise enzimática de óleo de palma com 10% (m/v) de óleo de palma numa mistura acetona/isoctano, razão molar glicerol:óleo de 8:1, 10% (m/m) de água, 50% de lipase IM-OS com base no óleo, 45°C em 24 horas de reação, obtendo 56% de MAG, em sistema reacional utilizando solvente, o que torna o sistema reacional menos vantajoso.

Alguns trabalhos fazem relatos da obtenção de MAG em sistemas livres de solventes, no entanto com a necessidade de longos tempos de reação. Um exemplo é o trabalho realizado por GHAMGUI et al. (2006), que utilizaram ácido oléico e glicerol como substratos, lipase imobilizada de *S. simulans* (100 IU) com adição de 5% (m/m) de água e obtiveram conversão de 71,7% de MAG em 24 horas de reação.

A partir das Tabelas 8 e 11 verifica-se que, para ambos os surfactantes nos ensaios com razão molar glicerol:óleo de oliva em níveis superiores a 6:1 (8:1 e 9:1) ocorreu uma redução no conteúdo de MAG+DAG, esta redução observada pode ser

neste caso explicada pelo pouco tempo de reação ou pelo excesso de glicerol no meio reacional ter dificultado a transferência de massa para o sítio ativo da enzima pela sua aderência ao suporte enzimático. YANG et al. (2005b) analisaram o efeito da razão molar glicerol:óleo (4,5:1, 7:1, 9:1, 11:1, 13:1 e 46:1) na glicerólise do óleo de girassol com temperatura de 70°C, 8% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 500rpm e 5 horas de reação, em sistema livre de surfactante e solvente e obtiveram 17% de MAG com a razão molar 9:1 de glicerol:óleo.

Os resultados obtidos até aqui mostram que o emprego de sistemas reacionais livre de solvente possibilitou a obtenção de conteúdos significativos de MAG+DAG em curto período de tempo. Sendo assim, a utilização de surfactantes de grau alimentício em reações de glicerólise para produção de MAG e DAG apresenta-se como uma boa alternativa para a substituição de solvente orgânico e a redução do tempo de reação visto que a utilização de surfactante promove o aumento da taxa de transferência de massa no sistema, aumentando o contato do catalisador enzimático com o substrato auxiliando, assim, a obtenção dos produtos da reação.

4.5 Estudo cinético da glicerólise enzimática para produção de MAG e DAG em sistema livre de solvente

Para a realização do estudo cinético da produção enzimática de MAG+DAG em sistema livre de solvente optou-se pela utilização do surfactante Triton X-100 devido ao seu baixo custo comercial quando comparado com os demais surfactantes testados neste trabalho. O estudo cinético foi realizado a partir das condições experimentais otimizadas no segundo planejamento experimental realizado previamente, tendo como objetivo avaliar o comportamento das variáveis concentração de enzima imobilizada, temperatura, razão molar glicerol:óleo de oliva e concentração de surfactante, bem como acompanhar o perfil da formação dos produtos da reação, MAG+DAG, ao longo do tempo.

Enzimas quando catalisam uma dada reação apresentam diferentes mecanismos de ação sobre seus substratos específicos. Muitas abordagens são

comumente utilizadas para estudar estes mecanismos de ação. Contudo, a abordagem clássica para a compreensão dos mecanismos enzimáticos é determinar a velocidade inicial da reação e a influência dos parâmetros experimentais através de um estudo cinético.

A Figura 9 apresenta o perfil do consumo do substrato TAG e a formação dos produtos MAG e DAG na glicerólise enzimática com as condições otimizadas previamente, em 6 horas de reação.

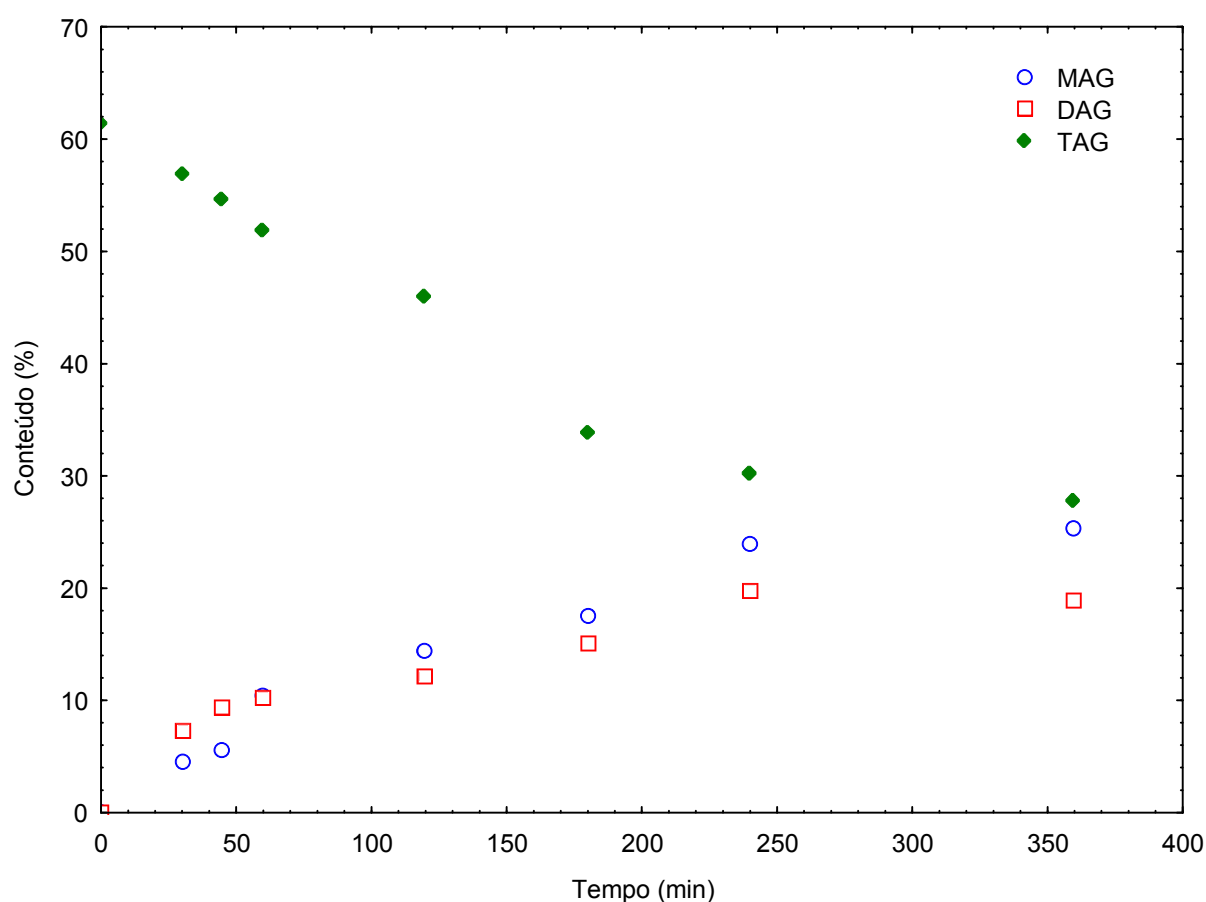


Figura 9 - Perfil de consumo dos substratos e formação dos produtos no estudo cinético.

Condição reacional: razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1 (mol/mol), concentração de Triton X-100 16% (m/m), concentração de enzima imobilizada 9% (m/m), 600rpm e 70°C.

Através da Figura 9 pode-se observar claramente que a reação ocorre de forma irreversível. Picos de produtos intermediários (MAG e DAG) ocorrem paralelamente. O aumento da concentração de MAG não depende da diminuição da concentração de DAG. Como esperado, inicialmente a produção de DAG é superior a produção de MAG, sendo que ao longo da reação o composto intermediário é gradativamente superado pela produção de MAG. Estes resultados estão de acordo com resultados apresentados na literatura (CHEIRSILP et al., 2007). O aumento rápido em MAG e DAG depois de 2 horas e a diminuição exponencial em TAG é aparente. Em 6 horas de reação as concentrações de MAG, DAG e TAG permanecem estáveis, indicando o equilíbrio do sistema. Em 4 horas de reação foram obtidos resultados em termos de conteúdo em MAG e de DAG de 22% e 19%, respectivamente.

4.5.1 Efeito da concentração de enzima imobilizada na produção de MAG+DAG

Para a avaliação da produção de MAG+DAG em função da concentração de enzima imobilizada com o tempo, o sistema foi avaliado mantendo constante a temperatura em 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva em 6:1 e concentração de surfactante em 16% (m/m). A concentração de enzima foi variada em 2,5, 10 e 18% (m/m), possibilitando assim a obtenção das curvas cinéticas apresentadas na Figura 10.

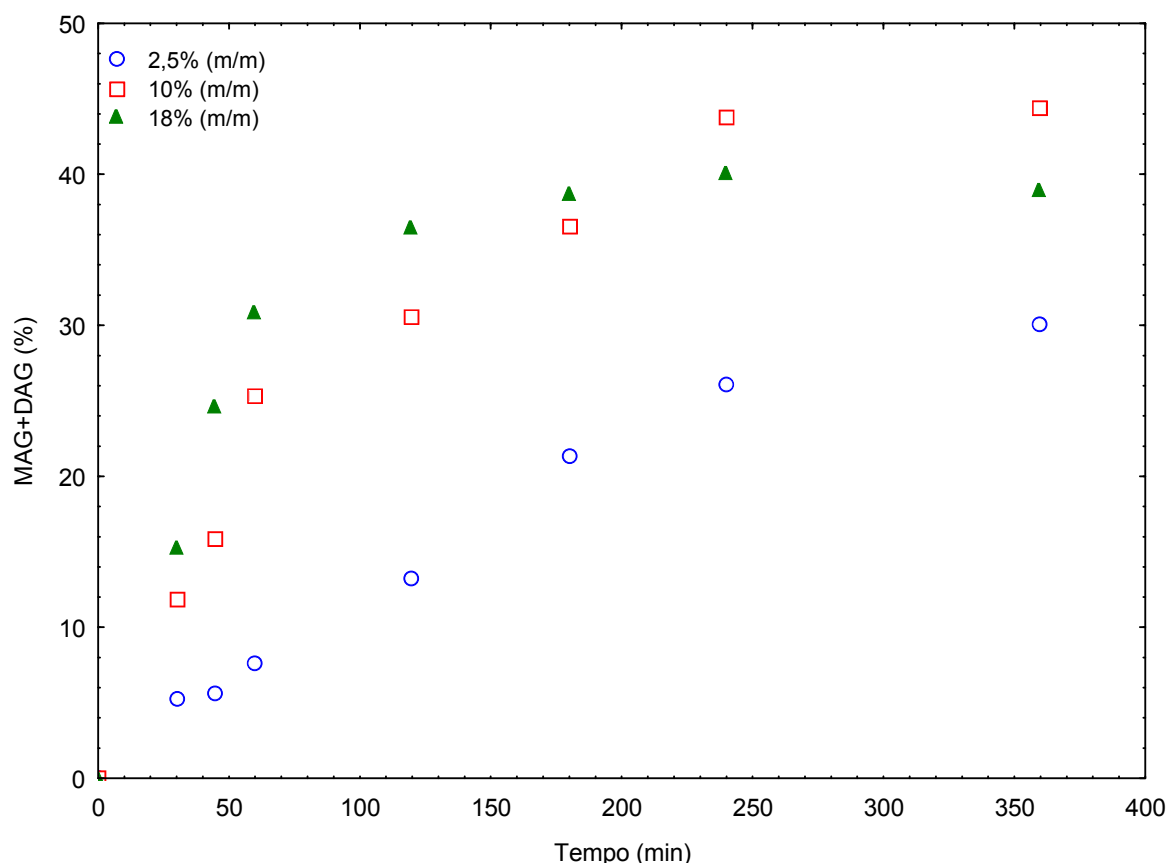


Figura 10 - Efeito da concentração de enzima imobilizada na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1, 16% (m/m) de Triton X-100.

Na avaliação da concentração do catalisador enzimático, verifica-se que os maiores conteúdos de MAG+DAG foram obtidos utilizando 10% (m/m) de enzima imobilizada em 6 horas de reação. Como esperado, a condição reacional com 2,5% (m/m) de enzima imobilizada propiciou menor conteúdo de MAG+DAG, atingindo conteúdo máximo de 30,05% em 6 horas de reação, valor semelhante a este obtido em 1 e 2 horas de reação quando o conteúdo de enzima imobilizado era de 10 e 18% (m/m) respectivamente, o que sugere que para menores concentrações de enzima imobilizada, maiores tempos de reação são necessários para obtenção de um maior conteúdo de MAG+DAG.

Quando se compara a adição de enzima imobilizada nos níveis de 10 e 18% (m/m), verifica-se que até 3 horas de reação o conteúdo de MAG+DAG aumenta

gradativamente para ambas as condições, no entanto, após 4 horas de reação o conteúdo de MAG+DAG para a condição de 18% (m/m) tem uma leve redução de 40% para 38,9%. Por outro, lado quando o conteúdo enzimático era de 10% (m/m) o conteúdo de MAG+DAG aumentou atingindo um valor de 44,3% em 6 horas de reação. A redução na obtenção de produtos da reação quando adicionado maior conteúdo de catalisador enzimático pode ser explicado pela redução da transferência de massa no sistema. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com trabalhos realizados por WATANABE et al. (2003) e YANG et al. (2005b), observaram que a utilização de valores acima de 10% (m/m) no conteúdo de enzima imobilizada para obtenção de MAG através da glicerólise conduz a uma redução do conteúdo de MAG, provavelmente devido a formação de aglomerados enzimáticos dificultando a transferência de massa.

Sendo assim, o excesso de enzima imobilizada ao sistema pode não trazer benefícios a obtenção de MAG+DAG, como observado na Figura 10, sendo que a concentração de 10% (m/m) pode ser considerada ótima para este sistema reacional.

A Figura 11 apresenta a taxa de reação inicial para o efeito concentração de enzima imobilizada até os 60 minutos de reação, faixa de tempo esta correspondente parte linear da curva cinética, possibilitando assim a realização da determinação da taxa inicial da reação a fim de obter uma melhor visualização dos conteúdos de MAG+DAG nos tempos iniciais da reação. Através da Equação 2, apresentada no item 3.2.8 do capítulo Materiais e Métodos, foram efetuados os cálculos das taxas inicial de reação para cada variável estudada.

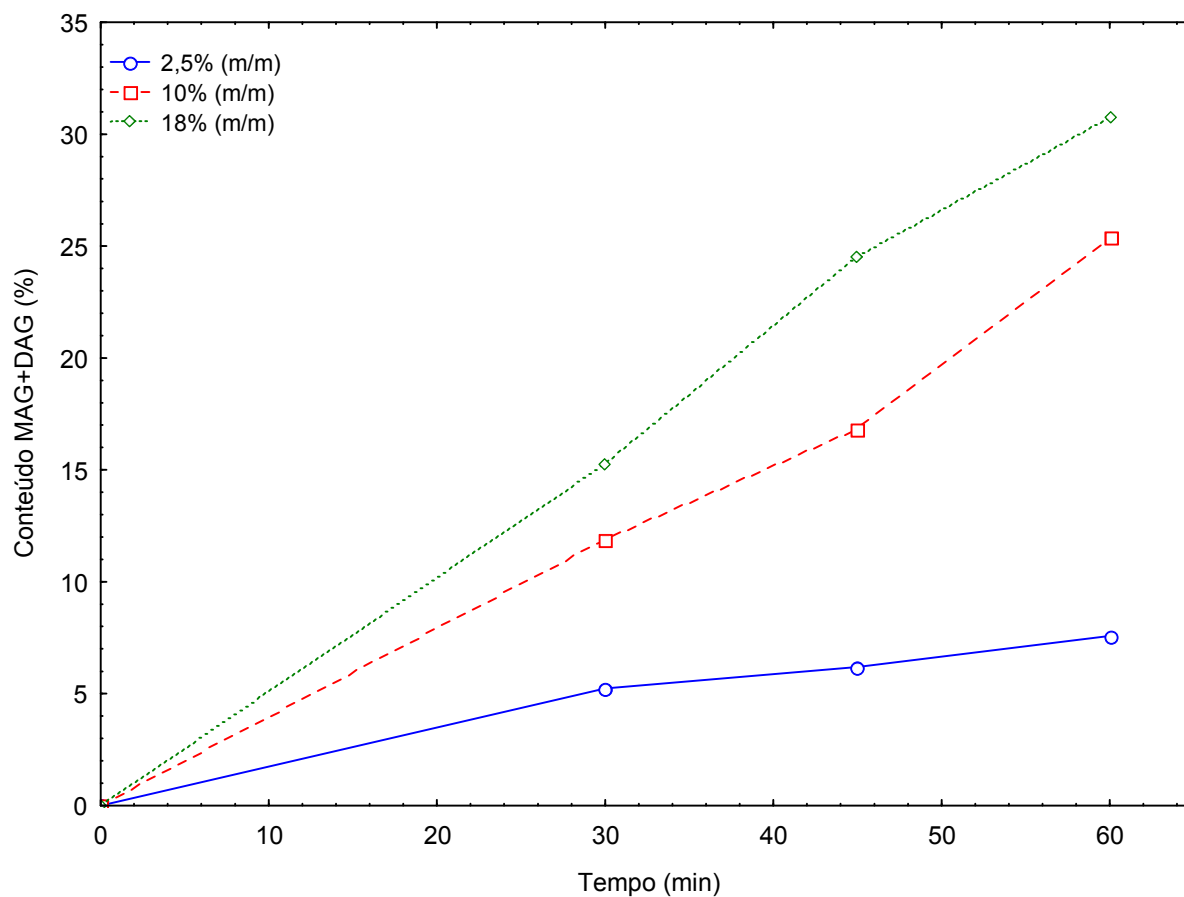


Figura 11 - Efeito da concentração de enzima no conteúdo de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de Triton X-100 16% (m/m).

A partir da Figura 11 observa-se que quando a concentração de enzima imobilizada aumentou de 2,5% (m/m) para 10% e 18% (m/m) a taxa inicial da reação também foi aumentada. Os resultados apresentados mostram que a presença do catalisador enzimático no meio reacional ocasiona o aumento da taxa inicial da reação favorecendo a rápida obtenção dos produtos da reação. Os dados referentes às taxas iniciais de reação em função da concentração de enzima imobilizada no meio reacional são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Taxa inicial de reação em função da concentração de enzima imobilizada.

Concentração de Enzima imobilizada (% m/m)	r (min ⁻¹)
2,5	0,12
10	0,42
18	0,51

Através das respostas obtidas para as taxas iniciais da reação em função da variação das concentrações de enzima imobilizada foi possível verificar que maiores concentração de enzima no meio reacional 10 e 18% (m/m), além de apresentar uma taxa inicial de reação elevada 0,42 e 0,51min⁻¹ respectivamente é notável também a obtenção de um elevado conteúdo em termos de MAG+DAG de aproximadamente 45%, quando comparado com os resultados obtidos para o mesmo sistema reacional com redução no conteúdo enzimático para 2,5 (m/m), o qual conduziu a taxa inicial de 0,12 e conteúdo de MAG+DAG de aproximadamente 30%.

Assim, como os resultados encontrados neste trabalho, FIAMETTI (2008), ao estudar o sistema reacional para produção de MAG através da glicerólise do óleo de oliva utilizando lipase Novozym 435, como catalisador e AOT como surfactante observou que na variação do conteúdo enzimático na faixa de 1 a 10% (m/m), quando a concentração de enzima imobilizada no meio reacional foi de 10% (m/m), maiores taxas iniciais de reação foram observadas.

4.5.2 Efeito do teor de surfactante Triton X-100 na produção de MAG+DAG

A utilização de surfactante tem como objetivo promover o aumento da miscibilidade entre as fases glicerol e óleo de oliva, diminuindo a tensão interfacial, auxiliando na atuação do catalisador enzimático que, por sua vez, tem maior acesso aos substratos presentes no meio reacional. O sistema reacional em estudo neste trabalho difere da grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura, pela

ausência da adição de solventes orgânicos comumente utilizados para facilitar a formação de sistemas micelares.

Para avaliar a atuação da concentração do surfactante, os experimentos foram realizados mantendo constante as variáveis temperatura em 70°C, agitação em 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva em 6:1 e concentração de enzima imobilizada em 9% (m/m). Para o estudo da influência da concentração de surfactante, as concentrações de Triton X-100 foram variadas em 10, 15 e 20% (m/m), possibilitando a construção das curvas cinéticas apresentadas na Figura 12.

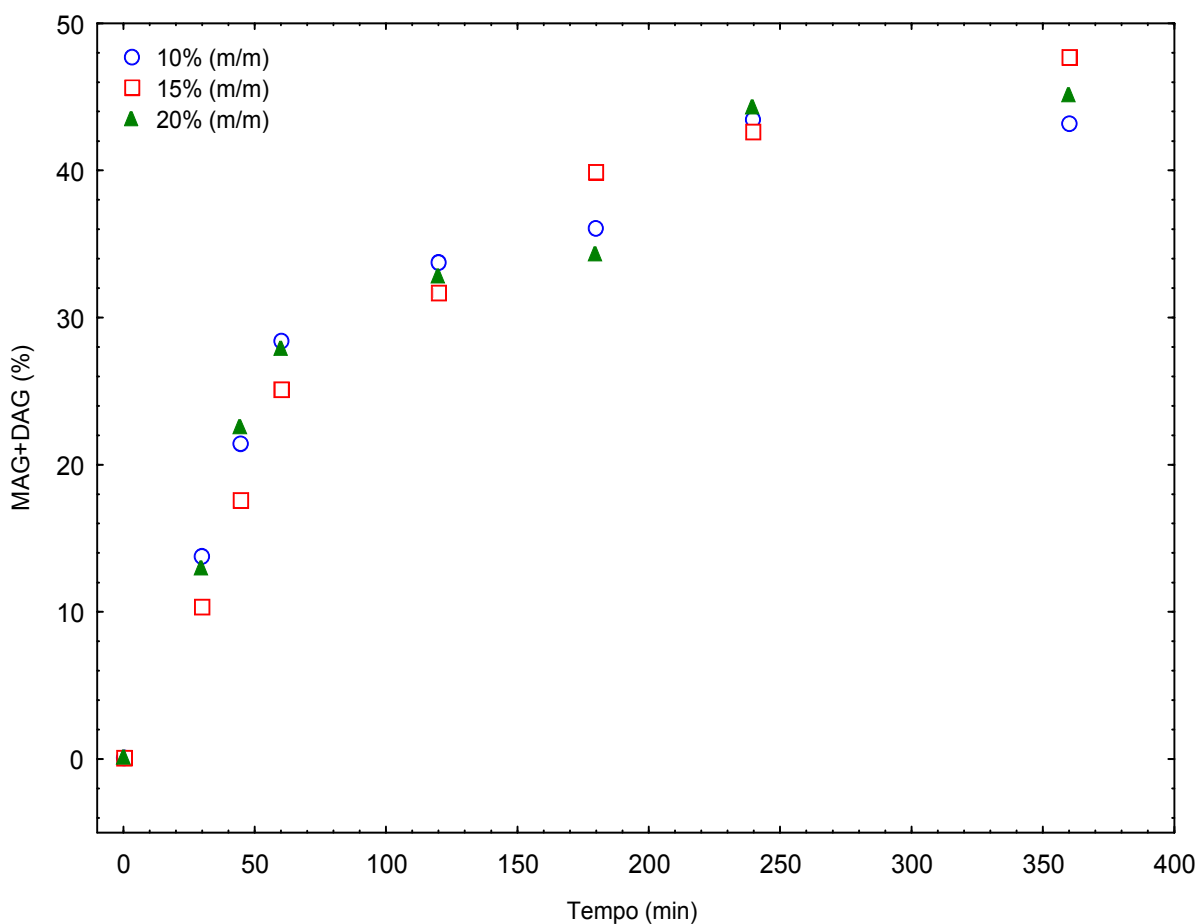


Figura 12 - Efeito da concentração de Triton X-100 na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1 e 9% de enzima imobilizada.

A partir da Figura 12 pode-se observar que todas as concentrações de surfactantes utilizadas neste estudo apresentaram comportamento semelhante em 6 horas de reação, obtendo conteúdos de MAG+DAG de 43,17, 47,71 e 45,09% respectivamente para 10, 15 e 20% (m/m) de Triton X-100. Através dos resultados obtidos para este sistema reacional, pode-se admitir que em valores acima de 10% (m/m) de Triton X-100 o sistema apresenta-se saturado, ou seja, microemulsionado.

STAMATIS et al. (1999) avaliaram diferentes reações enzimáticas em micelas reversas e verificaram que lipases interagem com a interface micelar. Além disso, as enzimas são aptas para entrar em contato com os substratos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos. Assim, as microemulsões A/O, caracterizadas como micela reversa representam um meio micro-heterogêneo único para reações enzimáticas. Estudos mostram que sistemas microemulsionados oferecem uma melhor oportunidade para as proteínas sob certas condições e assim as biomoléculas podem escolher um ambiente ótimo para seu funcionamento. É importante ressaltar que estes sistemas com microemulsões provêm uma enorme área interfacial, através da qual a conversão do substrato hidrofóbico pode ser catalisada (STAMATIS et al., 1999).

Diferentemente dos resultados encontrados para o sistema reacional apresentado neste trabalho, FIAMETTI (2008) observou que o aumento da concentração de surfactante AOT no sistema reacional para produção de MAG, conduziu a maiores conversões, alcançando valores de 61,58% de MAG em 20 minutos de reação quando a concentração de surfactante AOT foi de 20% (m/m). O inconveniente da utilização do surfactante AOT na produção de MAG é o fato de este não ser de grau alimentício.

A utilização do surfactante Triton X-100 presente no meio reacional com o objetivo de aumentar a área interfacial, facilitando assim a transferência de massa do sistema reacional, pode também apresentar alterações na taxa inicial da reação. Desta forma, calculou-se a taxa inicial da reação para a variação da concentração de surfactante. Conforme dados apresentados na Figura 13.

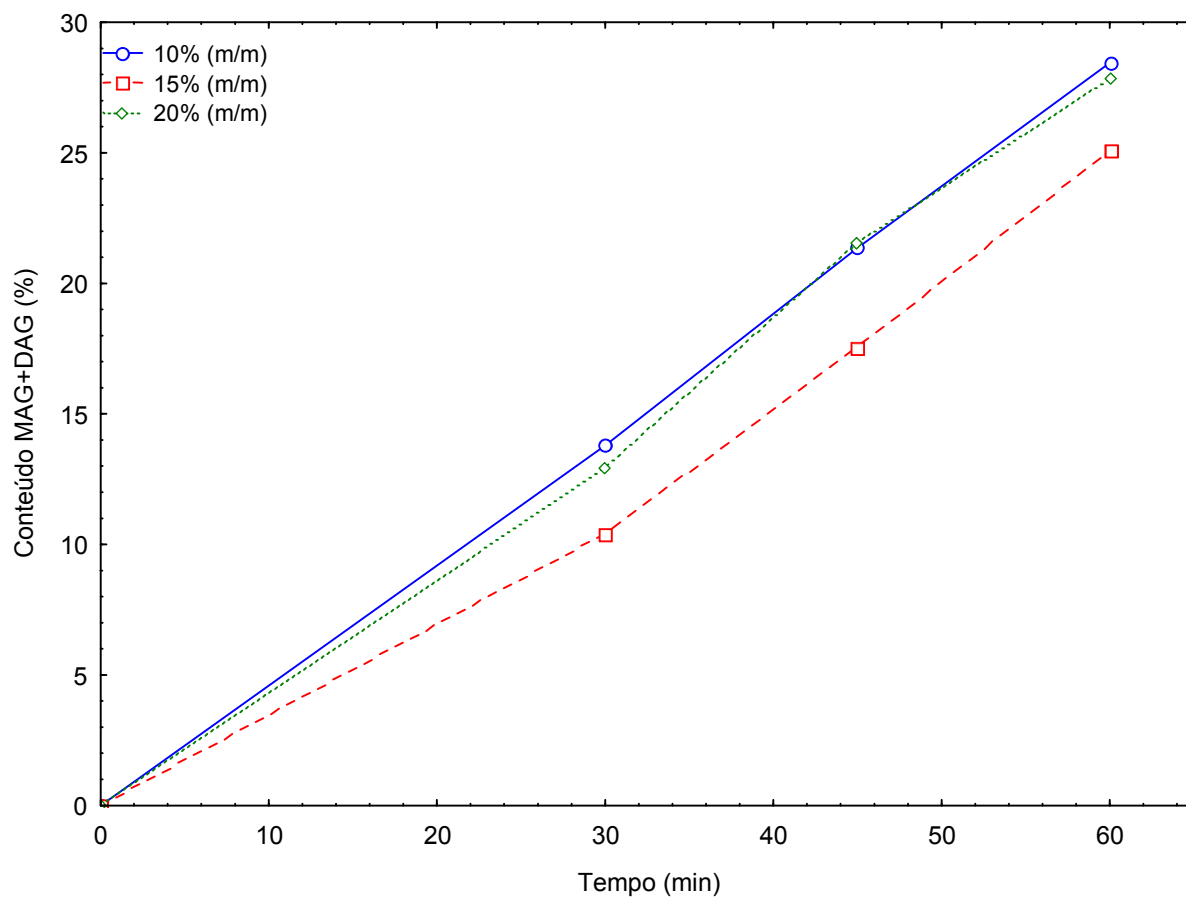


Figura 13 - Efeito da adição de Triton X-100 no conteúdo de MAG+DAG em 45 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de enzima imobilizada 9% (m/m).

Através da visualização do gráfico (Figura 13) é possível observar que o sistema reacional apresentou comportamento semelhante, sendo que a diferença entre as retas para a variação da concentração de surfactante foi pequena. As taxas iniciais de reação para as cinéticas avaliando o efeito do surfactante Triton X-100 no meio reacional estão apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16. Taxa inicial de reação em função da concentração de Triton X-100.

Concentração de Triton X-100 (% m/m)	r (min ⁻¹)
10	0,47
15	0,45
20	0,46

Na avaliação da influência de diferentes concentrações de Triton X-100 na taxa inicial da reação, pôde-se observar que quando a concentração de surfactante variou de 10 para 20% (m/m) a taxa inicial da reação apresentou uma pequena variação de 0,47 para 0,46min⁻¹, respectivamente.

FAIMETTI (2008), ao estudar o sistema reacional para produção de MAG através da glicerólise do óleo de oliva utilizando a lipase Novozym 435 e AOT como surfactante observou que em concentração de 5% (m/m) de AOT a taxa inicial de reação obtida foi de 1,76min⁻¹, por outro lado com a adição de AOT no meio reacional na faixa de 10 a 20% (m/m) não houve alteração significativa na taxa inicial de reação e os valores apresentados foram de 2,24, 2,50 e 2,47min⁻¹, respectivamente para as concentrações de 10, 16 e 20% (m/m) de AOT.

4.5.3 Efeito da temperatura na produção de MAG+ DAG

A temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, altas temperaturas podem reduzir a viscosidade do meio, assim como melhorar a difusão do substrato ou sua solubilidade. Em segundo lugar, as enzimas possuem uma temperatura ótima de atuação, que no caso da Novozym 435, situa-se na faixa de 50 a 70°C.

Sendo assim, com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura sobre o conteúdo de MAG+DAG, manteve-se fixa a razão molar glicerol:óleo de oliva em 6:1, agitação em 600rpm, concentração de enzima de 9% (m/m) e Triton X-100 em 16% (m/m), possibilitando assim a obtenção das curvas de conteúdo de MAG + DAG em função do tempo, conforme apresentado na Figura 14.

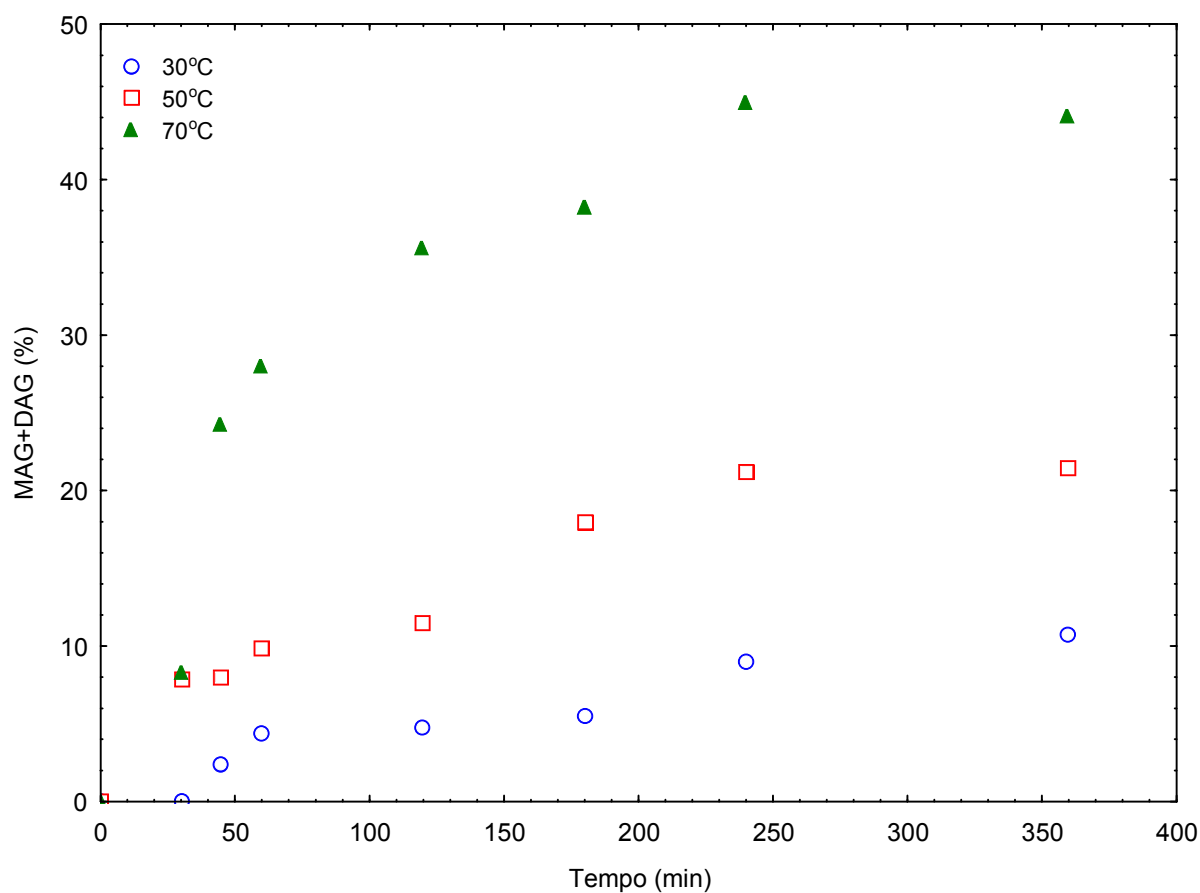


Figura 14 - Efeito da temperatura na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1, 9% (m/m) de enzima imobilizada e 16% (m/m) de Triton X-100.

Com os resultados obtidos neste estudo, verifica-se claramente que a temperatura apresenta-se como uma variável de grande influência em sistemas reacionais que envolvem a presença de catalisadores enzimáticos. Através da Figura apresentada acima é possível verificar que a temperatura que proporcionou a melhor atuação do catalisador, conduzindo a obtenção de maiores conteúdos de MAG+DAG foi a 70°C, atingindo valores de 44,06% em termos de MAG+DAG em 6 horas de reação. Por outro lado, quando a temperatura do sistema foi diminuída para 30°C, verificou-se que menores conteúdos de MAG+DAG foram obtidos, sendo que o máximo conteúdo obtido em 6 horas de reação foi de 10,7%.

Em estudo realizado por PAWONGRAT et al. (2007), utilizando a enzima lipase IM-AK, foi avaliado o efeito da temperatura (30-50°C) na produção de MAG a partir

de óleo de atum. Os autores observaram que quando a temperatura estava no intervalo 30-45°C, a produção de MAG aumentou com a elevação da temperatura. Por outro lado, quando a temperatura foi elevada para 50°C, o rendimento de MAG diminuiu.

YANG et al. (2005a) avaliaram o efeito da temperatura de 40 e 70°C na glicerólise enzimática do óleo de girassol na ausência de solvente e surfactante, utilizando 10% (m/m) de enzima (Novozym 435), razão molar glicerol:óleo de 4,5:1 e 500rpm. Os autores verificaram que para a temperatura de 40°C após 24 horas de reação a conversão de MAG alcançada foi de 16% e para a temperatura de 70°C, com 5 horas de reação a mesma conversão foi obtida, observando, assim, que para este sistema, a elevação da temperatura não foi interessante para o aumento da conversão de MAG.

Com base no exposto anteriormente, é possível concluir que, para este sistema reacional utilizando Novozym 435, 70°C é a temperatura que proporciona melhor atuação do catalisador enzimático levando à obtenção de maiores conteúdos de MAG+DAG. A Figura 15 apresenta o comportamento da formação de produtos em função da temperatura até 60 minutos de reação.

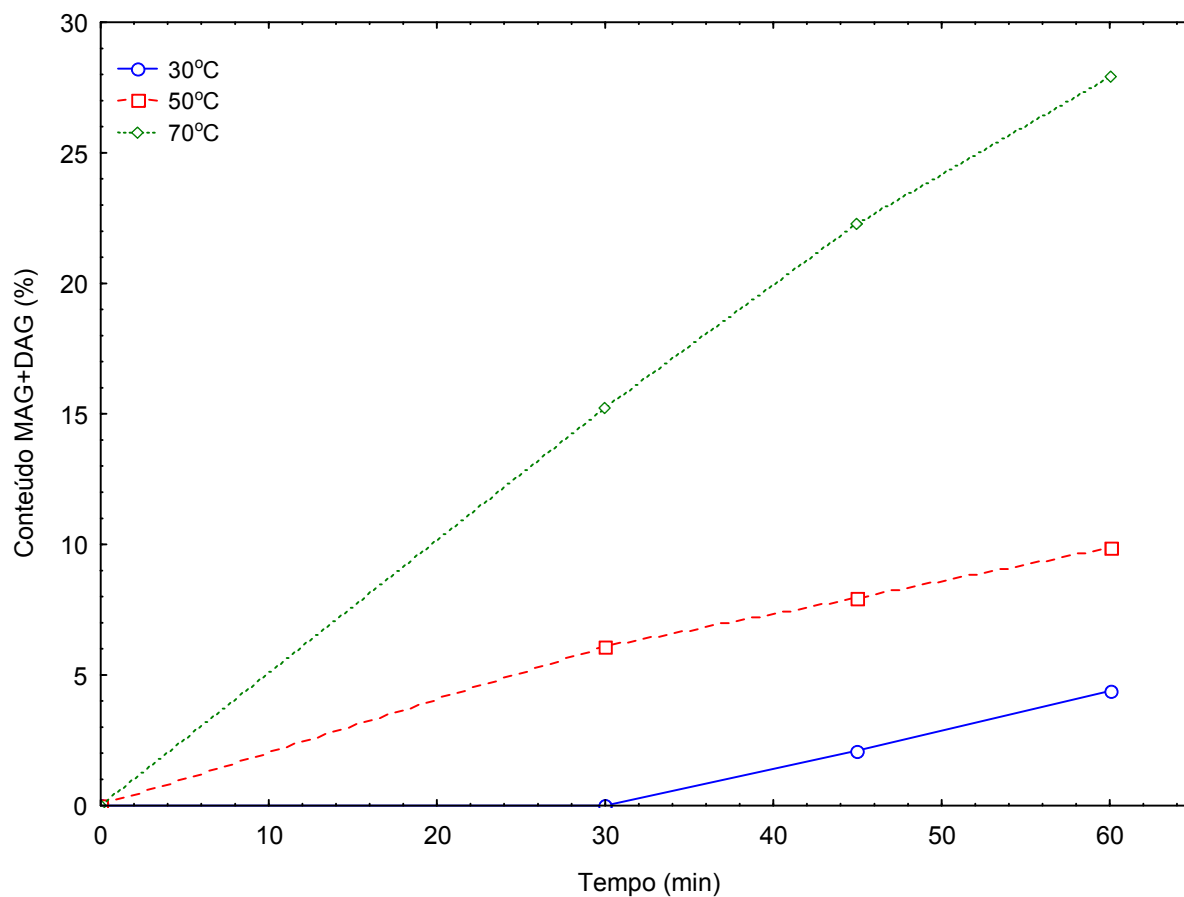


Figura 15 - Efeito da temperatura na produção de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: razão molar glicerol:óleo de 6:1 (mol/mol), 600rpm, concentração de enzima imobilizada de 9% (m/m) e 16% (m/m) de Triton X-100.

Através da Figura 15 pode-se observar claramente que os perfis das retas nos primeiros 60 minutos de reação apresentaram comportamento distinto entre as temperaturas de 30, 50 e 70°C. O cálculo da taxa inicial da reação (Tabela 17) possibilitou verificar que a 70°C o sistema reacional apresentou a maior taxa inicial de reação apresentando valores de $0,46\text{min}^{-1}$. Ao compararmos este valor obtido a 70°C, com os valores obtidos para as demais curvas, verifica-se que a valor obtido em 70°C apresenta-se 6,3 e 2,8 vezes maior, que os obtidos para as temperaturas de 30 e 50°C respectivamente.

Tabela 17. Taxa inicial de reação em função da variável temperatura.

Temperatura (°C)	r (min ⁻¹)
30	0,07
50	0,16
70	0,46

Na busca por trabalhos publicados na literatura para comparação dos resultados, poucos trabalhos são encontrados para sistemas semelhantes. Diferente dos resultados apresentados neste trabalho, os quais sugerem que o aumento da temperatura ocasiona o incremento da taxa inicial da reação, FIAMETTI (2008) ao estudar o sistema reacional de produção de MAG através da glicerólise do óleo de oliva utilizando a lipase Novozym 435 como catalisador e AOT como surfactante, observou que na faixa de temperaturas de 40 a 70°C as taxas iniciais de reação não apresentaram diferença significativa, obtendo taxa de reação máxima de 3,4min⁻¹ em 60°C.

4.5.4 Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva na produção de MAG e DAG

A estequiometria da reação requer uma razão molar glicerol:óleo de 2:1. No entanto, a reação pode ser favorecida pelo deslocamento de seu equilíbrio para a formação de MAG e DAG elevando a razão molar em termos de glicerol para óleo. Com a finalidade de avaliar o efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva na obtenção de MAG+DAG, manteve-se fixas as variáveis temperatura em 70°C, agitação em 600rpm, concentração de enzima de 9% (m/m) e Triton X-100 em 16% (m/m), possibilitando a obtenção das curvas de conteúdo de MAG + DAG em função do tempo nas razões de 3:1, 6:1 e 9:1, conforme apresentado na Figura 16.

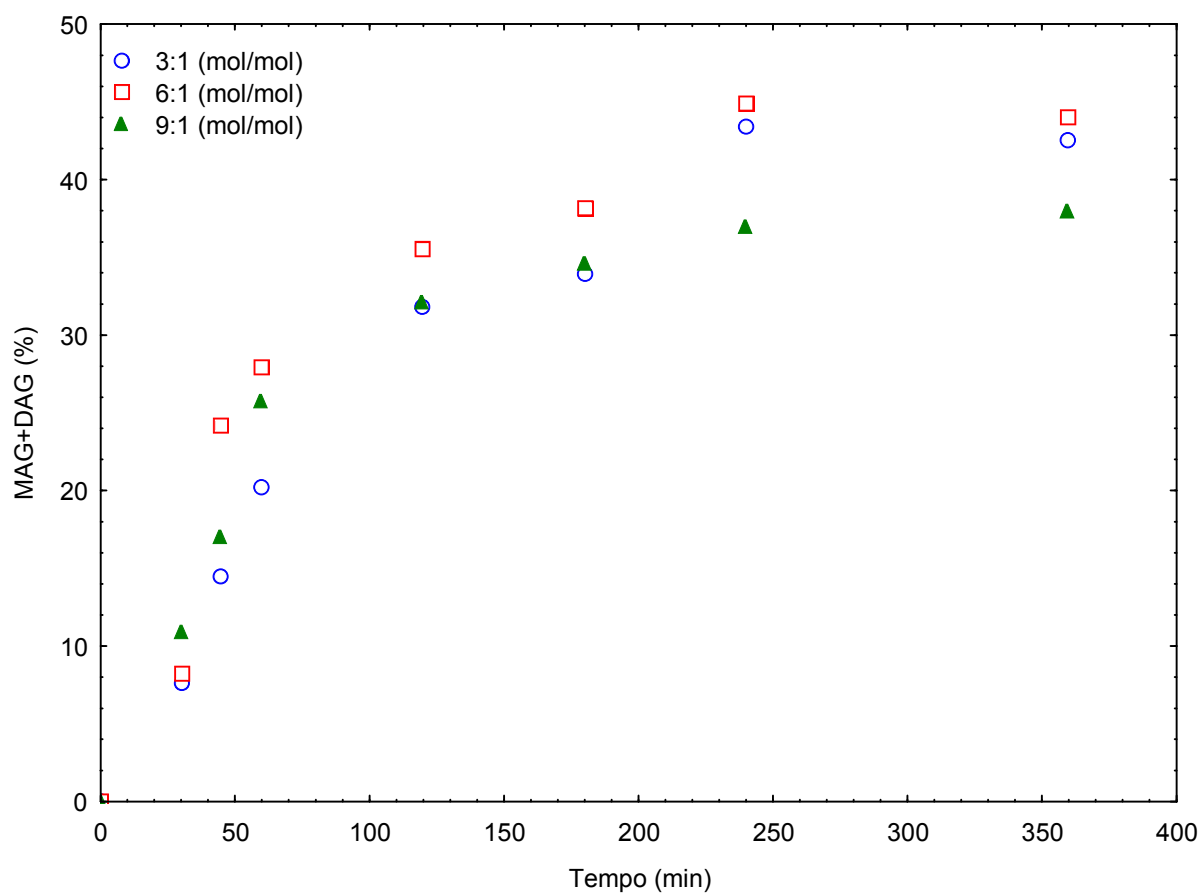


Figura 16 - Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva na obtenção de MAG+DAG. Condição experimental: 70°C, 600rpm, 9% (m/m) de enzima imobilizada e 16% (m/m) de Triton X-100.

A Figura 16 indica que até 180 minutos da reação os sistemas apresentam comportamento semelhante, no entanto, a partir dos 240 minutos de reação a razão molar glicerol óleo de oliva 6:1 seguida pela razão molar 3:1 levaram a um maior conteúdo de MAG+DAG, atingindo valores de 44,9% e 43,4% em 4 horas de reação, respectivamente. Por outro lado, a razão molar glicerol:óleo de oliva de 9:1, apresenta uma ligeira redução na produção de MAG+DAG após os 180 minutos da reação atingindo valores de 36,8% em 4 horas de reação. Esta redução na produção de MAG+DAG para esta condição reacional de 9:1, pode ser explicada pela diminuição da transferência de massa no sistema reacional, dificultando o acesso do catalisador aos substratos da reação.

COTERON et al. (1998) avaliaram o efeito da razão molar glicerol:óleo na glicerólise enzimática usando óleo de oliva nas razões 3:1 e 6:1 em sistema livre de solvente com temperatura de 75°C. Os autores observaram que, a partir em 4 horas de reação, ambas as reações alcançam níveis estáveis de concentração de MAG. YANG et al. (2005b) analisaram o efeito da razão molar de glicerol:óleo em 4,5:1, 7:1, 9:1, 11:1, 13:1 e 46:1 na glicerólise do óleo de girassol na ausência de surfactante e solvente sob condução reacional de 70°C, 8% (m/m) de enzima (Novozym 435), 500rpm e 5 horas de reação. Os autores obtiveram na melhor condição somente 17% de MAG com a razão molar 9:1 de glicerol:óleo, verificando também que a presença de solvente orgânico para promover a miscibilidade no sistema reacional tornaria viável a utilização de altas concentrações de glicerol.

FIAMETTI (2008) estudou o efeito da razão molar glicerol:óleo em 1:1, 2:1 e 3:1 em sistema reacional utilizando AOT (Bis (2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio) como surfactante e Novozym 435 como catalisador na glicerólise enzimática do óleo de oliva, sob condição reacional de 70°C, 600rpm, 5% (m/m) de enzima e 20% (m/m) de AOT e observou que a relação razão molar glicerol:óleo 2:1 até 180 minutos de reação apresentou melhores conversões em termos de MAG. Após este tempo, houve uma inversão e certamente pelo excesso de glicerol no meio, a condição de 3:1 foi a que mostrou a maior conversão alcançando um máximo de 69,81% com razão molar glicerol:óleo de 3:1 em 360 minutos de reação.

Do mesmo modo como realizado anteriormente para o estudo do comportamento da temperatura, o procedimento foi adotado para a determinação da taxa inicial da reação. A Figura 17 apresenta o comportamento do conteúdo de produtos formados (MAG+DAG) nos primeiros 60 minutos de reação em função da razão molar glicerol:óleo de oliva.

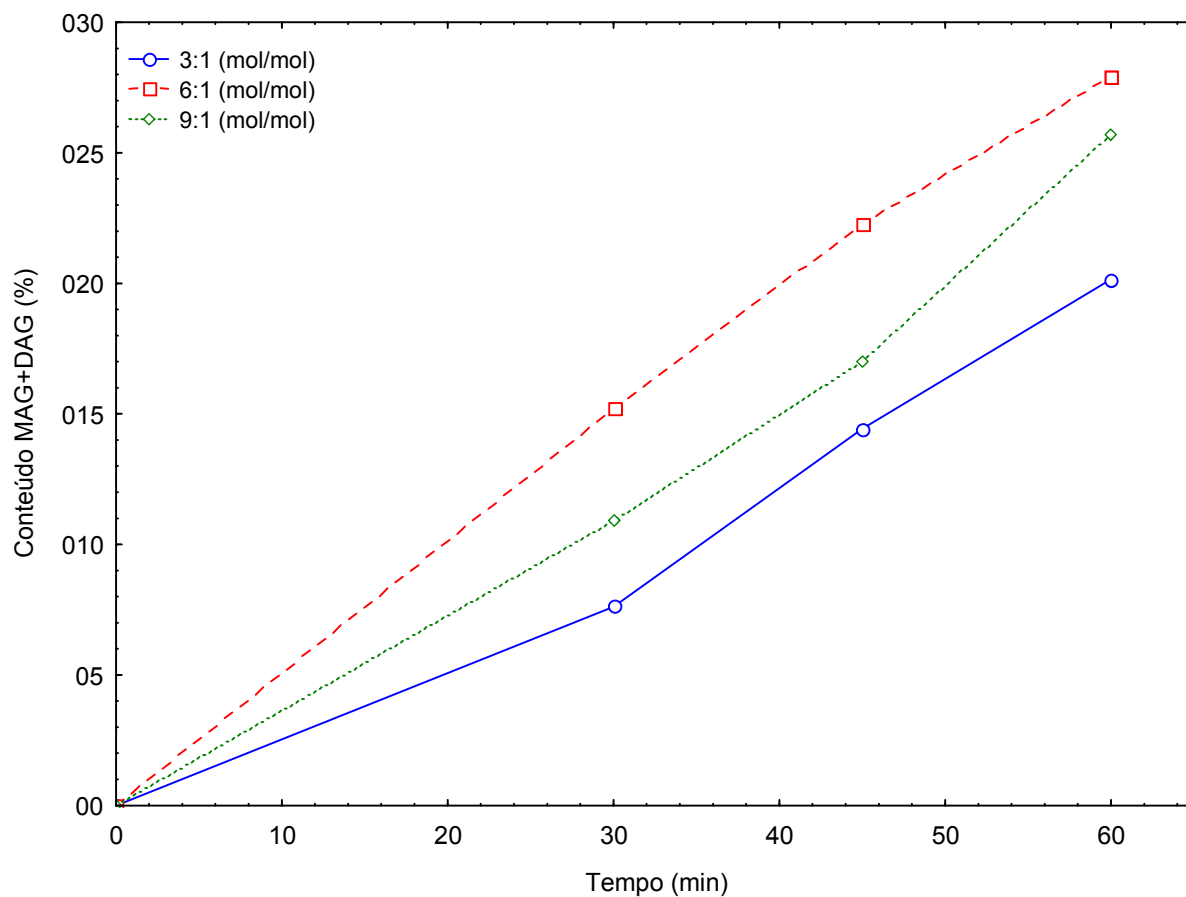


Figura 17 - Efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva no conteúdo de MAG+DAG em 60 minutos de reação. Condição reacional: 70°C, 600rpm, concentração de enzima imobilizada de 9% (m/m) e 16% (m/m) de Triton X-100.

A Tabela 18 apresenta as taxas iniciais de reação em função da razão molar glicerol:óleo de oliva na produção de MAG+DAG. Através dos resultados obtidos, pode ser observado que o aumento da quantidade de glicerol no meio reacional até valores de 6:1 (taxa inicial da reação obtida foi de $0,46\text{min}^{-1}$), favorecendo a formação dos produtos. Por outro lado, quando a razão molar glicerol:óleo de oliva foi elevada de 6:1 para 9:1 a taxa inicial da reação foi reduzida para $0,42\text{min}^{-1}$.

Tabela 18. Taxa inicial de reação em função da razão molar glicerol:óleo de oliva.

Razão molar glicerol:óleo de oliva (mol/mol)	r (min ⁻¹)
3:1	0,33
6:1	0,46
9:1	0,42

Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, CHEIRSILP et al., (2007) estudaram a cinética da produção de MAG através da glicerólise enzimática da palmoleína sob condições reacionais de 45°C, 300rpm, razão molar acetona/isooctano 3:1 (v/v), TAG 7,16mM, glicerol 19,14mM e 0,6 g de Lipase PS. Os resultados obtidos possibilitaram a construção de modelos matemáticos. A simulação dos resultados mostrou que altas concentrações de substratos levaram a altas taxas iniciais de produção, mas baixos rendimentos de MAG. Assim, concentrações altas de palmoleína e glicerol de até 7,16 e 19,14mM, respectivamente, apresentaram taxa de produção inicial de 0,33mMh⁻¹.

4.6 Considerações finais

Os dados apresentados neste capítulo visaram avaliar a influência das variáveis no processo e otimizar a produção enzimática de MAG+DAG a partir da glicerólise do óleo de oliva na presença de surfactante. Através dos resultados apresentados, verificou-se que os melhores resultados em termos de conteúdo de MAG+DAG em 2 horas de reação foram encontrados no ponto central do segundo planejamento experimental tendo como condições experimentais 70°C, 600rpm, concentração de enzima imobilizada, teor de Triton X-100 e razão molar glicerol:óleo de oliva de 9,0% (m/m), 16% (m/m) e 6:1 respectivamente. Dessa forma, a partir do segundo planejamento, foi realizado um estudo cinético avaliando os efeitos das variáveis temperatura, razão molar glicerol:óleo de oliva, concentração de enzima e concentração de surfactante, tendo sido observado teores de MAG+DAG superiores a 40% para o surfactante Triton X-100.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Neste trabalho investigou-se a produção enzimática de MAG e DAG a partir de glicerólise do óleo de oliva utilizando diferentes surfactantes de grau alimentício, assim como a influência das variáveis do processo e o estudo cinético da reação. Este estudo possibilitou avaliar a influência das variáveis razão molar glicerol:óleo de oliva, temperatura, agitação, concentração de enzima imobilizada e de surfactante no conteúdo de produtos desejados.

A metodologia analítica em HPLC utilizada neste trabalho para quantificação de MAG, DAG e TAG produzidos pela reação de glicerólise enzimática se mostrou eficaz na quantificação de mono, di e triglicerídeos. O aparato experimental utilizado na investigação do trabalho apresentou alta confiabilidade assim como excelente controle de agitação e temperatura.

O presente trabalho permitiu avaliar de maneira racional a glicerólise enzimática utilizando diferentes surfactantes na obtenção de MAG e DAG, podendo-se concluir que:

- a. O avaliação do pH do sistema reacional permitiu verificar que este manteve-se constante após 2 horas de reação, verificando que a formação de ácidos graxos livres durante a reação não é suficientemente elevada para provocar alterações do pH do meio reacional;
- b. A avaliação da atividade enzimática ao final da reação permitiu verificar que os diferentes surfactantes de grau alimentício utilizados neste trabalho não exerceram influência negativa na atividade do catalisador;
- c. A utilização de surfactante na reação demonstrou se constituir em uma variável de grande importância para a produção enzimática de MAG e DAG em sistemas livres de solvente promovendo a melhora da homogeneidade do sistema reacional;

- d. Dentre os surfactantes avaliados, os que conduziram aos maiores conteúdos em MAG e DAG foram os surfactantes Tween 65 e Triton X-100, com menores valores de HBL;
- e. A condição otimizada para produção de MAG e DAG, dentro das faixas estudadas no segundo planejamento experimental foi de 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva de 6:1, 16% (m/m) de surfactante e 9,0% (m/m) de enzima imobilizada, correspondente ao ponto central do segundo planejamento. O conteúdo de MAG+DAG máximo obtido nesta condição foi de 37,4% e 41,8% em 2 horas de reação para o Triton X-100 e Tween 65, respectivamente;
- f. A avaliação cinética permitiu verificar que os maiores conteúdos de MAG e DAG na ordem 47%, foram obtidos sob condição reacional de 70°C, razão molar glicerol:óleo de 6:1, 600rpm, 15% (m/m) de surfactante Triton X-100 e 9,0% (m/m) de enzima imobilizada em 6 horas de reação;
- g. Na avaliação do efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva, os maiores conteúdos em MAG e DAG foram alcançados quando a razão molar glicerol:óleo de oliva foi de 6:1, 70°C, 600rpm, 16% (m/m) de Triton X-100 e 9,0% (m/m) de enzima imobilizada. O excesso de glicerol (acima de 9:1) no meio reacional prejudicou a produção de MAG e DAG devido as limitações da transferência de massa;
- h. A adição de 9,0% (m/m) de enzima imobilizada conduziu a obtenção de maiores conteúdos em MAG e DAG (44%) em 6 horas de reação. No entanto quando adicionada em valores superior a 9% (m/m) em relação à mistura reacional glicerol:óleo de oliva, na condição de 70°C, 600rpm, razão molar glicerol:óleo de oliva 6:1, 16% (m/m) de Triton X-100, o conteúdo de MAG+DAG foi prejudicado possivelmente devido a redução da transferência de massa no sistema.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Através dos resultados obtidos neste trabalho, e com base no conhecimento do processo adquirido até o presente momento, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Estudo de um método para a quantificação do glicerol no meio reacional;
- Estudo da concentração micelar crítica (CMC) como base para redução do conteúdo de surfactante utilizado na reação;
- Estudo do equilíbrio de fases do sistema reacional glicerol/óleo de oliva/surfactante em diferentes temperaturas;
- Estudo da utilização de fluidos pressurizados associados a surfactantes;
- Estudo da produção de MAG e DAG utilizando como catalisador uma lipase não comercial;
- Avaliação da glicerólise enzimática na produção de MAG e DAG em sistema livre de solvente utilizando fluido pressurizado em modo contínuo;
- Avaliação do comportamento do glicerol oriundo da produção de biodiesel na reação de glicerólise frente ao catalisador enzimático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLE, W. **Enzymes in industry: production and application**. 3ed. Verlag GmbH & Co. KGaA, 489p, 2007.
- AOAC. **Triglycerides (by Partition Numbers) in Vegetable Oils**. Liquid Chromatographic Method. Oficial Method, 993.24, 1996.
- APARICIO, R & HARWOOD, J. **Manual del aceite de oliva**. Ediciones y Mundi-prensa: Madri, cap.14, 321p, 2003.
- AVRAMIOTIS S.; STAMATIS, H.; KOLISIS, N.; LIANOS, P.; XENAKIS, A.; **Structural studies of lecithin and AOT based water-in-oil microemulsions, in the presence of lipase**. Languimir, v.12, 6320 – 6325, 1996.
- BAILEY, J. E.; OLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamental**. 2 ed. New York: McGrawl-Hill, 1986, 984p.
- BALASHEV, K.; JENSEN, T. R., KRISTIAN, K.; BJØRNHOLM, T. **Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy**. Biochimie, v. 83, 387-397, 2001.
- BALCÃO, V. M. & MALCATA, F. X. **Lipase catalyzed modification of milkfat**. Biotechnology Advances. v.16, n. 2, 309-341, 1998.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. **Bioreactors with immobilized lipases**. Enzyme Microbial Technology. v.18, 392, 1996.
- BORNSCHEUER, U. T. **Lipase-catalysed syntheses of monoacylglycerols**. Enzyme and Microbial Technology, v. 17, 578-586, 1995.

- BORNSCHEUER, U.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; YAMANE, T.; KOLISIS, F.N. **A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides**. Biotechnology Letters. v. 16, n. 7, p. 697-702, 1995.
- BORGSTROM, B. & BROCKMAN, H. L. **General features of lipolysis: Reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches**. ed. Lipases. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 346, 1984
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S.; **Statistic for Experimenters**, John Wiley: New York, 510p, 1978.
- BUGG, T. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 2ed. Blackwell Publishing Ltd, 292p, 2004.
- CARVALHO, C.M.L. & CABRAL, J.M.S., **Reverse micelles as reaction media for lipases**. Biochimie, v. 82, p. 1063–1085, 2000.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. Química Nova. São Paulo, v. 27, n. 1, 2004.
- CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. **Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerols production by immobilized lipase**. Biochemical Engineering Journal, v.35, p. 71-80, 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils**. Codex Stan, v. 33 – 1981. Revisado em fevereiro de 2003.
- COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. **Reactions of Olive Oil and Glicerol over Immobilized Lipases**. Journal of American Oil Chemists Society, v. 75, n. 5, 1998.

- DAMSTRUP, M.L.; ABILDSKOV, J.; KIIL, S.; JENSEN, A.D.; SPARSO, F.V.; XU, X.,
Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis. Journal of Agriculture Food Chemistry, v. 54, p. 7113-7119, 2006.
- DEREWENDA, U., SWENSON, L., WEI, Y., GREEN, R., KOBOS, P.M., JOERGER, R., HAAS, M.J., DEREWENDA, Z. **Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil–water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*.** Journal of Lipids Research. v. 35, p. 524–534. 1994
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties and applications.** Marcel Decker: New York, 796p, 1993.
- DIXON, M. & WEBB, E. C. **Enzymes**; 3 ed.; Longman Group Limited: London, 150p, 1979.
- ERICSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T. SANDTRON, A. G.; BACKVALL, J. E. **X-ray structure of candida antarctica lipase. A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation.** Journal of Molecular Biological. v. 376, 109-119, 2008.
- FARAHAT, S. M.; RABIE, A. M.; FARAS, A. A. **Evaluation of the Proteolytic and Lipolytic Activity of Different *Penicillium roqueforti* Strains.** Food Chemistry. v. 36, 169-180, 1990.
- FELICIANO, W. & PEREIRA, J. J. **Introdução ao biodiesel.** Informativo CRQ-IV, Março/Abril, 2007. Disponível em <http://www.crq4.org.br/info.php>
- FERREIRA-DIAS, S., CORREIA, A. C., BAPTISTA, F. O., da FONSECA, M. M. R.,
Contribution of Response Surface Design to the Development of

- Glycerolysis Systems Catalyzed by Commercial Immobilized Lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v.11, 699-711, 2001.
- FERREIRA-DIAS, S., CORREIA, A. C., da FONSECA, M. M. R. **Response Surface Modeling of Glycerolysis Catalyzed by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Different Polyurethane Foams for the Production of Partial Glycerides.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 21, 71–80, 2003.
- FIAMETTI, K. G. **Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de óleo de oliva na presença de surfactante.** Erechim, Dissertação de mestrado. Engenharia de Alimentos. Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões. 107p, 2008.
- FREGOLENTE, L. V. **Obtenção de monoglicerídeos de alta concentração através do processo de destilação molecular.** Dissertação de Mestrado, UNICAMP, 2006.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F. **Produção de ácidos graxos polinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo parte 2: importantes aspectos da alternativa biotecnológica.** Ciência e Cultura. v.1, p 50-60, nº1, Novembro, 2006.
- GANDHI, N.N. **Applications of lipases.** Journal of the American Oil Chemists Society. v.74, n.6, p. 621-634, 1997.
- GHAMGUI, H.; MILED, N.; REBAI, M, K-C.; GARGOURI, Y. **Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology.** Enzyme and Microbial Technology. v. 39, 717-723, 2006.

- GARCÍA-MESA, J. A.; PEREIRA-CARO, G.; FERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-ORTÍZ, C. C.; MATEOS R. **Influence of lipid matrix in the bitterness perception of virgin olive oil**. Food Quality and Preference, v.19, 421-430, 2008.
- HAMLEY, I. W. **Introduction to Soft Matter - Polymers, Colloids, Amphiphiles and Liquid Crystals**. Chichester, J. Wiley, 342, 2000.
- IUPAC, A Guide to Nomenclature of Organic Compounds - Recommendations, original em inglês preparado por R. Pânico, W. H. Powell e J.-C. Richer. 1993.
- JAEGER, K-E. & REETZ, M. T. **Microbial lipase form versatile tool for biotechnology**. Tibetch, v.16, 396 - 403, 1998.
- KAEWTHONG W. & H-KITTIKUN A., **Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents**. Enzyme and Microbial Technology, v. 35, p. 218–222, 2004.
- KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. **Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase**. Process Biochemistry, v. 40, 1525-1530, 2005.
- KIRK-OTHMER, E. T.. Glycerol. In: American Society of Chemistry. **Encyclopedia of chemical technology**. 5.ed.. New York: John Wiley, 432p, 2007.
- KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. **Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53. 7059-7066. 2005.

- LANG, X., DALAI, A.K., BAKHSHI, N.N., REANEY, M.J., HERTZ, P.B. **Preparation and characterization of biodiesels from various bio oils.** Bioresource Technology. 80, 53–62, 2001.
- LAWRENCE M.J.; REES G.D., **Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems.** Adv Drug Deliv Rev. v. 45, p. 89-121, 2000.
- LÉON, R.; FERNADES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. **Whole-Cell Biocatalysis in Organic Media.** Enzyme Microbiological Technology. v.23, p 483-500, 1998.
- MACRAE, A. R. & HAMMOND, R. C. **Present and future applications of lipases.** Biotechnology and Genetic Reviews, v. 3, Intercept Ltd., 1985.
- MAKI, K., DAVIDSON, M., TSUSHIMA, R., MATSUO, N., TOKIMITSU, I., UMPOROWICZ, D., DICKLIN, M.R., FOSTER, G.S., INGRAM, K., ANDERSON, B.D., FROST, S.D., BELL., M. **Consumption of diacylglycerol oil as part of mildly hypocaloric diet enhances loss of body weight and fat compared with a triacylglycerols control oil.** American Journal of Clinical Nutrition. 76 (6), 1230–1236, 2002.
- MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C. H. **Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 67, 890-910, 1990.
- MCNEIL, G.P & YAMANE, T. **Further Improvements in the Yield of Monoglycerides During Enzymatic Glycerolysis of Fats and Oils.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 68, 6-10, 1991.
- NAGAO, T., WATANABE, H., GOTO, N., ONIZAWA, K., TAGUCHI, H., MATSUO, N. **Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to**

- triacylglycerols in men in a double-blind controlled trial.** Journal of Nutrition, v.130, 792–797, 2000.
- NEGI, D. S.; SOBOTKA, F.; KIMEL, T.; WOZNY, G.; SCHOMACKER, R. **Liquid-liquid phase equilibrium in glycerol-methanol-methyl oleate and glycerol-monolein-methyl oleate ternary systems.** Industrial Engineering Chemical Research. v.45, 3693-3696, 2006.
- NELSON, D. L & COX, M. M. Lehninger: **Principles of Biochemistry.** 3a. edição. New York: Worth Publishers, 2000.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações.** Química Nova, v.25 (5): 1-13, 2002.
- O'KEEFE, S., F., **Nomenclature and Classification of Lipids.** In: Food Lipids. New York: Marcel Dekker, p. 1-36. 1998.
- OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. **Microemulsões I: fundamentos teóricos da formação do sistema microemulsionado.** Infarma, Brasília, v.1, n.8, 2001.
- OLIVEIRA de, A. G.; SCARPA, M. V; CORREA, A. M.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ T. P. **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos.** Química Nova, v. 27 (1), 131-138, 2004.
- OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. **Hidrólise enzimática parcial da gordura de babaçu.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, 270, 1999.
- OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids.** Journal of Supercritical Fluids. v. 38, issue 3, p. 373-82, 2006.

PAWONGRAT, R.; XU, X.; H-KITTIKUN, A., **Synthesis of monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK.** Food Chemistry, v. 104, n. 1, p. 251-258, 2007

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. **How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution.** Journal of Biotechnology. v. 85, 115–147, 2001.

POUILLLOUX, Y.; ABRO, S.; VANHOVE, C.; BARRAULT, J. **Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins Preparation of monoglycerides,** Journal of Catalysis, v. 149, 243–254, 1999.

RENDON, X.; LOPEZ-MUNGUIA, A.; CASTILLO, E. **Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein.** Journal of American Oil Chemical Society. 78, 1061-1066, 2001.

REES G.D., ROBINSON B.H., STEPHENSON G.R., **Macrocylic lactone synthesis by lipases in water-in-oil microemulsions.** Biochemical Biophysical Acta. v. 1257, p. 239–248, 1995.

RODRIGUES, R. C.; GODOY, C. A.; FILICE, M.; BOLIVAR, J. M.; PALAU-ORS, A.; GARCAS-VARGAS, J. M.; ROMERO, O.; WILSON, L.; AYUB, M. A. Z.; GUIAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Reaction of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*.** Process Biochemistry. Article in press, 2009.

ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena.** Wiley-Interscience, New York 3 edição, 587p, 2004.

ROSU, R.; UOZAKI, Y.; IWASAKI, Y.; YAMANE, T. **Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerols Production by Solid-phase Glycerolysis of**

Olive Oil. Journal of the American Oil Chemists Society. v. 74(4), p. 445-450, 1997.

ROUSSEAU, D. & MARANGONI, A. J. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**; Ed. Akoh, C. C.; Min, D. B., eds.; Marcel Dekker: New York, 165p, 1998.

RUÍZ-GUTIÉRREZ, V & PÉREZ-CAMINO, M. C. **Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds (Review).** Journal of Chromatography A. Amsterdam, v. 885, p. 321–341, 2000.

SAITO, S.; HERNANDEZ-ONO, A.; GINSBERG, H. N. **Dietary 1,3-diacylglycerol protects against diet-induced obesity and insulin resistance.** Metabolism Clinical and Experimental. v. 56, p. 1566–1575, 2007.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; KOLISIS, F. N., **Bioorganic Reactions in Microemulsions: the Case of Lipases.** Biotechnology Advances. v.17, p. 293–318, 1999.

SEONG-KOON, L.; CHIN-PING, T.; KAMARIAH, L.; MOHD, S. A. Y.; OI-MING, L. **Diacylglycerol Oil—Properties, Processes and Products: A Review.** Food Bioprocess Technology. v.1 (3), p. 223-233. 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C.; **Production, purification, characterization and application of lipases.** Biotechnology Advancing. v.19, p. 627-662, 2001.

SOMA, J. & PAPADOPOULOS, K. D. **Ostwald Ripening in Sodium Dodecyl Sulfate-Stabilized Decane-in-Water Emulsions.** Journal of Colloid and Interface Science. v.181, p. 225-231, 1996.

- SONNTAG, N. O. V., **Glycerolysis of Fats and Methyl-Esters – Status, Reviewed and Critique**. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 59, 795-802, 1982.
- TAKEI, A.; TOI, T.; HIDEKA, T.; MORIWAKI, J.; TAKASE, H.; KATSURAGI, Y. **Effects of diacylglycerol-containing mayonnaise on lipid metabolism and body fat in human**. Journal of Nutrition Food. 4 (3), 1–13, 2001.
- TÜTER, M. & AKSOY, H.A., **Solvent-free Glycerolysis of Palm and Palm Kernel Oils Catalysed by Commercial 1,3-Specific Lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of Glycerolysis Products**. Biotechnology Letters. v. 22, 31-34, 2000.
- VALLIYAPPAN, T.; BAKHSHI, N.N.; DALAI, A.K.; **Pyrolysis of glycerol for the production of hydrogen or syn gas**. Bioresearch Technology, v. 99, 4476-4483, 2008.
- VULFSON, E. N. **Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application**. Editora Cambridge University Press: Great Britain, 271p, 1994.
- XIU-GONG, G.; SHU-GUI, C.; KE-CHANG, Z. **Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain**. Enzyme and Microbial Technology. v. 27, 74–82. 2000.
- XU, X. **Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review**. European Journal of Lipid Science and Technology. 287-303, 2000.
- ZILLER, S. **Grasas y Aceites Alimentarios; 7º ed.**; Zaragoza: ACRIBIA, 71p, 1996.

- WATANABE, T., SHIMIZU, M., SUGIURA, M., SATO, M., KOHORI, J., YAMADA, N. AND NAKANISHI, K. **Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase Lipozyme RM IM.** Journal of American Oil Chemistry Society, v.80, 1201- 1207, 2003.
- YAMADA Y., KUBOI R., KOMASAWA I. **Increased activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in aerosol AOT reverse micelles in the presence of nonionic surfactants.** Biotechnology Program. v.9 ,468–472, 1993.
- YAMAMOTO, K., ASAKAWA, H., TOKUNAGA, K., WATANABE, H., MATSUO, N., TOKIMITSU, I., NORIKO, Y. **Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerols in type II diabetic patients with hypertriglyceridemia.** Journal of Nutrition. 131, 3204–3207, 2001.
- YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. **Monoacylglycerols synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system.** Journal of food lipids. v. 12, 299-312, 2005a.
- YANG, T., REBSDORF, M., ENGELRUD, U. AND XU, X. **Enzymatic Production of Monoacylglycerols Containing Polyunsaturated Fatty Acids through an Efficient Glycerolysis System.** Journal Agricultural and Food Chemistry. 53, 1475-1481, 2005b.
- YASUKAWA, T., YASUNAGA, K. **Nutritional functions of dietary diacylglycerols.** Journal of Oil Science. 50 (5), 161–166, 2001.

APÊNDICE A – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Neste apêndice será apresentada a metodologia para construção das curvas de calibração para os compostos MAG, DAG e TAG em HPLC (High-performance liquid chromatography system) e a metodologia do cálculo realizado para a obtenção do percentual do conteúdo de MAG, DAG e TAG.

Calibração do método cromatográfico

Para a quantificação dos componentes da reação MAG, DAG e TAG foram construídas curvas de calibração para cada composto, a partir da injeção destes nas concentrações de 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 8000 e 10000ppm. Os padrões foram pesados separadamente em balão volumétrico de 10mL nas quantidades apresentadas na Tabela A.1, e completados com a fase móvel acetona/acetonitrila (1:1, v/v) para obter o ponto de concentração da curva de calibração.

Tabela A.1 – Massa adicionada de MAG, DAG e TAG.

Concentração (ppm)	Massa adicionada (g)
100	0,001
500	0,005
1000	0,01
2000	0,02
3000	0,03
5000	0,05
8000	0,08
10000	0,1

Após injeção das soluções padrões em diferentes concentrações em HPLC, construíram-se as curvas de calibração em função das áreas resultantes nos cromatogramas versus a concentração de cada composto como apresentado na Figura A.1.

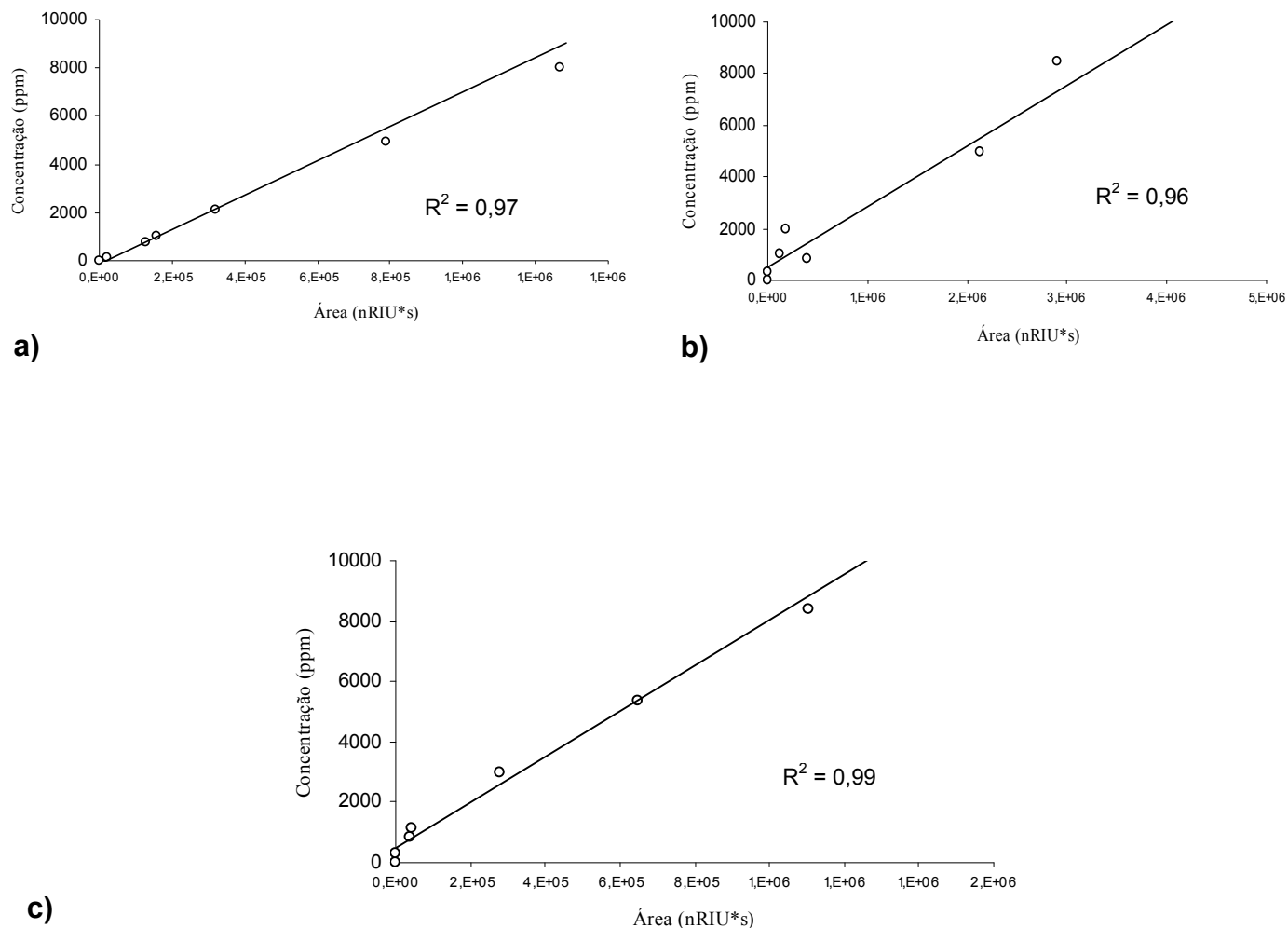


Figura A.1 – Curvas de calibração para os compostos Monoglicerídeos (a), Diglicerídeos (b) e Triglicerídeos (c). Os pontos indicam os resultados experimentais e as linhas contínuas referem-se às curvas de calibração.

Com a construção das curvas de calibração foi possível obter as equações da reta para determinação da concentração de MAG, DAG e TAG. As equações A.1, A.2 e A.3 apresentam a equação da reta dos compostos MAG, DAG e TAG e seus coeficientes de correlação respectivamente.

$$C_{MAG} = 0,0071.\dot{Área} - 119,40 \quad A.1$$

$$R^2 = 0,97$$

$$C_{DAG} = 0,0021.\dot{Área} + 521,34 \quad A.2$$

$$R^2 = 0,96$$

$$C_{TAG} = 0,0076.\dot{Área} + 464,39 \quad A.3$$

$$R^2 = 0,99$$

Com a amostragem dos compostos MAG, DAG e TAG foi possível determinar o tempo de retenção para cada composto como mostra o cromatograma apresentado na Figura A.2. Assim verificou-se que a região de MAG compreende a faixa de 3.50 a 5.0 minutos, região de DAG 5.0 a 15.0 minutos e região de TAG de 15.0 a 56.0 minutos.

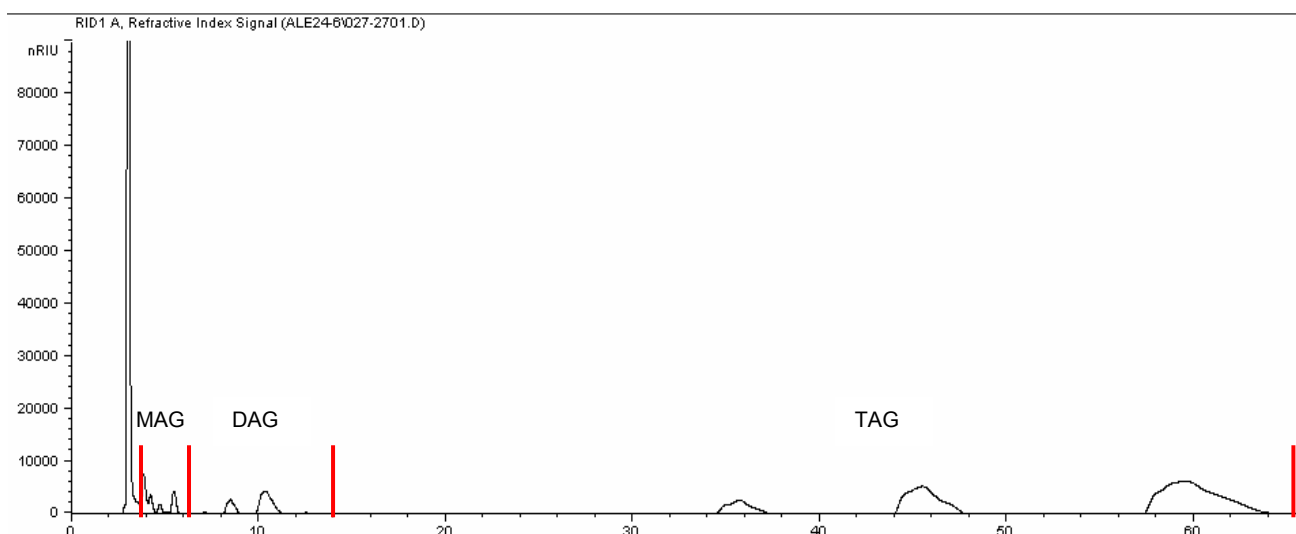


Figura A.2 – Cromatograma da análise dos compostos MAG, DAG e TAG.

Determinação do conteúdo de MAG, DAG, TAG

Ao final do tempo de reação as amostras foram preparadas na concentração de 30000ppm em fase móvel e injetadas em HPLC para determinação da concentração de MAG, DAG, TAG e Glicerol. As áreas na região de cada composto foram somadas e a concentração foi calculada usando-se as Equações A1, A.2, A.3 e A.4.

O conteúdo percentual de MAG, DAG, TAG e Glicerol foram calculados em função da concentração total de cada composto (C_{MAG}) dividido pela massa total de amostra adicionada no preparo da amostra diminuída da concentração do surfactante (Equação A.5).

$$\%MAG = \frac{C_{MAG}(ppm)}{M_{finalsemsurf}(ppm)} \times 100 \quad A.5$$

APÊNDICE B

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO

BIORESOURCE TECHNOLOGY

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)