

Daniela Remonato

**GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS
ASSISTIDA POR ULTRASSOM EM MEIO LIVRE DE
SOLVENTE ORGÂNICO SOB AGITAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de em Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge L. Ninow

Coorientador: Prof. Dr. Débora de Oliveira

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Remonato, Daniela

GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS ASSISTIDA POR
ULTRASSOM EM MEIO LIVRE DE SOLVENTE ORGÂNICO SOB AGITAÇÃO
/ Daniela Remonato ; orientador, Jorge Luiz Ninow ; co-
orientadora, Débora de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2013.
112 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. Modificação de Óleos. 3.
Ultrassom. 4. Monoacilgliceróis. 5. Diacilgliceróis. I.
Ninow, Jorge Luiz. II. de Oliveira, Débora. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Daniela Remonato

**GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS
ASSISTIDA POR ULTRASSOM EM MEIO LIVRE DE
SOLVENTE ORGÂNICO SOB AGITAÇÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 27 de março de 2013.

Prof. João Borges Laurindo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Jorge L. Ninow, Dr.
Orientador

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, Dr.

Prof.^a Maria Manuela Camino Feltes, Dr.^a

Lindomar A. Lerin, Dr.

Dedico este trabalho à outra parte de mim, minha mãe Inide e meu pai Dorvalino, exemplos de honestidade, força e luta.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar, pela saúde, pelas pessoas que colocou em meu caminho, enfim, por tornar tudo possível.

A minha família, meus irmãos Alcindo, Célio e Carla, meus cunhados Rodrigo e Claires, meus sobrinhos Fabrício, Aline e Arthur e especialmente aos meus pais por acreditarem em mim, me dar força e conselhos nos momentos alegres e difíceis.

Ao meu orientador Jorge L. Ninow pela confiança, dedicação, incentivo e pelas risadas.

A minha orientadora Débora de Oliveira, por toda a dedicação e conhecimentos repassados a mim neste trabalho, pelo bom-humor e paciência do dia-a-dia, obrigada por fazer parte de mais esta conquista.

Ao meu amigo Lindomar Lerin, obrigada pela amizade, conselhos e toda dedicação neste trabalho.

Aos Professores Marco Di Luccio, Maria Manuela Camino Feltes, Clarissa Dalla Rosa, José Vladmir de Oliveira e Jane Block obrigada por todo conhecimento, disponibilidade e ajuda, repassados a mim durante minha formação.

A Luciane Batistella e Claudia Trentin pela força, ajuda e conselho nos momentos difíceis em frente ao GC.

A “colonada”, Mara e Leandro, Daiane e Flaviano, Helmut, Josamaique, Raquel, Alessandra e Mirian por se tornarem minha segunda família.

A Karen, Neto e Patrícia, obrigado pela incansável colaboração, pelo incentivo nos momentos difíceis, pelos momentos de descontração em meio às dificuldades, vocês com certeza são “Os melhores”.

Aos meus mais que colegas, super amigos Jean, Stéphanie, Glenise, Pedro, Rossana e Fernanda, juntos superamos dificuldades, partilhamos alegrias e amadurecemos nessa caminhada, obrigada por fazerem parte de minha vida.

A Rafaela e André por dividirem, além do apê, a amizade, as risadas e a compreensão nos momentos de desânimo.

Aos meus colegas e amigos do Engebio, Andréia, Denise, Rosana, Jonathan, Francisca, Kellen, Ana Paula, Kelin, Silvana, Mélodi, Wilian e Américo, obrigado pelo carinho e pelas cuias de mate.

A Andressa, Moara e Sibele pela acolhida em Florianópolis e pela imensa amizade construída.

Ao Daniel, Raquel, Rúbia e Leila, obrigado pela disponibilidade, competência e, principalmente, amizade.

Ao Seu Zé e a Raquel pela alegria e ajuda.

A CAPES e PGEA-UFSC pelo apoio financeiro e de infraestrutura, que permitiu a realização deste trabalho.

Por fim, a todos que fizeram e fazem parte da minha vida.

Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento.

(C. S. Lewis)

RESUMO

Este trabalho apresenta dados experimentais referentes à glicerólise de óleo de soja e óleo de canola utilizando como catalisador a enzima Novozym 435 em sistema livre de solvente e em ultrassom, para a produção de emulsificantes, monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs). Os experimentos com ambos os óleos foram realizados em modo batelada visando o estudo do efeito das variáveis de processo: temperatura (40 a 70 °C), concentração de enzima imobilizada (2,5 a 10%, m/m, em relação aos substratos), relação molar de glicerol: óleo (0,8:1 a 3:1), agitação (0 a 1200 rpm) e potência do ultrassom (0 a 100%) na produção dos compostos de interesse. O ultrassom e a agitação foram estudados com o intuito de melhorar o contato entre os substratos imiscíveis (óleo e glicerol) e a enzima. Os resultados mostraram que a glicerólise catalisada por lipase em meio livre de solvente com auxílio do ultrassom pode ser uma potencial rota para a produção de altos conteúdos de MAGs e DAGs. Os resultados também mostraram que os maiores níveis de produtos, MAGs + DAGs, foram obtidos quando a razão molar utilizada foi de 0,8:1, para ambos os óleos estudados. Altos conteúdos de MAGs e DAGs foram obtidos usando relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1 e concentrações de enzima de 10% (m/m), em 3 horas de reação, 70 °C, 600 rpm e 40% de potência de ultrassom. Os maiores conteúdos da mistura de MAGs + DAGs (~75% m/m) foram obtidos utilizando relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1, 70 °C, 900 rpm, 120 minutos de reação, concentração de enzima de 10% (m/m) e 40% de potência de ultrassom, para o óleo de canola. Já o óleo de soja teve seus melhores resultados de conteúdo de MAGs + DAGs (~65% m/m) quando se utilizou a relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1, 70 °C, 900 rpm, 90 minutos de reação, concentração de enzima de 10% (m/m) e 40% de potência de ultrassom. Este estudo descreve a viabilidade da produção de compostos de alto valor agregado, monoacilgliceróis e/ou diacilgliceróis, utilizando óleos de relativo baixo custo e com ótimas características nutricionais.

Palavras-chave: Lipase. Monoacilgliceróis. Diacilgliceróis. Óleo de canola. Óleo de soja. Ultrassom.

ABSTRACT

This work presents experimental data referred to the glycerolysis of soybean and canola oils, using Novozym 435 as catalyst, in a solvent-free system under the effect of ultrasound bath, for the obtainment of monoacylglycerols (MAGs) and diacylglycerols (DAGs) emulsifiers. The experiments with both oils were carried out in batch mode, focusing the study of the process variables: temperature (40 to 70 degree Celsius), concentration of the immobilized enzyme (2.5 to 10% w/w, related to the substrate amount), glycerol:oil molar ratio (0.8:1 to 3:1), agitation (0 to 1200 rpm) and ultrasound potency (0 to 100%) in the production of the compounds of interest. The ultrasound and the agitation effects were analyzed in order to improve the interaction between the immiscible substrates (oil and glycerol) and the enzyme. The results showed that glycerolysis catalyzed by lipase in a system without solvent with the application of ultrasound can be a potential route for the production of high contents of MAGs and DAGs. The results also revealed that higher levels of the desired products, MAGs + DAGs, were obtained when the molar ratio applied was 0.8:1 to both studied oils. High contents of MAGs and DAGs were obtained using this molar ratio and the enzyme concentration of 10% (m/m), during 3 hours of reaction, 70 degree Celsius, 600 rpm and 40% of ultrasound potency. The highest content of the MAGs + DAGs mixture (~75% m/m) was obtained utilizing the molar ratio glycerol:oil of 0.8:1, 70 °C, 900 rpm, 120 minutes of reaction, enzyme concentration of 10% (w/w) and 40% of the ultrasound potency, for the canola oil. For the soybean oil, the better results of the MAGs + DAGs mixture (~65% w/w) were obtained when it was used the molar ratio glycerol:oil of 0.8:1, 70 °C, 900 rpm, 90 minutes of reaction, enzyme concentration of 10% (w/w) and 40% of the ultrasound potency. This study therefore described the viability of the production of compounds of high value (mono and/or diacylglycerols), using relatively cheap oils with great nutritional characteristics.

Keywords: Lipase. Monoacylglycerols. Diacylglycerols. Canola oil. Soybean oil. Ultrasound.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura genérica de um triacilglicerol..... | 28 |
| Figura 2 – Estrutura de uma molécula de glicerol..... | 35 |
| Figura 3 – Estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> fração B (PDB, 2011) | 39 |
| Figura 4 - Esquema da reação de obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, por glicerólise enzimática..... | 47 |
| Figura 5 - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6)..... | 48 |
| Figura 6 - Formas isoméricas dos monoacilgliceróis | 50 |
| Figura 7- Formas isoméricas dos diacilgliceróis. | 52 |
| Figura 8 – Unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom. | 59 |
| Figura 9: Curva padrão para determinação da concentração de monooleína. | 68 |
| Figura 10: Curva padrão para determinação da concentração de dioleína..... | 68 |
| Figura 11: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando a lipase Novozym 435 em sistema livre de solvente em banho de ultrassom utilizando como substrato o óleo de soja em função das variáveis independentes. | 72 |
| Figura 12: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando a lipase Novozym 435 em sistema livre de solvente em banho de ultrassom utilizando como substrato o óleo de soja em função das variáveis independentes | 73 |
| Figura 13: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como substrato o óleo de soja em função das variáveis independentes temperatura, potência de ultrassom e agitação..... | 75 |
| Figura 14: Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como substrato o óleo de canola em função das variáveis independentes potência e agitação..... | 77 |
| Figura 15: Avaliação cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de soja em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos | |

substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e potência do ultrassom de 100%).81

Figura 16: Avaliação cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de canola em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e potência do ultrassom de 100%).84

Figura 17: Avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de soja em função da potência do ultrassom, em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e agitação mecânica em 600 rpm).85

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Conteúdo de gorduras e ácidos graxos em alguns óleos comestíveis. | 32 |
| Tabela 2 - Programação dos solventes para as injeções em HPLC. | 58 |
| Tabela 3 - Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos..... | 61 |
| Tabela 4 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento para a conversão de mono e diacilgliceróis, através de glicerólise enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom..... | 63 |
| Tabela 5 - Caracterização de óleos refinados comerciais de soja e canola, quanto ao índice de acidez e peróxido. | 65 |
| Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos dos óleos de canola e soja comerciais refinados..... | 66 |
| Tabela 7 - Matriz do planejamento do tipo Plackett & Burman (valores codificados e reais) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m) para óleo de soja e de canola. | 69 |
| Tabela 8 - Matriz do planejamento de experimentos (valores reais e codificados) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m) para óleo de soja. | 74 |
| Tabela 9 - Matriz do planejamento de experimentos (valores reais e codificados) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m) para óleo de canola. | 76 |
| Tabela 10 - Velocidades iniciais de reação e atividades residuais dos estudos cinéticos, após 4 horas de reação dos óleos de soja e canola à 70 °C, razão molar de 0,8:1 (glicerol:óleo), 10% (m/m) de enzima e 100% potência ultrassônica. | 82 |
| Tabela 11 - Atividades residuais dos estudos cinéticos, após 4 horas de reação de óleo de soja à 70 °C, razão molar de 0,8:1 (glicerol:óleo), 600 rpm e 10% (m/m) de enzima. | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| AGL | Ácidos Graxos Livres |
| °C | Graus Celsius |
| μL | Microlitro |
| μmol | Micromol |
| CG | Cromatógrafo gasoso |
| DCC | Delineamento composto central |
| DAG | Diacilgliceróis |
| G:O | Glicerol:óleo |
| g | Grama |
| h | Hora |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| I.A. | Índice de acidez |
| I.P | Índice de peróxido |
| Kg | Quilograma |
| L | Litro |
| m | Metro |
| MAG | Monoacilgliceróis |
| mL | Mililitro |
| min | Minutos |
| mg | Miligrama |
| mm | Milímetro |
| m/m | Massa/massa |
| m/v | Massa/volume |
| ppm | Parte por milhão |
| rpm | Rotação por minuto |
| SONAR | Sound navigation and ranging |
| TAG | Triacilgliceróis |
| THF | Tetraidrofurano |
| U A | Unidade de área |
| v/v/v | Volume/volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 23 |
| 1.1 OBJETIVOS | 25 |
| 1.1.1 Objetivo Geral..... | 25 |
| 1.1.2 Objetivos Específicos..... | 25 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 26 |
| 2.1 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS..... | 26 |
| 2.2 ÓLEOS E GORDURAS..... | 27 |
| 2.2.1 Ácidos Graxos..... | 28 |
| 2.2.2 Óleo de Canola..... | 29 |
| 2.2.3 Óleo de Soja..... | 33 |
| 2.3 GLICEROL..... | 34 |
| 2.4 ENZIMAS..... | 36 |
| 2.4.1 Lipases como Catalisadores..... | 37 |
| 2.4.2 Enzimas Imobilizadas..... | 39 |
| 2.5 ULTRASSOM..... | 40 |
| 2.5.1 Catálise Enzimática em Ultrassom..... | 43 |
| 2.6 PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES..... | 45 |
| 2.6.1 Glicerólise Enzimática..... | 46 |
| Toc278224212 | |
| 2.6.2 Monoacilgliceróis..... | 49 |
| 2.6.3 Diacilgliceróis..... | 51 |
| 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 53 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 55 |
| 3.1 MATERIAIS..... | 55 |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS..... | 56 |
| 3.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM ULTRASSOM..... | 58 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 65 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÕES DOS ÓLEOS VEGETAIS | 65 |
| 4.2 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS PADRÃO DE MAG E DAG..... | 67 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE MAG E DAG..... | 68 |
| 4.4 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM..... | 80 |

| | |
|---|------------|
| 4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 87 |
| 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... | 88 |
| 5.1 CONCLUSÕES..... | 88 |
| 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 90 |
| APÊNDICE – ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS..... | 110 |

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde e com uma melhor qualidade de vida vem ganhando cada vez mais espaço no cenário mundial (AWADALLAK, 2012). Sabe-se que a dieta apresenta um papel importante nas quatro principais classes de doenças da sociedade atual (doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão e obesidade) (GOLDBERG, 1994). Óleos e gorduras têm papel fundamental na dieta, como fonte de calorias, veículos de vitaminas lipossolúveis e no fornecimento de ácidos graxos essenciais. Porém, as tendências de transição nutricional ocorridas neste século direcionam para uma dieta mais ocidentalizada, rica em gordura, a qual, aliada à diminuição progressiva da atividade física, converge para o aumento no número de casos de obesidade (AWADALLAK, 2012; FRANCISCHI et al., 2000) e doenças cardiovasculares (CHEONG et al., 2007).

Juntamente com a busca por produtos mais saudáveis, o uso de enzimas para modificar a estrutura e a composição de óleos e gorduras vem crescendo consideravelmente, caracterizando-se em avanços significativos na área de biotransformação (RENDÓN et al., 2001). Diversas pesquisas têm sido focadas na modificação de óleos e gorduras para a obtenção de produtos que aliem propriedades funcionais e/ou de saúde, bem como propriedades tecnológicas que permitam sua utilização nas linhas de processamento (XU, 2004; FELTES et al., 2009). Entre as técnicas existentes, a glicerólise enzimática, para a produção de monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs), tem sido alvo de muitos estudos, pois estes glicerídeos são excelentes emulsificantes e moléculas condicionadoras utilizadas na indústria. Além disso, os DAGs têm grande aplicação como aditivo funcional em alimentos, trazendo benefícios para a saúde, tal como a redução da gordura abdominal visceral (CHEONG et al., 2007).

A busca por processos alternativos para a síntese de produtos de interesse para a indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética, que não causem ou reduzam os danos ao ambiente, despertou grande interesse dos pesquisadores em todo o mundo, nos últimos anos. Uma alternativa é a síntese enzimática, que apresenta muitas vantagens em relação à síntese química (LERIN, 2010). A biocatálise é a área que apresenta maior crescimento no mercado industrial de moléculas biologicamente ativas. Estima-se que, até o ano de 2025, cerca de 50% dos processos químicos possam ser substituídos por processos biotecnológicos isolados, ou mesmo pela integração entre catálise enzimática e reações químicas (ANTUNES, 2005).

A catálise enzimática, tradicionalmente, limitava-se ao estudo de reações em meio aquoso, o que restringia em muito as possibilidades de aplicações industriais (LERIN, 2010). A partir da observação de que muitas enzimas, tais como as lipases, atuam *in vivo* em ambientes ricos em lipídeos, constatou-se que os ambientes com restrição de água também poderiam ser meios adequados à catálise enzimática (Baron, 2003). Com isso, as pesquisas com lipases foram se ampliando e demonstrando seu grande potencial tecnológico.

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma família de hidrolases que atuam em ligações de ésteres carboxílicos. Entre os processos de maior interesse industrial estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio destes biocatalisadores. As razões do enorme potencial biotecnológico das enzimas pertencentes a esta classe incluem fatos relacionados com: i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; ii) não requererem a presença de co-fatores; iii) sua larga seletividade pelo substrato e, por isso, iv) sua alta enantioseletividade (CASTRO et al., 2004).

Os monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) ou misturas destes, representam cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Os MAGs e DAGs podem ser obtidos enzimática ou quimicamente. Entre os métodos de produção destes compostos a glicerólise de óleos e gorduras catalisada por lipases tem atraído interesse em diversas pesquisas e também na indústria. As condições brandas de pH e temperatura diminuem o consumo energético e minimizam a ocorrência de reações indesejadas de polimerização (CHEW et al., 2008). Além destas vantagens, pesquisadores podem explorar a seletividade das lipases em relação aos ácidos graxos e sua regioseletividade pela primeira posição das moléculas de glicerol (posição α) em relação à segunda (posição β) (KRÜGER, 2010).

Porém, o uso de enzimas em processos industriais possui alguns inconvenientes, um dos principais é seu alto custo. Uma alternativa é o uso de enzimas imobilizadas que possibilitam a minimização dos custos, pois podem ser reutilizadas, podendo assim tornar estes processos economicamente viáveis. Deve-se, no entanto, levar em consideração que a enzima pode ter sua atividade diminuída após sucessivos ciclos de uso devido, principalmente, à dessorção da enzima do suporte ou mesmo inativação por excesso de substratos e de produtos (BATISTELLA, 2011; BAJAJ et al., 2010).

Outro inconveniente no caso específico da glicerólise é a imiscibilidade dos substratos, que prejudica os rendimentos da reação.

Os efeitos físicos do ultrassom, como o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória vêm a contribuir para o aumento da miscibilidade das fases óleo e glicerol, assim é possível reduzir o tempo de reação e maximizar a produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (MARTINEZ et al., 2000).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a potencialidade da produção enzimática de emulsificantes de grau alimentício, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, através da glicerólise de óleos vegetais, canola e soja, e glicerol, em meio livre de solvente em sistema de ultrassom, utilizando uma lipase comercial imobilizada, Novozym® 435, como biocatalisador, em modo batelada.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito das variáveis do processo (temperatura, concentração de enzima, razão molar (glicerol: óleo), agitação e potência do ultrassom) em sistema de ultrassom sobre a obtenção de mono e diacilgliceróis, através da utilização de planejamentos experimentais sequenciais;
- b) Estudo cinético para avaliação do efeito de variáveis significativas na conversão do processo, utilizando a condição experimental maximizada na etapa anterior.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem por finalidade reunir informações específicas sobre reações de glicerólise para obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, por via enzimática, em sistema livre de solvente orgânico utilizando ultrassom, tema central do presente trabalho. Informações fundamentais referentes ao tema também são apresentadas como forma de oferecer subsídio para o entendimento dos resultados obtidos.

2.1 MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

O desenvolvimento de métodos para melhorar as propriedades nutricionais e funcionais de óleos e gorduras é de grande interesse para a indústria de alimentos (AKOH; MIN, 2008). A relação entre as propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras e as suas funções na melhoria da saúde criou maior interesse na modificação destas matérias-primas (GOLDEBERG, 1994). Óleos e gorduras são ésteres de ácidos carboxílicos esterificados em cada uma das hidroxilas da molécula do glicerol, denominados triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAG), substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos. A natureza dos seus constituintes, peso molecular, grau de insaturação, distribuição e posição dos ácidos graxos esterificados ao glicerol na estrutura do triacilgliceróis são os principais fatores que determinam as propriedades físicas dos óleos e gorduras. Os TAGs são os principais componentes de qualquer gordura animal ou vegetal. Dependendo da origem do óleo, o conteúdo em TAGs e ácidos graxos (AG) podem variar significativamente (MORETTO; FETT, 1998; AKOH; MIN, 2008).

A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser alterada, pela modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do TAG (interesterificação) (HAMMOND; GLATZ, 1988). Entre estas tecnologias de modificação, as reações de interesterificação merecem destaque, pois permitem a obtenção de lipídeos específicos, construídos para apresentarem propriedades otimizadas em relação às moléculas originais (OSBORN, 2002; XU, 2004).

Através da interesterificação enzimática é possível maior controle da composição do produto final, e misturas de glicerídeos que não podem ser obtidas utilizando interesterificação química (MACRAE, 1983; GUNSTONE, 1994). Atualmente, a randomização da distribuição

dos grupos acil usando interesterificação química é usada para produzir mudança na estrutura cristalina, conteúdo de gordura sólida, e ponto de fusão de gorduras. Interesterificação utilizando lipases com especificidades particulares tem sido usada para produzir gorduras para fins específicos, tais como substitutos de manteiga de cacau e gorduras de confeitaria (HAUMANN, 1994).

2.2 ÓLEOS E GORDURAS

Óleos e gorduras são reconhecidos como nutrientes essenciais tanto na dieta humana como animal. Além de fornecer a fonte mais concentrada de energia de todos os alimentos, 9 Kcal/g, também fornecem ácidos graxos essenciais, componentes bioativos como antioxidantes, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E, e K (CLAUSS, 1996) e contribuem com várias características sensoriais dos alimentos, além de apresentarem um importante papel tecnológico (BAILEY, 1979; PIGOTT; TUCKER, 1990; ISEO, 2006).

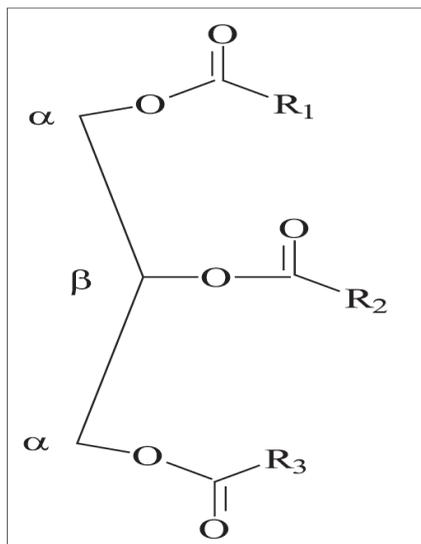
Óleos e gorduras diferem na medida em que as gorduras são sólidas ou pastosas à temperatura ambiente, enquanto que os óleos são líquidos sob condições similares. O Conselho Nacional de Normas e Padrões para Alimentos define 20 °C como o limite inferior para o ponto de fusão de gorduras (RDC N° 270, 22 SETEMBRO DE 2005). Óleos e gorduras são substâncias hidrofóbicas (insolúveis em água), que pertencem à classe química dos lipídeos, podendo ser de origem animal, vegetal, marinha ou microbiana. Não existe uma definição exata para lipídeos. Moschidis (1985) os define como uma variedade de produtos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliáticos.

Os óleos vegetais são obtidos por três principais métodos de extração, prensa hidráulica por batelada, prensa mecânica contínua (*expeller*) e extração por meio de solventes (PIGHINELLI, 2008; AWADALLAK, 2012). O óleo extraído pode conter diversas impurezas como gomas, ceras e ácidos graxos livres, os quais podem prejudicar sua qualidade e estabilidade. No caso de óleos comestíveis efetua-se um processo chamado refino, processo considerado simples, envolvendo a remoção do solvente, a degomagem, o branqueamento, a desacidificação e a desodorização do óleo (BATISTA et al., 1999). Porém, este processo pode causar a perda uma parte do óleo neutro e vitaminas (PEIXOTO et al., 2005).

As propriedades funcionais e características da qualidade das gorduras e dos óleos são diretamente relacionados com o tipo de

triacilglicerol (TAG), que é determinado pela composição de ácidos graxos e a distribuição estereoespecífica de ácidos graxos em suas moléculas. Os TAGs são os maiores constituintes dos óleos e gorduras, mais de 95%. A fração restante é composta principalmente por monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), ácidos graxos livres, proteínas, esteróis, vitaminas e tocoferóis (FARIA et al. 2003; HIDALGO; ZAMORA, 2003). Na Figura 1 é apresentada a estrutura genérica de um TAG. A maioria dos TAGs encontrados em óleos são mistos, ou seja, os resíduos de ácidos graxos (R1, R2, R3) são todos diferentes ou somente dois são iguais, podendo ser saturados ou insaturados.

Figura 1 – Estrutura genérica de um triacilglicerol.



Fonte: Krüger (2010).

2.2.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, com cadeia alifática longa, não ramificada, saturada, monoinsaturada ou poli-insaturada (CURI et al., 2002; BACKES, 2011). Os ácidos graxos saturados, que apresentam apenas ligações simples, são encontrados em alimentos de origem animal, como carne, ovos, queijo, leite, manteiga, gorduras vegetais hidrogenadas e em vegetais

como óleos de coco e palma. Entre os ácidos monoinsaturados, que apresentam uma única ligação dupla na cadeia, o ácido oleico possui destaque, estando presente na maioria das gorduras e carnes animais, incluindo aves e bovinos, bem como azeitonas, sementes e nozes. Os ácidos poli-insaturados, mais de uma dupla ligação na cadeia, representados pelos ácidos linoleico e linolênico, estão presentes em óleos vegetais como o óleo de girassol, milho, soja, algodão, canola, linhaça e peixes de origem marinha (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; CURI et al., 2002).

A posição da dupla ligação na cadeia difere ácidos graxos de igual número de carbonos (BABICZ, 2009). Há ainda a possibilidade de formação de isômeros cis e trans. Na natureza, a grande maioria das duplas ligações nos AG está na conformação cis e dificilmente é encontrado o isômero trans, o qual é amplamente aceito como prejudicial à saúde. Estes compostos podem ser formados devido ao aquecimento, como no caso de frituras. A solubilidade do ácido graxo em água decresce com o aumento da cadeia, em função da sua alta apolaridade, o que se deve ao grupamento carboxílico (AWADALLAK, 2012).

Em relação ao ponto de fusão, ele aumenta com o crescimento da cadeia e decresce com as insaturações. As insaturações em configurações cis, provocam uma “dobra” na cadeia molecular, dessa forma o ácido graxo se organiza em uma configuração curvada, reduzindo sua capacidade de empacotamento e gerando interações de Van der Waals mais fracas, implicando em menor energia para a quebra desse arranjo e conseqüentemente menores pontos de fusão, o que deixa o lípideo mais líquido. Quanto mais duplas ligações forem adicionadas, mais curvada se tornará a molécula, mais fracas as interações de Van der Waals e menor o ponto de fusão (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Por outro lado, em ácidos graxos saturados, a cadeia hidrocarbonada existe, geralmente, sob uma forma estendida, uma vez que a conformação linear é o estado de menor energia, permitindo melhor empacotamento dos mesmos, fazendo com que as moléculas fiquem mais próximas umas das outras, e com isso, aumentando o ponto de fusão, quando comparado com os ácidos insaturados (BIESALKI; GRIMM, 2007; CURI et al., 2002). Os ácidos graxos insaturados na configuração trans são mais lineares que os ácidos graxos na configuração cis, assim apresentam pontos de fusão próximos aos dos ácidos graxos saturados, devido ao empacotamento mais forte das

moléculas (BAYLE'S, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; AWADALLAK, 2012).

Na nomenclatura dos ácidos graxos, verifica-se o uso do sistema ômega (ω) (em alguns casos, designado pela notação taquigráfica de “n”). Esse sistema de numeração alternativo indica a posição das ligações duplas a partir do grupo metil terminal do ácido graxo. O sistema ω é útil em alguns casos, pois pode agrupar os ácidos graxos, com base em sua atividade biológica e sua origem biossintética, já que muitas enzimas os reconhecem a partir da terminação metil da molécula, quando esterificada ao glicerol (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; MORETTO; FETT, 1998; BACKES, 2011). Com isso, ácidos graxos de uma mesma família atuam como precursores de outros ácidos graxos da mesma família, a partir daqueles oferecidos na dieta. Por exemplo, o ácido araquidônico é sintetizado a partir do ácido linoleico (18:2). Contudo, os ácidos graxos de uma determinada classe não podem ser biologicamente convertidos em outra classe; isto é, nenhum membro da família ω -9 (ácido oleico) pode ser convertido em ω -6 (ácido linoleico) (CURI et al., 2002; BACKES, 2011).

O uso do termo “essencial” refere-se ao fato de que estes AG desempenham importantes funções e não podem ser sintetizados pelo organismo por meio de precursores (HASLER, 2002). Isso ocorre porque o organismo dos animais é capaz de sintetizar os seus próprios ácidos graxos, mas não consegue introduzir ligações duplas além do C-9. Dessa forma, os ácidos graxos essenciais mais importantes são o ácido linoleico e α -linolênico, precursores de ácidos graxos da classe ω -6 e ω -3, respectivamente. Assim, podem-se formar ácidos graxos poli-insaturados mais longos a partir desses dois precursores, pela extensão da dessaturação da cadeia, formando ácidos com pelo menos 20-22 carbonos, como por exemplo, o ácido araquidônico (ω -6), o eicosapentaenóico (EPA) (ω -3) e docosaexaenóico (DHA) (ω -3) (BIESALKI; GRIMM, 2007; BACKES, 2011). Os ácidos graxos essenciais são necessários para manter, sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Além disso, esses ácidos graxos também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular (MARTIN et al., 2006).

2.2.2 Óleo de canola

Durante as décadas de 90 e 2000, a produção de canola aumentou, tornando-se uma das principais fontes de óleo vegetal no

mundo (BAILEY'S, 2005). Em função da excelente composição de ácidos graxos, o óleo de canola se tornou uma alternativa viável para as pessoas interessadas em uma dieta saudável. Além de conter em torno de 7% de ácidos graxos saturados, cerca da metade do nível presente no azeite de oliva, óleo de soja e milho, esse óleo também apresenta elevados níveis de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o ácido oleico (18:1, ω -9), e uma das maiores fontes de ácido linolênico (18:3, ω -3) (O'BRIEN, 1998; TOMM, 2007; KAMAL-ELDIN; ANDERSSON, 1997).

Canola é um termo genérico internacional, utilizado para designar sementes geneticamente modificadas de colza. A colza é um dos mais antigos óleos vegetais conhecidos, mas seu uso como alimento era limitado devido ao elevado nível de ácidos graxos erúcido (C 22:1) e glucosinolatos. A presença dos glucosinolatos nos alimentos diminui seu o valor nutritivo, pois os produtos hidrolisados de glucosinolatos, chamados de isotiocianatos e outros compostos contendo enxofre, interferem na absorção de iodo pela glândula tireóide, também contribuem para doenças do fígado e reduzem o crescimento e ganho de peso em animais (BAYLE'S, 2005). Em 1970, o Rapeseed Congress Meeting, em Quebec, informou que o conteúdo alto de ácido erúcido era suspeito de causar lesões no coração e formar uma camada de gordura ao redor do coração de alguns animais experimentais (CARR, 1990).

Na década de 60, o óleo de colza começou a despertar interesse, com isso iniciaram-se programas de melhoramentos de plantas no Canadá. Estes estudos resultaram na identificação de uma linha de colza contendo níveis baixos de ácido erúcido. Isto levou ao cultivo da primeira variedade de Brassica napus com baixos níveis de ácido erúcido, em 1968 (BAYLE'S, 2005). Só em 1974, o Dr. Baldur Stefansson, um fitogenista da Universidade de Manitoba, no Canadá, desenvolveu a primeira variedade de colza "double low", que apresentava menos de 2% de ácido erúcido e menos de 30 mmol/g de glucosinolatos, da qual se pode extrair o óleo ideal para consumo humano (MORETTO; FETT, 1998). O nome canola (Canadian Oil Low Acid) foi oficialmente aceito pela Canadian Grain Commission em 1987, para referir-se ao óleo da torta e semente, proveniente de variedades contendo menos de 2% de ácido erúcido e 3 mg de glucosinolato (TOMM, 2000; ALBUQUERQUE, 2006).

Existem relatos de que as sementes colza eram cultivadas na Índia quase 4000 anos atrás. Mas o plantio em grande escala foi relatado pela primeira vez na Europa, no século XIII. A canola faz parte da família das crucíferas e pertence ao gênero Brassica (BAYLE'S, 2005).

No Brasil, cultiva-se apenas canola de primavera, da espécie *Brassica napus* L. var. oleifera, a qual possui em torno de 24% a 27% de proteína e de 34 a 40% de óleo. Constitui, hoje, uma das melhores alternativas para diversificação de culturas de inverno e geração de renda pela produção de grãos no Sul do Brasil (TOMM, 2007).

A produção de óleo de canola é a terceira maior em termos mundiais, segundo dados do USDA (United States Department of Agriculture). Na safra de 2011/2012, a produção do óleo correspondeu a 15% dos óleos vegetais, atrás apenas do óleo palma com 33,2% e do óleo de soja com 28,6%. Além disso, a canola é considerada a terceira maior commodity mundial. Os principais produtores de grãos de canola no mundo são Estados Unidos, Canadá, China e Índia. No Brasil, as principais regiões produtoras são as regiões Centro-Oeste e Sul (CONAB, 2012).

Tabela 1 - Perfil ácidos graxos em alguns óleos comestíveis.

| | Canola | Soja | Girassol | Milho |
|--------------------|--------|------|----------|-------|
| Ácidos graxos | | | | |
| Palmítico (%) | 5,0 | 14,1 | 6,5 | 13,5 |
| Oleico (g/100g) | 62,2 | 23,4 | 28,0 | 35,3 |
| Linoleico (g/100g) | 21,4 | 53,3 | 61,5 | 47,6 |
| Linolênico (%) | 6,2 | 4,9 | - | 0,7 |

Fonte: Scherr e Ribeiro (2010).

O óleo de canola é caracterizado por um baixo nível de ácidos graxos saturados e níveis elevados de ácido oleico (monoinsaturados) e moderados de α -linolênico (poli-insaturados), como pode ser observado na Tabela 1. O ácido graxo mais expressivo em sua composição é o ácido oleico, que ganha destaque, devido a bons resultados na redução do nível de colesterol plasmático e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), quando comparado com ácidos graxos poli-insaturados. Por outro lado, quanto ao teor de ácidos graxos poli-insaturados, o óleo de canola apresenta níveis intermediários, com menor concentração quando comparado com óleo de soja, milho, girassol e algodão (O'BRIEN, 1998). Em estudo realizado por Scherr e Ribeiro (2010), avaliando

diferentes óleos vegetais produzidos no Brasil, quanto aos tipos de gordura, ácidos graxos e colesterol, os autores constataram que o óleo de canola é o ideal para ser consumido, quando levado em consideração a saúde do consumidor. Assim, além de contribuir com ácidos graxos insaturados, o óleo de canola, através do tocoferol, desempenha um papel importante através de mecanismos antioxidantes de tecidos animais, contribuindo para a prevenção de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (GUINAZ et al., 2009).

2.2.3 Óleo de soja

A soja representa 55% da produção mundial de oleaginosas. Os principais países produtores de soja em ordem decrescente são os Estados Unidos, o Brasil e a Argentina, que juntos representam mais de 80% da produção mundial de semente de soja. Em nível nacional, a produção da safra 2011/2012 foi de 162,6 milhões de toneladas e para 2012/ 2013 estima-se safra recorde, com aumento de 10% na produção do grão (CONAB, 2012).

A soja pertence à família Leguminosae e a forma cultivada é a *Glycine max* (L.) Merrill., o grão de soja contém entre 17 e 22% de óleo em sua composição e 40% de proteína (MARCOS FILHO, 1987). A soja é uma cultura com várias características favoráveis. Primeiro, a soja tem a capacidade de fixar nitrogênio, o que faz com que ela se constitua em uma boa opção de rotação de cultura. Em segundo lugar, a soja é adaptável a uma vasta gama de solos e climas. Em terceiro lugar, a soja tem a notável capacidade de produzir proteína comestível, mais que qualquer outra leguminosa conhecida (LIU, 2004). Considerando-se toda a produção mundial de soja, 16,21% tornam-se óleo. Explica-se esta diferença por que parte da soja é consumida in natura na alimentação humana e animal, apesar do consumo ser preponderantemente industrial (ALAMBERT, 2010).

As evidências históricas e geográficas indicam que a soja teve origem no norte da China, e seu cultivo na região começou há cerca de 5000 anos. Gradualmente, a soja foi transformada em vários alimentos pelos chineses, incluindo tofu, leite de soja, pasta de soja e molho de soja, entre outros. Assim, o cultivo da soja foi introduzido no Japão, Coreia, entre outros países do Extremo Oriente há cerca de 1.100 anos atrás. A soja foi introduzida pela primeira vez na Europa e América do Norte no século 18. No entanto, somente em meados de 1900 que a produção começou a despertar interesse nos Estados Unidos. Milhares

de novas variedades foram trazidas, principalmente da China, durante este período. Até 1954, a China liderou o mundo na produção de soja. Desde então, os Estados Unidos tornou-se o líder mundial (LIU, 2004). No Brasil, a soja foi introduzida na Bahia em 1882 e levada para São Paulo em 1892. No Rio Grande do Sul foi cultivada pela primeira vez em 1900 e em 1936 ocorre o início da expansão desta cultura no estado (COSTA, 1996). Na década de 1980 foi introduzida na região dos Cerrados, tornando-se a cultura anual de maior área plantada no país (ALAMBERT, 2010).

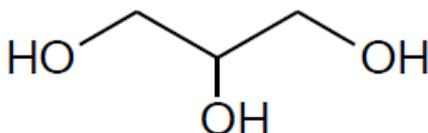
O óleo de soja contém cerca de 23% do monoinsaturados (ácido oleico) e 60% de poli-insaturados (linoleico e linolênico), sendo 4,9% ácido linolênico (ω -3), como mostra a Tabela 1. Estudos têm demonstrado que a taxa de oxidação do ácido oleico é muito mais lenta do que a dos ácidos graxos polinsaturados, linoleico e linolênico (WHITE, 2000; FATEMI, 1980). Estes últimos se oxidam rapidamente, provavelmente pela configuração menos estável da molécula, conferindo ao óleo de soja uma menor estabilidade ao armazenamento, comparado por exemplo ao óleo de canola, rico em monoinsaturados. Os lípidos da dieta desempenham um papel no bem-estar da população, bem como são fundamentais no combate a doenças cardiovasculares, doenças patogênicas, entre outros distúrbios. Esse papel depende do comprimento da cadeia carbonada e do número e da geometria das ligações duplas. Em geral, ácidos graxos saturados elevam os níveis de colesterol total enquanto que mono e poli-insaturados apresentam efeito na redução destes níveis. O risco de doença coronária se eleva com o aumento das concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminui com o aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Devido ao óleo de soja oferecer baixo teor de ácidos graxos saturados, cerca de 10% do total e ser rico em ácidos graxos insaturados, cerca de 85% total deste óleo pode ser considerado um óleo saudável (BAILEY'S, 2005).

2.3 GLICEROL

O glicerol (1,2,3-propanotriol) (Figura 2) pode ser encontrado em todas as gorduras e óleos, sendo um importante intermediário no metabolismo dos seres vivos. O termo glicerol aplica-se geralmente ao composto puro, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95% (m/m) ou mais de glicerol na sua composição. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. O glicerol é

hidrofílico, insolúvel em óleos e muito viscoso, fazendo com que em reações com enzimas imobilizadas acabe sendo facilmente adsorvido em sua superfície, podendo prejudicar a atividade da enzima e a estabilidade da reação (Su e Wei, 2008; KRÜGER, 2011).

Figura 2 – Estrutura de uma molécula de glicerol.



Do ponto de vista físico-químico, o glicerol é um líquido incolor, inodoro, viscoso e de sabor adocicado, solúvel em água e álcool em todas as proporções, pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (LÓPES et al., 1999). É atóxico, o que o torna bastante utilizado como aditivo alimentar, atuando como estabilizante, antioxidante, sequestrante, emulsificante e umectante (ARRUDA et al., 2007).

O glicerol pode ser obtido através do processo de manufatura de sabões ou durante a síntese do propeno. É uma matéria-prima bastante versátil, utilizado tradicionalmente nas indústrias de cosméticos, sabões, fármacos e alimentos (FELTES, 2011). Nos últimos anos, a indústria de biodiesel vem se expandindo e com ela o aumento da quantidade da chamada “glicerina loira”, que é a glicerina oriunda dos processos de produção do biocombustível. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% (m/m) de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (MOTA et al., 2009). Essa crescente oferta de glicerol, produzido como subproduto da produção de biodiesel, nos últimos anos, ocasionou uma diminuição no seu preço de mercado. Tornou-se, desta forma, necessário buscar novas aplicações para a utilização da glicerina (KRÜGER 2010; FELIZARDO, 2003).

2.4 ENZIMAS

Enzimas são, em sua maioria, moléculas de proteína complexas, atuando como biocatalisadores em diversas reações bioquímicas. Com exceção de certo grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, todas as enzimas são proteínas

(LEHNINGNER; NIELSON; COX, 1995) com uma estrutura especial contendo um centro ativo, chamado de apoenzima, e algumas vezes um grupo não proteico, chamado coenzima e/ou um cofator (AWADALLAK, 2012). Tal funcionalidade e importância atribuída às enzimas podem ser comprovadas através dos sistemas vivos, já que neles as transformações químicas que ocorrem são promovidas por centenas de milhares de enzimas que atuam catalisando a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos (RODRIGUES, 2011). A utilização de enzimas pelo homem remonta aos períodos mais antigos da civilização onde importantes atividades humanas em comunidades primitivas como a produção de certos tipos de alimentos e bebidas, e o curtimento de peles para produzir couro para o vestuário, envolviam a aplicação de atividades enzimáticas, mesmo que inconscientemente. Contudo, apenas a partir do século 19, a natureza das enzimas e a maneira como atuam começou a ser esclarecida. Durante o século 20, o reconhecimento das enzimas como proteínas juntamente com o design de técnicas para a sua purificação e análise, abriram caminho para o desenvolvimento de processos voltados à sua produção e utilização industrial (LOTTI; ALBERGHINA, 2007).

Até os anos 60, as vendas totais de enzimas eram de apenas uns poucos milhões de dólares anuais, mas o mercado tem crescido de forma considerável. Devido ao melhor entendimento da bioquímica de produção, dos processos fermentativos, e dos métodos de recuperação, tornou-se possível a produção de um crescente número de enzimas de forma acessível e sua introdução em produtos e processos industriais reais. Ainda, devido às diferentes transformações que as enzimas podem catalisar, o número de enzimas utilizadas comercialmente continua a se multiplicar, adaptadas às diferentes condições de processo, permitindo uma expansão do seu uso industrial (SHARMA, et al., 2001; KIRK, et al., 2002; SMANIOTTO, 2010).

A busca por tecnologias “limpas” e processos mais sofisticados vem estimulando o uso de enzimas em diversos setores industriais (MATOS, 2010). A alta qualidade dos produtos obtidos em função da alta especificidade das enzimas, formando menos subprodutos indesejáveis, e utilizando condições mais amenas de temperatura e pressão. Em relação ao uso dos catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, óxidos e metais, que além de gerar subprodutos indesejáveis, ainda podem apresentar grande dificuldade de separação dos produtos após a reação e necessitam de elevados valores de temperatura e pressão (BON, et al., 1999). Apesar de todas as vantagens quanto ao aumento da velocidade de reação, formação de produtos com maior valor agregado,

uso de condições mais brandas de processos e serem catalisadores biológicos, o custo das enzimas ainda é muito elevado se comparado aos catalisadores químicos convencionais.

Hoje, a catálise enzimática desponta como um dos mais promissores campos dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado, visto que a natureza quirál das enzimas resulta na formação de produtos de maneira altamente estereo e regioselectiva, em condições neutras e aquosas, apresentando ainda possibilidade de desenvolvimento de elevado número de ciclos catalíticos (RODRIGUES, 2011). Além disso, os biocatalisadores permitem a biotransformação de compostos polifuncionalizados e sensíveis em condições amenas, ao contrário das variantes químicas correspondentes que exigem condições reacionais severas (GOLDBECK, 2008; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Cerca de 4000 enzimas são conhecidas, e destas cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (SHARMA et al., 2001).

2.4.1 Lipases como catalisadores

Uma das classes de enzimas que são mais utilizadas em síntese orgânica são as lipases, enzimas que atuam em reações de hidrólise/esterificação (JONES, 1986). As hidrolases, incluindo as lipases, consistem em uma das classes de enzimas mais utilizadas por não necessitarem de coenzimas, o que reduz o custo do processo (SCHNEIDER et al., 1984). As lipases, triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3, são enzimas que catalisam a hidrólise de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Estas enzimas são encontradas em tecidos animais, vegetais e em micro-organismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídeos destes seres vivos: como enzimas digestivas, na deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (VILLENEUVE et al., 2000).

As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas, isto porque, na sua grande maioria, não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como Generally Regarded As Safe (GRAS) (GUTARRA et al., 2005). Do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita sua recuperação do meio de fermentação (VULFSON, 1994). As lipases podem catalisar reações de esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise, aminólise e também possuem

atividade hidrolítica sobre os triacilgliceróis. Novas aplicações biotecnológicas têm sido estabelecidas com sucesso utilizando lipases, como a síntese de biopolímeros, produção de biodiesel, produção de produtos farmacêuticos, agroquímicos, compostos enantiopuros, e modificação do flavor de muitos alimentos (HASAN et al., 2009). Na obtenção de fármacos ou insumos para a indústria farmacêutica em sua forma enantiomérica com elevada pureza ótica, o uso das lipases tem merecido destaque, devido à capacidade dessas enzimas de reconhecer moléculas quirais e atuar seletivamente em um dos isômeros de uma mistura racêmica (HASAN et al., 2006).

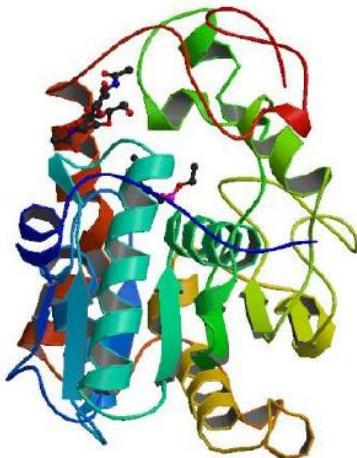
As lipases apresentam características muito particulares, tornando seu campo de aplicação na área biotecnológica muito mais amplo, alta especificidade ou seletividade em relação a um substrato (químico), à posição (regio) e a isômeros (estéreo). A quimioespecificidade está relacionada com as diferentes valores de atividade enzimática apresentada por uma mesma lipase em relação a substratos variados. As lipases podem apresentar especificidade por tri, di e monoacilgliceróis e outros ésteres de ácido graxo formados pela mesma molécula de ácido carboxílico, também podem diferenciar moléculas de ácido graxo de diferentes tamanhos de cadeia, de diferentes níveis e posição de insaturação, entre outros (PINHEIRO, 1992; LERIN, 2010). A regioespecificidade se refere às diferentes modo de ação apresentada pela mesma lipase sobre as distintas posições do ácido graxo no triacilglicerol (VILLENEUVE, 2003). Por outro lado, a estereoespecificidade está relacionada com as diferentes taxas de atividade enzimática apresentadas por uma mesma lipase sobre distintos isômeros de uma molécula (PINHEIRO, 1992).

Quanto às condições ótimas para a atividade e estabilidade das lipases, a maioria apresenta uma faixa ótima de atividade e estabilidade entre pH 6,0 e 8,0 e não requerem cofator (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2005), apresentando temperatura ótima para atividade máxima entre 30 e 60 °C, embora sua termoestabilidade varie consideravelmente em função de sua origem (MACRAE; HAMMOND, 1985). Estas propriedades, entretanto, podem variar significativamente, dependendo da origem, ou mesmo entre isoformas produzidas por um mesmo micro-organismo (BATISTELLA, 2011). Estas variações também dependem do método e do substrato utilizado e das condições do ensaio, como pH e temperatura, tornando a comparação difícil (Freitas, 2006).

A lipase de *C. antarctica* contém duas frações, A e B (BOSLEY et al., 1997). A fração B desta lipase é bastante versátil, apresentando especificidade frente a inúmeros substratos, o que a torna flexível para

aplicações em diferentes setores industriais (FORDE; O'FAGAIN, 2008; FELTES, 2011). Esta lipase é usada na indústria de óleos e gorduras em reações de esterificação e rearranjo de ácidos graxos nos triacilgliceróis (NOVOZYMES, 2010b; FELTES, 2010). Na Figura 3 está apresentada a estrutura tridimensional da lipase de *C. antarctica* B.

Figura 3 – Estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* fração B (PDB, 2011) .



A lipase comercial Novozym® 435 de *C. antarctica* B é produzida por fermentação submersa de um micro-organismo geneticamente modificado (*Aspergillus oryzae*) (NOVOZYMES, 2010a). Após sua produção, a enzima purificada é imobilizada na resina acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600, desenvolvida pela Bayer AG para a Novozymes (NOVOZYMES, 2010b; FELTES, 2011). Sua faixa de temperatura de atuação é entre 40 e 70 °C (DAMSTRUP et al., 2006a).

2.4.2 Enzimas Imobilizadas

A imobilização de enzimas tem um importante papel dentro da biotecnologia aplicada, pois o principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre (MACRAE; HAMMOND, 1985). Através da imobilização da lipase é possível minimizar o problema de alto custo destas enzimas, uma vez

que assim, torna-se fácil a separação dos produtos e podem ser reutilizadas várias vezes ou ainda utilizadas em processos contínuos (H-KITTIKUN et al., 2000; KAEWTHONG et al., 2005). As propriedades das enzimas imobilizadas são determinadas tanto pelas características da enzima como pelas do suporte utilizado. A interação entre os dois irá resultar em um derivado enzimático com propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER; KASCHE, 1999). Como para outros processos físicos ou químicos, tanto a velocidade como o rendimento de imobilização estão determinados por vários parâmetros, incluindo: o tipo de suporte, o método de imobilização, a concentração de enzima e de grupos reativos no suporte, o pH, a temperatura e o tempo de reação (BUCHHOLZ, 1979).

Existem duas categorias básicas de métodos para imobilização de enzimas, através da adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (DALLA-VECCHIA et al., 2004). A imobilização por ligação em suportes pode ser realizada através da ligação da enzima ao suporte por adsorção, onde a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, ligações iônicas, etc; através de seus grupos funcionais, que não são essenciais para a atividade catalítica (D'SOUZA, 1999).

Os suportes utilizados para a imobilização das enzimas constituídos de material hidrofílico permitem a manutenção de um microambiente de alta atividade de água em torno das moléculas de enzima (ILLANES, 1994). A imobilização geralmente aumenta a estabilidade térmica e química da lipase, permitindo melhor controle do processo e da qualidade do produto (MALCATA et al., 1990). A seleção da técnica e suporte empregados depende da aplicação a que o biocatalisador se destina. Apesar de ser objeto de estudo de pesquisas científicas há bastante tempo, a imobilização de lipases ainda demanda investigações adicionais sobre os efeitos exercidos pelas diferentes técnicas de imobilização sobre a estrutura destas enzimas, e sobre o emprego de novos materiais como suportes (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

2.5 ULTRASSOM

A tecnologia ultrassônica consiste na utilização de alta intensidade de energia acústica no processo de materiais e tornou-se

uma via favorável para o processamento de nanomateriais com funções biológicas (GUISEPPI-ELIEA et al., 2009). O ultrassom tem atraído cada vez mais atenção na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, podendo ser classificado de acordo com o nível de frequência em: ultrassom de alta frequência e ultrassom de baixa frequência. A alta frequência do ultrassom (1-10 MHz) causa permanente mudança física e química porque produz cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás. Por isso é geralmente utilizada como uma técnica analítica para garantia da qualidade, inspeção e controle de processos não destrutivos (BABICZ, 2009; MA et al., 2011).

Algumas áreas de aplicação das ondas sonoras de alta potência são: Biologia (homogeneização, rompimento de células), Engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), Geologia (localização do mineral, depósito de óleo), Industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc), Medicina (esterilização, fisioterapia, inalações), Física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som) e Polímeros (polimerização, despolimerização, degradação do peso molecular) (MARTINEZ et al., 2000).

A aplicação do ultrassom de baixa frequência (20-100 kHz) na indústria de alimentos é relativamente recente (MA et al., 2011), já nos campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos é bastante empregada. Nestas áreas as ondas ultrassônicas são empregadas em exames de feto, inspeções de solda, medidas de espessuras. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco (BABICZ, 2009). Em laboratório, tem sido utilizada para melhorar propriedades físicas de alimentos em diversas áreas, como preparação de nanoemulsão (KENTISH et al., 2008), extração assistida por ultrassom (MA et al., 2008) e melhoria das propriedades de formação de espuma (Jambrak et al., 2008).

O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto este estudava o efeito piezoelétrico e 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação. Entretanto, foi somente em 1912 quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation and Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em

1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e, em 1950, os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (MARTINEZ et al., 2000).

Existem dois aparelhos geradores de ondas ultrassonoras, o banho e sonda de ultrassom. A fonte de energia ultrassonora é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais; o transdutor transmite os impulsos ultrasonoros ao meio reacional (BARBOSA; SERRA, 1992; LERIN, 2010).

A ação do ultrassom em líquidos pode causar efeitos da cavitação. As ondas de ultrassom são geradas por periódicos movimentos mecânicos de uma sonda que transfere energia ultrassônica em um meio fluido e provoca alterações muito elevadas de pressão, levando à formação de pequenas bolhas que crescem rapidamente, se expandindo e implodindo violentamente, liberando calor e pressão muito elevados em curtos intervalos (MA et al., 2011; MASON, 1990). Quando bolhas de cavitação entram em colapso perto do limite das fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante pode proporcionar uma agitação muito eficiente ou mistura das camadas (LIU et al., 2008). A cavitação pode ser afetada por alguns fatores como: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (RASO et al., 1999).

Atualmente, a sonoquímica é uma oportunidade de desenvolver novas metodologias de sínteses limpas e rápidas. Devido a estes relatos e ao ultrassom apresentar alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável, muitos autores consideram o ultrassom uma tecnologia "verde" (LERIN, 2010; MASON, 2007).

Recentemente, surgiu grande interesse na área da tecnologia de alimentos pela utilização de ultrassom para alterar a atividade enzimática, em reações catalíticas. Apesar dos efeitos do ultrassom sobre a atividade da enzima incluírem sua ativação e inativação, o ultrassom vem se mostrando uma ferramenta eficiente a ser utilizada, pois ele pode perturbar ligações fracas e induzir a mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (GEBICKA, 1997; BASHARI, 2012).

2.5.1 Catálise enzimática em ultrassom

O processo enzimático utilizando a irradiação com ultrassom é um método alternativo para reduzir as limitações de transferência de massa em reações enzimáticas (VULFSON et al., 1991; YACHMENEV et al., 2004). Isto porque as lipases têm sido empregadas com sucesso como biocatalisadores em meios com solventes (KLIBANOV, 2001; PERSSON et al., 2002; WU et al., 2001). Porém, a utilização de solventes ou co-solventes traz algumas desvantagens, como: elevado valor do solvente, toxicidade, são inflamáveis e implica altos custos de investimento para atender a requisitos de segurança (LIU et al., 2008). Um sistema isento de solvente, que é uma simples mistura de reagentes, pode oferecer mais segurança, o aumento das concentrações de reagentes, reduzir os riscos ambientais e permite a recuperação de produtos, sem complexos passos de purificação (DOSSAT et al., 2002; CHATTERJEE, 1998; GHAMGUI et al., 2004).

A utilização de um sistema livre de solventes induz em uma maior viscosidade e imiscibilidade de substratos, se comparados com um sistema com solvente (DOSSAT et al., 2002), e portanto em algumas reações enzimáticas sem solvente a velocidade da reação pode ser controlada pela limitações de transferência de massa (ROMERO et al., 2007). A ação do ultrassom nos líquidos pode provocar efeitos de cavitação, ou seja, colapso de bolhas perto da fronteira de duas fases imiscíveis, diminuindo as limitações à transferência de massa dos reagentes. Devido aos efeitos da cavitação, o ultrassom pode melhorar reações heterogêneas (catalisador sólido com substrato líquido) e também formas transitórias de espécies reativas, podendo tornar-se uma útil ferramenta em reações enzimáticas (YACHMENEV et al., 2004, YOSHIMOTO et al., 2005).

Os poucos estudos disponíveis na literatura sobre os efeitos de ultrassom em reações enzimáticas podem ser categorizados em dois grupos principais: a primeira abordagem faz uso de ultrassom como pré-tratamento enzimático para reduzir o tamanho de partícula (TIAN et al., 2004). Em tais casos, redução da dimensão das partículas e consequente aumento da área de superfície catalítica são úteis para reduzir as limitações de transferência de massa. A segunda abordagem envolve a utilização do ultrassom ao longo da reação. Neste caso, a energia de cavitação é utilizada para acelerar a velocidade de reação, mas o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está bem estabelecido na literatura (BASHARI et al., 2012).

Em estudo realizado por Yachmenev et al. (2008) utilizando a ação combinada de bioprocessamento com enzima e a utilização de ultrassom, concluiu-se que: (a) os efeitos da cavitação agem melhorando o transporte de macromoléculas de enzima até a superfície do substrato, (b) impactos mecânicos, produzidos pelo colapso de bolhas de cavitação, proporcionar um benefício importante da "abertura" da superfície de substratos sólidos para a ação de enzimas, (c) o efeito de cavitação é muito maior em sistemas heterogêneos do que nos homogêneos, e (d) em água, os efeitos máximos da cavitação ocorrem em cerca de 50 °C, que é a temperatura ótima para muitas enzimas.

Alguns trabalhos da literatura sobre o efeito do ultrassom na aceleração de reações enzimáticas incluem o de Jian et al. (2008) que relatou que o ultrassom pode acelerar a hidrólise enzimática de resíduo sólido de couro e o de Lee et al. (2008), que também observou o aumento da atividade enzimática quando trabalhou com lipase para a síntese de ésteres utilizando exposições curtas ao ultrassom. No que diz respeito aos efeitos da irradiação de ultrassom sobre a estrutura de enzimas, alguns trabalhos encontrados na literatura, como Bashari et al. (2012), quando investigaram os efeitos da irradiação de ultrassom sobre a atividade de hidrólise por dextranase, observaram que a atividade máxima da enzima foi verificada quando as amostras foram tratadas com ultrassom de baixa intensidade. A irradiação com ultrassom aumentou o número de triptofano na superfície da dextranase e também provocou o aumento da α -hélice em 15,74% e reduziu "randon coil" em 5,41%, quando comparada à proteína dextranase tratada com ultrassom com a controle, sem tratamento. O aumento de triptofano na superfície da enzima indica que o tratamento com ultrassom pode induzir ao desdobramento molecular e desnaturação das proteínas, destruindo interações hidrofóbicas das moléculas de proteína, causando o movimento de grupos hidrofóbicos, tais como grupos de triptofano, do interior da molécula para o exterior dela (JAMBRAK et al., 2008; GULSEREN et al., 2007). Já as modificações nas estruturas, como aumento da fração de α -hélice pode ser explicado pela liberação da pressão de superfície da enzima (DAI et al., 1999), induzindo transformações estruturais, que podem afetar o sítio ativo da enzima. Estas mudanças proporcionam à enzima maior regularidade e flexibilidade, o que faz com que os substratos tenham mais acesso ao sítio ativo da enzima. Essas leves mudanças conformacionais na enzima são úteis para a melhoria da sua atividade (BASHARI et al., 2012). No entanto, essas são apenas hipóteses, pois os estudos nesta área ainda são muito recentes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2012), que estudaram o impacto sobre a celulase livre e imobilizada. O estudo com lipase imobilizada revelou que o tratamento ultrassônico com baixa intensidade de irradiação aumentou a área superficial da celulase, fazendo com que o substrato ficasse mais acessível à enzima durante a hidrólise, aumentando a atividade da celulase. Nos estudos realizados por Ma et al. (2011), os resultados mostraram que o ultrassom teve efeito na atividade de alcalase, devido às modificações nas estruturas semelhantes aos estudos de Wang et al. (2012) e Bashari et al. (2012), e também notaram que os parâmetros termodinâmicos E_a , ΔH , ΔS e ΔG foram reduzidos, provando que o uso de ultrassom é eficaz no aumento da atividade enzimática.

Os melhores resultados obtidos pelos estudos encontrados na literatura revelaram que a baixa frequência e intensidade do ultrassom podem causar em líquidos o efeito de cavitação estável (MA et al., 2011; WANG et al., 2012; BASHARI et al., 2012; GUISEPPI-ELIE, 2009). Já com alta irradiação houve a diminuição da atividade enzimática, o que sugere a inativação das enzimas estudadas. Isso pode ocorrer devido ao excesso de formação de pontos quentes localizados, com o colapso de bolhas, tensões mecânicas ou forças de cisalhamento criadas por micro-correntes e ondas de choque e geração de radicais livres através da sonólise de água. Destes, tem sido relatado que o papel dos radicais livres na desnaturação e inativação de enzimas é o mais importante mecanismo (JAMBRAK et al., 2008; KADKHODAEI; POVEY, 2008; MA et al., 2008; WANG et al., 2012).

2.6 PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES

Os monoacilgliceróis, diacilgliceróis ou misturas destes, representam cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, isso porque eles apresentam um balanço hidrofílico-hidrofóbico em suas estruturas, sendo o glicerol hidrofílico e o ácido graxo hidrofóbico (FERREIRA-DIAS et al., 2001; DAMSTRUP et al., 2005; CHEIRSILP et al., 2007). Além de emulsificantes, os MAGs e DAGs podem ser utilizados na indústria de alimentos como estabilizantes, umectantes e moléculas condicionadoras, em produtos de padaria, margarinas, produtos derivados de leite e confeitaria, entre outros, além de serem usados também como agentes encapsulantes, lubrificantes, em pastas dentais e em produtos para pele e cabelos (BOYLE, 1997; JACKSON;

KING, 1997; NOUREDDINI et al., 2004; MOQUIN et al., 2005; DAMSTRUP et al., 2005).

Os MAGs e DAGs podem ser obtidos enzimática ou quimicamente. Enzimaticamente, podem ser produzidos por esterificação, glicerólise, interesterificação, hidrólise parcial, ou combinação de hidrólise parcial e esterificação (CHEONG et al., 2007; GUO; SUN, 2007; ROSU et al., 1999; WEBER; MUKHERJEE, 2004; YAMADA et al., 1999; YANG et al., 2004). A rota convencional é química, onde os emulsificantes são produzidos através de um processo de glicerólise conduzido a temperaturas elevadas de 220-260 °C, na presença de um álcali, como hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador (ZHONG et al., 2010). A alta temperatura requerida para glicerólise química não é atraente porque produz pigmentos escuros, que ocasionam sabor e coloração indesejáveis. Além disso, o processo de catálise química é de energia intensiva, proporciona rendimentos baixos (30-40%), e existe a necessidade de purificação do produto por destilação molecular (NOUREDDINI et al., 2004; SONNTAG, 1982; KROG, 1997).

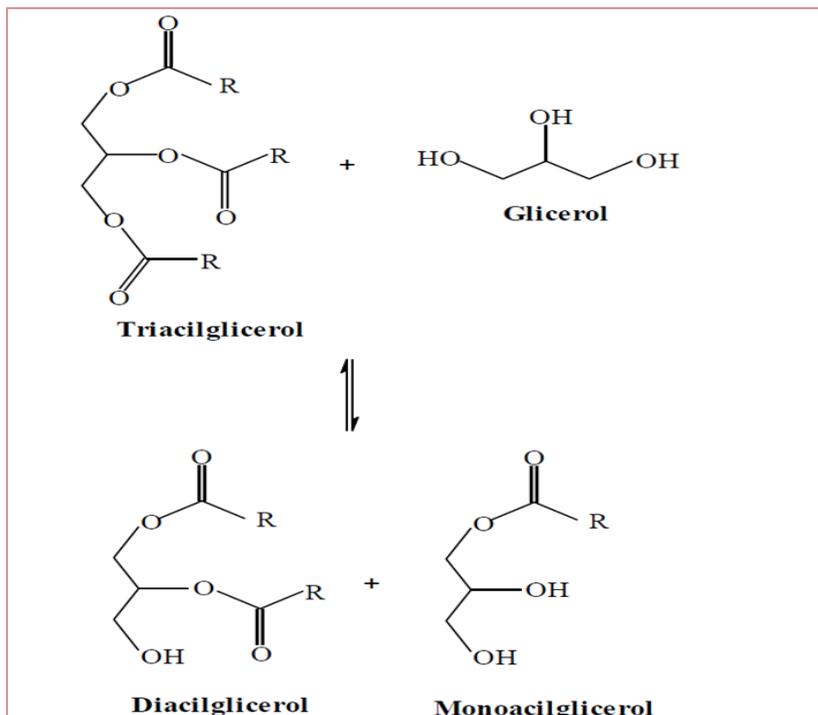
Entre os métodos de produção de MAGs e DAGs, a glicerólise de óleos e gorduras catalisada por lipases tem atraído interesse em diversas pesquisas e também na indústria, e acredita-se ser um método alternativo prático para os métodos químicos na produção de MAGs e DAGs comerciais (KRÜGER, 2010). Ela conta com a vantagem sobre a esterificação de não gerar água, que deve ser removida do meio para gerar maiores rendimentos (AWADALLAK, 2012). Do ponto de vista de processo, por ser catalisada por enzimas, utiliza condições amenas de temperatura e de pH (próximo ao neutro) (FERREIRA-DIAS, 2003). Tais condições diminuem o consumo energético e minimizam a ocorrência de reações indesejadas de polimerização (CHEW et al., 2008). Além destas vantagens, pesquisadores podem explorar a seletividade das lipases em relação aos ácidos graxos e sua regioseletividade pela primeira posição das moléculas de glicerol (posição α) em relação à segunda (posição β) (KRÜGER, 2010).

2.6.1 Glicerólise Enzimática

A interesterificação, quer química ou enzimática, considera a troca de grupos acil entre ácido e um éster (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise) ou um éster e outro éster (transesterificação). Entre as reações de alcoólise, destaca-se a glicerólise. A glicerólise é a reação que produz MAGs e DAGs a partir de moléculas de glicerol ligadas a

moléculas de TAGs. A glicerólise pode ser considerada mais vantajosa, comparada a outros mecanismos de obtenção de mono-e diacilgliceróis, porque, teoricamente, a estequiometria indica a conversão total dos três ácidos graxos dos triacilgliceróis catalisada por lipases, específicas ou não (FREITAS et al., 2008), isso pode ser observado na Figura 4.

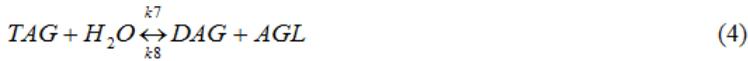
Figura 4-Esquema da reação de obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, por glicerólise enzimática.



Fonte: Santos (2011).

Para que ocorra a formação desses produtos na reação, são necessárias seis etapas, que estão representadas na Figura 5. As etapas representadas pelas Equações (1) a (3) indicam as reações envolvidas na glicerólise e as etapas representadas pelas Equações (4) a (6) indicam as reações de hidrólise que podem ocorrer paralelamente caso haja água suficiente no meio (KRÜGER, 2010).

Figura 5 - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6).



Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.

Fonte: Krüger 2010

Através da Equação 2.3 pode-se verificar que um mol de TAG reage com um mol de glicerol produzindo um mol de MAG e um mol de DAG. Então, um mol de DAG reage novamente com um mol de glicerol para a formação de outros dois moles de MAGs (FREGOLENTE, 2006). Caso haja o interesse na produção de apenas um dos emulsificantes, o equilíbrio da reação pode ser alterado em diferentes condições, para priorizar a produção de MAG ou DAG. Por exemplo, se o interesse for a produção de DAGs, usa-se TAGs em excesso no meio reacional e assim, um mol de TAG reage com um mol de MAG e forma dois moles de DAGs. No caso do interesse maior em MAGs, pode-se trabalhar com excesso de glicerol, pois, teoricamente, a glicerólise de um mol de TAG e dois moles de glicerol pode produzir três moles de MAGs (CHEIRSILP et al., 2007).

A presença de água é um fator crucial para a reação enzimática, pois algumas propriedades da enzima, como atividade, estabilidade e especificidade são afetadas por esta variável. Sabe-se que certa quantidade de água é necessária para preservar ativa a conformação da enzima, por outro lado, o excesso de água no meio reacional promove a hidrólise dos substratos e a diminuição do rendimento dos produtos da glicerólise (ZHENG et al., 2009; KUMARI et al., 2009). De acordo com as equações 4 e 5, pode-se observar que a presença de água no sistema, se controlada, pode aumentar a conversão de TAGs em DAGs. Se não

houver controle na quantidade de água presente, estes substratos podem ser convertidos em ácidos graxos livres, demonstrado pela Equação 6. Cabe salientar que as etapas de hidrólise podem ocorrer paralelamente à de glicerólise e que a partir de baixas concentrações de água no meio, ácidos graxos livres já começam a ser formados. Outro problema relatado por alguns autores é que a incorporação de água acima do limite crítico aumenta a espessura da camada de água formada ao redor da enzima. Isto prejudica o contato dos substratos com o centro ativo da enzima (KUMARI et al., 2009). Às vezes, a água é inadequadamente incorporada ao meio devido à natureza hidrofílica do glicerol, o qual pode absorvê-la durante a reação (TEMELLI et al., 1996). O teor de água ideal para a atividade máxima da enzima depende do biocatalisador (ZAKS; KLIBANOV, 1988; FELTES, 2011). Um teor de água residual geralmente de 0,5 a 1% (m/v), correspondente a uma atividade de água (A_w) de 0,25 a 0,45, é necessário para a atividade catalítica da maioria das lipases, este teor, entretanto, pode ser de até 11% (m/v) (VILLENEUVE, 2007; FELTES, 2011).

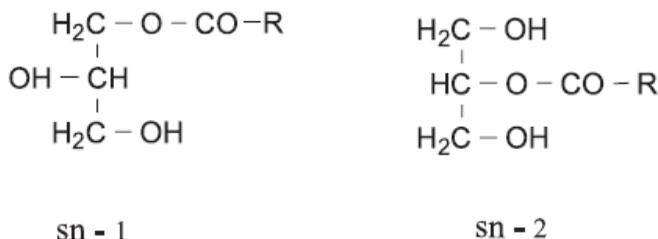
Em reações que envolvem o uso de glicerol, lipase imobilizada como o biocatalisador e óleos, um sistema trifásico é obtido, com uma fase oleosa hidrófoba, uma fase hidrófila glicérica e uma fase sólida à qual a enzima é ligada (PAWONGRAT et al., 2007). No entanto, um obstáculo importante que tem de ser ultrapassado nestas reações é a baixa miscibilidade do glicerol com o substrato (óleo ou de ácido graxos livre) (FELTES et al., 2012).

2.6.2 Monoacilgliceróis

Os monoacilgliceróis ou monoacilglicerídeos são monoésteres constituídos por uma molécula de glicerol ligada a uma molécula de ácido graxo. Suas formas isoméricas são 1(3)-monoacilglicerol (isômero α) e 2-monoacilglicerol (isômero β), como mostra a Figura 7. O primeiro isômero, mesmo puro, rapidamente converte-se para o segundo tipo de isômero, formando uma mistura (SANTOS, 2011). São emulsificantes que possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drugs Administration-USA), sendo amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (DA SILVA et al., 2002) por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos tensoativos iônicos (MACHADO et al., 2000). Todas essas aplicações são atribuídas principalmente aos MAGs devido a sua característica aniônica e estabilidade tanto em meio ácido quanto em meio básico

(BOYLE, 1997). Eles também são de grande interesse em química orgânica sintética onde são utilizados como intermediários sintéticos e como blocos de construção quiral (PAWONGRAT et al., 2007). Bellot et al. (2001) e Kaewthong & H-Kittikun (2004) afirmam ainda que, devido às propriedades lubrificantes e plastificantes, os MAGs são também utilizados em processos têxteis e produção de plásticos.

Figura 6 - Formas isoméricas dos monoacilgliceróis.



R-cadeia carbônica saturada ou insaturada.

Na indústria farmacêutica, os monoacilgliceróis são utilizados como emolientes para emplastos, liberando lentamente a medicação. Na indústria alimentícia são mais comumente utilizados como emulsificantes em produtos de padaria, como margarinas, derivados do leite, doces e molhos. Na indústria cosmética, eles são usados como agentes texturizantes e para melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG et al., 2005).

De acordo com a WHO (World Health Organization) e os órgãos europeus de regulamentação, os monoacilgliceróis comerciais de uso alimentício devem conter um mínimo de 70% da soma de monoacilglicerol e diacilglicerol, com o limite mínimo de 30% de monoacilgliceróis e máximo de 7% de glicerol (DRAMSTRUP et al., 2006). As propriedades e características dos MAGs, assim como nos TAGs e DAGs, estão intimamente ligadas aos ácidos graxos que os compõem, dessa forma, MAG compostos por ácidos graxos predominantemente insaturados tenderão a ter ponto de fusão menor enquanto MAGs compostos por ácidos graxos saturados tenderão a ter ponto de fusão mais alto.

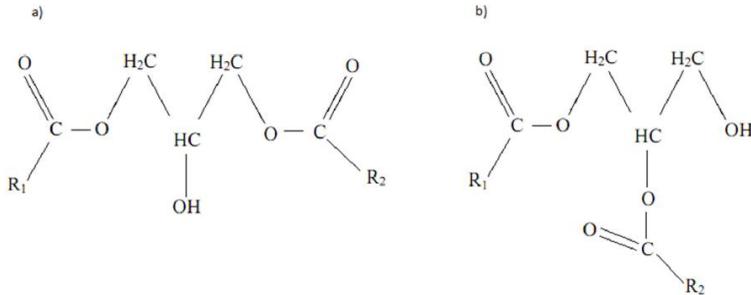
2.6.3 Diacilgliceróis

Os diacilgliceróis ou diacilglicerídeos são componentes naturais de vários óleos comestíveis. Normalmente, o nível de DAG em óleos comestíveis é inferior a 5% do total de óleo, com algumas exceções onde chegam até 10% em massa, este valor pode variar de acordo com o tipo de óleo vegetal. Os DAGs são moléculas constituídas por uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácido graxo, pode ser encontrado nas formas de sn-1,2-DAG (ou 2,3) e sn-1,3-DAG. Em produtos industrializados a quantidade do 1,3 DAG é substancialmente maior que a de 1(3), 2 DAG, na ordem de 7:3, em função da migração acil, que é privilegiada em altas temperaturas, comuns no processo de refino (SAMBANTHAMURTHI et al., 2000), isso ocorre porque na forma de 1,3-diacilgliceróis, os DAGs são mais estáveis do que a sua forma isomérica (1,2-diacilgliceróis) (LO et al., 2008). A isoforma 1,2-DAG é considerada como um intermediário metabólico que é formado após a ingestão de triacilglicerol. A 1,3-DAG é responsável pelo efeito benéfico, pois é metabolizado por uma via diferente do TAG e do 1,2-DAG (BABICS, 2010) (Figura 7).

O diacilglicerol é muito usado como emulsificante não iônico e estabilizante nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. O DAG é muito usado como emulsificante decorrente de seu caráter anfifílico, encontrando também na molécula de MAG. Como sua estrutura é semelhante à estrutura da molécula de TAG suas propriedades em relação ao sabor, cozimento de alimentos, ou mesmo no caso de frituras, são similares (WATANABE et al., 2001).

A Kao Corporation of Japan introduziu um óleo de cozinha rico em DAG em 1999, contendo mais de 80% da massa em DAG (70% 1,3-DAGs e representam 30% sn-1,2-DAGs + sn-2,3-DAGs). O óleo rico em DAG tem a mesma aparência e sabor dos óleos comestíveis convencionais, sendo amarelo claro com um sabor suave (OGAWA et al., 2001; FLICKINGER; MATSUO, 2003). Efeitos nutricionais do consumo do óleo rico em DAG na obesidade humana e hiperlipidemia têm sido amplamente investigados, e o mesmo foi reconhecido como FOSHU (do inglês “Food for Special Health Use”, que significa “Alimento para uso especial na saúde”) em 1999 no Japão (TAKASE, 2007). O óleo rico em DAG foi também aprovado como GRAS em 2000 e 2002 nos Estados Unidos e está disponível comercialmente nos países europeus (VOLL; BRITO, 2010).

Figura 7- Formas isoméricas dos diacilgliceróis.



R-cadeia carbônica saturada ou insaturada.

Fonte: Morita, (2009).

A substituição do consumo de óleo (TAG) pelo consumo de DAG é feita na tentativa de aumentar a perda de peso corporal e redução de gordura corporal em pessoas com sobrepeso ou obesas (MAKI et al., 2002). O consumo de DAG parece afetar o metabolismo lipídico e glicídico. Esses efeitos incluem redução do TAG plasmático, decréscimo da hiperlipidemia pós-prandial e da hemoglobina A1c, aumento no gasto de energia e redução na obesidade induzida por dieta. Isto em comparação com o consumo de TAG de similar composição de ácidos graxos (TADA, 2004). Em estudo realizado por Matsuyama et al. (2006) constatou-se que a ingestão do óleo rico em DAG fez decrescer as áreas da gordura abdominal e a concentração de leptina em crianças obesas, sugerindo que o consumo de óleo rico em DAG previne o excesso de adiposidade tanto em crianças como em adultos. Kawashima et al. (2008) investigaram, em homens e mulheres, durante um ano, os efeitos do consumo ad libitum de óleo rico em DAG sobre o peso corporal e o nível de TAG no sangue. Os autores concluíram que a perda de peso foi maior nos participantes que eram obesos no início do estudo. Os níveis de TAG no sangue decresceram significativamente em indivíduos com hipertrigliceridemia.

Diversos experimentos mostram que uma dieta contendo 1,3-DAG resulta em níveis plasmáticos de TAG menores no estado de jejum e no estado pós-prandial, bem como menor quantidade de TAG em quilomicrons (VOLL; BRITO, 2010). Os autores associam esses resultados quanto à perda de peso e à redução dos níveis plasmáticos de TAG ao metabolismo diferencial do 1,3-DAG. Além disso, a exposição hepática a ácidos graxos pelo aumento da ingestão de DAG e maior quantidade de AGL que vão diretamente para o fígado pode levar a uma maior beta-oxidação hepática quando comparado à ingestão de TAG, e o

aumento da beta-oxidação pode levar a um aumento da saciedade (WESTERTERP-PLANTENGA, 2004). O aumento da saciedade induz em diminuição da ingestão de alimentos o pode induzir a redução de peso e perda de gordura em pessoas que se alimentam de DAG em um longo prazo e em doses suficientes (RUDKOWSKA et al., 2005).

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como exposto nesse capítulo, o uso da biocatálise surge como um processo alternativo para síntese de produtos com alto valor agregado, para a indústria farmacêutica, cosmética e química. A reação de glicerólise catalisada por lipases é uma via que pode apresentar altos rendimentos, porém, algumas barreiras são encontradas nessa reação, a principal delas é a imiscibilidade entre os substratos, glicerol e óleo, sendo o glicerol de natureza polar e o óleo de natureza apolar. Buscando melhorar a imiscibilidade dos substratos, reduzir o tempo de reação e maximizar a produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, o uso de irradiação de ultrassom é uma alternativa promissora.

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo principal maximizar a produção enzimática de monoacilgliceróis e diacilgliceróis em sistema livre de solventes orgânicos, utilizando ultrassom, por meio da reação de glicerólise, visando verificar o efeito de vários parâmetros na reação (razão molar dos substratos óleo de canola, óleo de soja e glicerol, concentração de enzima, temperatura, agitação e potência do ultrassom) bem como a cinética da reação em termos de conversão em monoacilgliceróis e diacilgliceróis utilizando a lipase comercial imobilizada Novozym 435.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados, bem como os procedimentos laboratoriais adotados durante a fase experimental deste trabalho, relacionados à caracterização dos óleos de soja e de canola utilizados como substratos, à produção e quantificação dos produtos de interesse, à maximização da conversão da reação de glicerólise enzimática e à avaliação cinética da reação de glicerólise para obtenção de mono- e diacilgliceróis.

3.1 MATERIAL

Enzima

Foi utilizada a lipase comercial de origem microbiana Novozym 435, produzida a partir de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa de troca iônica, pela Novozymes Brasil/ Araucária-PR. A enzima atua randomicamente nas 3 posições do triacilglicerol. O produto é constituído por partículas de formato esférico, com diâmetro de partícula entre 0,3 e 0,9mm e densidade de aproximadamente 430 kg/m³. Esse produto é fornecido com quantidade de água entre 1-2%. Segundo o fornecedor, a enzima pode ser utilizada em temperaturas na faixa de 40-70 °C (DAMSTRUP et al., 2006a).

Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes/solventes:

- Hexano (Quimex, 99,5%);
- Diclorometano (Vetec, 99,5%);
- Derivatizante MSTFA (*N-methyl-N-trimethylsilylfluoroacetamida*).

Todos os reagentes foram empregados sem nenhum tratamento adicional.

Substratos

Como substratos para a reação de glicerólise foram utilizados:

- Óleo de canola refinado (Salada);
- Óleo de soja refinado (Soya);
- Glicerol (Vetec, 99,5 %).

Padrão químico

O padrão químico utilizado foi:

- Monoleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza).
- Dioleína, adquirido da Sigma-Aldrich (Supelco, 99% pureza).

3.2 CARACTERIZAÇÕES DOS ÓLEOS VEGETAIS

As análises para a caracterização dos óleos refinados de soja e canola descritas neste item foram realizadas no Uruguai, no Laboratorio de Grasas y Aceites de la Facultad de Química del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos - Universidad de la Republica, Montevideo.

Índice de acidez

A determinação do índice de acidez dos óleos foi realizada segundo metodologia AOCS Cd 3d – 63. Primeiramente pesou-se de 4 a 15g de óleo, inteiramente líquido, em um erlemeyer se 250mL, após o óleo foi dissolvido em uma solução neutralizada de 150mL de etanol: éter etílico (1:1v/v). Adicionaram-se 2mL do indicador (solução de fenolftaleína 1% em etanol 95%) e titulou-se com solução padronizada de KOH 0,1M. As análises foram feitas em duplicata e os resultados foram expressos como índice de acidez em ácido oleico, calculado pela Equação (1):

$$\text{I.A. (\% ácido oleico)} = \frac{56,1 \cdot V \cdot M}{m}$$

(1)

Onde:

V = volume de base gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de KOH, corrigida;

m = massa da amostra (g).

Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado segundo o método AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1990). Pesou-se cerca de 5,00+0,05g do óleo, após este foi dissolvidos em 50mL de solução ácido acético-clorofórmio (3:2, v/v) e 0,5mL de solução saturada de KI. Após 1 minuto em repouso, adicionaram-se 30 mL de água destilada. Titulou-se com solução padronizada de Na₂S₂O₃ 0,01M, sob constante e vigorosa agitação, até

que a cor amarela do iodo tivesse quase desaparecido. Após adição de 0,5mL de solução indicadora de amido a 1%, continuou-se a titulação com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01M até que a cor azul da solução tivesse desaparecido. Realizou-se paralelamente a titulação de um branco. O índice de peróxidos (I. P.) (meq de O_2/kg de óleo) foi calculado através da Equação 2:

$$\text{I. P.} \left(\text{meq de } \frac{\text{O}_2}{\text{kg}} \text{ de óleo} \right) = \frac{\text{M. (V - Vb). 1000}}{\text{m}} \quad (2)$$

Onde:

V = volume gasto na titulação da amostra (mL);

Vb = volume gasto na titulação do branco (mL);

M = molaridade da solução padronizada de tiosulfato de sódio;

m = massa de amostra (g).

Determinação do perfil de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos dos óleos foi realizada em Cromatógrafo Gasoso (GC) – equipamento Shimadzu GC-14B com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar SGE BPX70 (70% Cianopropil polisilfenilsiloxano) de 60m x 0,25mm x 0,25 μm . A programação de temperatura da coluna utilizada foi 160°C por 1min, seguido pelo aumento de 4°C/min até 230°C, permanecendo a 230°C por 10min.

Na preparação das amostras para a análise cromatográfica foram pesadas entre 40 e 90mg de amostras em um tubo com rosca, em seguida foi adicionado 1,5mL de solução metanólica de NaOH 0,5M, o tubo foi fechado e aquecido em um banho (~100°C) por 3-5 min. Após, o tubo foi retirado do banho e resfriado, adicionava-se 4mL de solução metanólica de BF₃ 14% e a solução retornava ao banho (~100°C) por mais 5min era retirado novamente, resfriado e adicionado à mistura 2mL de solução de heptadecanoato de metila (concentração de 5mg/mL) e a solução foi agitada e adicionava-se 5mL cloreto de sódio, em seguida a amostra permaneceu em repouso para decantar, a fase sobrenadante foi recolhida para injeção no cromatógrafo gasoso. Com os resultados foi possível calcular as massas molares dos óleos estudados.

Determinação quantitativa dos triacilgliceróis

A determinação do teor de triacilgliceróis foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC system - Agilent Series), equipado com detector Light Scattering. Os seguintes instrumentos e condições foram usados: coluna C-18 Zorbax (4,6m x 250mm, 5mm), vazão de 1,0mL/min, temperatura do detector de 80°C e a programação de solventes descrita na Tabela 2.

Para a preparação das amostras para a análise, foram pesados 15mg de cada óleo, que após foi diluído em 3mL de acetona. Desta solução, 1mL foi transferido para um *vial* de 1,5mL que foi aquecido até 40°C para a completa dissolução da amostra.

Tabela 2 - Programação dos solventes para as injeções em HPLC.

| Tempo (min) | Solvente | | |
|----------------|----------|--------------|-------------|
| | Acetona | Acetonitrila | Clorofórmio |
| 0 | 50 | 50 | 0 |
| 60 | 40 | 40 | 20 |
| 80 | 40 | 40 | 20 |
| 85 | 50 | 50 | 0 |
| 110 | 50 | 50 | 0 |

3.3 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM

Descrição dos aparatos e procedimentos experimentais

A unidade experimental montada para o desenvolvimento do trabalho consistiu na utilização de um balão de fundo redondo de 50mL que era imerso em banho de ultrassom (UNIQUE) modelo USC1880A, tensão 220V, frequência de 37 kHz e potência de 132W, com controle de temperatura e potência do meio reacional. Neste sistema foi também inserido um agitador mecânico (IKA, modelo RW 20), com controlador digital. Na Figura 8 é apresentada a unidade experimental utilizada durante o desenvolvimento deste trabalho.

O procedimento experimental adotado na etapa de produção de MAGs e DAGs consistiu nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40°C por 1h para secagem (OLIVEIRA et al., 2006a). Em seguida eram adicionados ao reator o óleo de canola/soja e o glicerol (em quantidades definidas no planejamento de experimentos, com volume total de 15mL), e a enzima em concentrações pré-

estabelecidas. A relação mássica (óleo, glicerol e enzima) utilizada em cada reação foi determinada pelo planejamento experimental. Em seguida, era acoplado ao ultrassom o agitador mecânico ao reator (Figura 8) e este era fechado e a reação iniciada. Ao final do tempo da reação, o agitador e o banho eram desligados e o agitador era retirado do reator para que todo o meio reacional fosse recolhido. Todo o volume do reator era retirado e filtrado a vácuo com sucessivas lavagens com hexano para separar a enzima do meio reacional, principalmente do glicerol aderido à superfície da enzima imobilizada. O meio reacional eram transferido para frascos de amostragem e acondicionado em estufa a vácuo (65°C, 0,5bar) por 24h a fim de eliminar o excesso de solvente. Após o meio reacional era armazenado em freezer, -10°C, até a injeção para a análise em cromatógrafo gasoso.

Figura 8 – Unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom.



Recuperação das lipases após a reação

Para recuperar a enzima ao final de cada reação, o biocatalisador imobilizado foi separado do meio reacional por filtração com papel de filtro. Em seguida, realizaram-se duas lavagens com 10mL de hexano e filtrou-se a vácuo a suspensão obtida. Este procedimento é uma variação do método desenvolvido por Castro e Anderson (1995), que utiliza heptano. Posteriormente secou-se a enzima em estufa a 40°C durante 4h. A enzima recuperada foi mantida em dessecador por 24h. Após este período, a atividade da mesma foi determinada para verificar possíveis perdas durante a reação e torná-la apta para a reutilização. A medida de atividade foi realizada no início e no final das reações com a enzima recuperada. Antes de iniciar o procedimento de medida de atividade, as enzimas imobilizadas foram secas em estufa a 40°C durante uma hora (OLIVEIRA et al., 2006a), para perda de umidade livre.

Determinação de MAG e DAG

A determinação do teor de MAG, DAG, TAG nas amostras coletadas foi realizada a fim de conhecer o comportamento da reação ao final do tempo e determinar a conversão em produtos desejados (MAG e DAG). As análises das amostras foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático *on-column* e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano) de 30m x 0,25mm x 0,1µm (J e W Scientific, nº de série: US7162944H). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C por 1min, seguido pelo aumento de 15°C/min até 180°C, 7°C/min até 230°C e 10°C/min até 380°C, permanecendo por 8min. A temperatura do detector era de 380°C, pressão do gás de arraste (nitrogênio) de 80kPa e o volume injetado foi de 1µL.

Para a quantificação dos produtos MAG e DAG utilizou-se padrões externos monooleína e dioleína. Para a construção das curvas de calibração preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo, e a partir destas preparou-se 9 soluções de calibração em diferentes concentrações para os glicerídeos, conforme a Tabela 3. As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram segundo a Norma nº 14.105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos conforme metodologia adaptada por Krüger (2010). Nas soluções de calibração foi adicionado derivatizante MSTFA, o qual transforma os glicérides em seus

respectivos derivados voláteis, para que possam ser quantificados por cromatografia gasosa. Após a solução foi agitada e deixada em temperatura ambiente por 15min para que o derivatizante reagisse. Em seguida, aferiu-se o volume (5mL) com diclorometano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5mL e injetadas em cromatógrafo gasoso.

Na preparação das amostras reacionais para a análise cromatográfica foram pesadas 50mg de cada amostra homogeneizada em balão volumétrico de 5mL, após foram adicionados 100 μ L do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15min, para que reagisse. Em seguida, o volume foi aferido (5mL) com diclorometano. As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5mL e levadas para análise em cromatógrafo gasoso.

Tabela 3 - Preparação das soluções de calibração dos glicerídeos.

| Padrão externo | Solução de calibração | | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|------|-----|-----|-----|-----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Monooleína (mg/L) | 1500 | 1000 | 500 | 105 | 50 | 40 | 20 | |
| Dioleína (mg/L) | 1500 | 1000 | 700 | 400 | 150 | 100 | 80 | 50 |

Determinação da atividade de esterificação da lipase

A determinação da atividade de esterificação da lipase foi quantificada pelo consumo de ácido láurico na reação de esterificação entre o ácido láurico e álcool propílico com razão molar ácido láurico-álcool de 3:1 à temperatura de 60°C, com a enzima a 5% (m/m) mantida sob agitação por 40min. A reação iniciou-se pela adição da enzima ao meio reacional, em um reator de vidro encamisado, de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. Retiraram-se alíquotas de 150 μ L, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 40min de reação, diluiu-se em uma solução de 20mL de acetona-etanol (1:1) v/v com a finalidade de cessar a reação e de extrair os ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido é determinada pela titulação com NaOH 0,01mol.L⁻¹ (Oliveira et al., 2006a). Uma unidade de atividade (U/g) foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

Para o cálculo da atividade enzimática empregou-se a Equação 3:

$$\text{Atividade(U/g)} = \frac{[(V^0_{\text{NaOH}}) - (V^{40}_{\text{NaOH}})]}{t \cdot m} \cdot M \cdot 10^3 \quad (3)$$

Onde:

M = Molaridade da solução de NaOH (mol.L^{-1});

V^0_{NaOH} = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada do reator no tempo zero (mL);

V^{40}_{NaOH} = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

m = massa de preparado enzimática utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min);

1U = $1\mu\text{mol}$ de ácido/min.

Para o cálculo da atividade de esterificação relativa foi utilizada a Equação 4:

$$\text{Atividade relativa(\%)} = \frac{A_f}{A_0} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

A_0 = atividade enzimática inicial (U/g);

A_f = atividade enzimática final (U/g).

Estratégia de utilização de planejamentos de experimentos sequenciais

Com base em estudos prévios (FIAMETTI, 2012; KRÜGER, 2010) e com o objetivo de determinar as condições experimentais que correspondam à máxima conversão em mono e diacilgliceróis, as seguintes variáveis foram avaliadas: razão molar dos substratos, concentração de enzima, temperatura, agitação e potência do ultrassom. Para tal, primeiramente foi realizado um planejamento experimental Plackett & Burman com 12 experimentos e triplicata no ponto central, a fim de calcular o erro experimental, com o objetivo de selecionar as variáveis para a produção de MAG e DAG. Na sequência foram realizados outros dois planejamentos fatorial completo 2^2 e fatorial completo 2^3 para óleo de canola e soja, respectivamente, os quais também foram realizados com triplicata no ponto central a fim de

calcular o erro experimental (Tabela 4). Em todos os experimentos, o tempo de reação foi fixado em 3 horas para ambos os óleos.

Tabela 4 - Faixa de estudo das variáveis independentes da matriz do planejamento para a conversão de mono e diacilgliceróis, através de glicerólise enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom.

| Variáveis | Níveis | | |
|------------------------------|---|-------|------|
| | -1 | 0 | 1 |
| | Planejamento Plackett & Burman | | |
| Temperatura (°C) | 40 | 55 | 70 |
| Razão Molar (Glicerol:Óleo) | 0,8:1 | 1,9:1 | 3:1 |
| Concentração da enzima (m/m) | 2,5 | 6,25 | 10 |
| Agitação (rpm) | 0 | 300 | 600 |
| Potência (%) | 40 | 70 | 100 |
| | Fatorial completo 2 ² (óleo de canola) | | |
| Agitação (rpm) | 0 | 600 | 1200 |
| Potência (%) | 0 | 40 | 80 |
| | Fatorial completo 2 ³ (óleo de soja) | | |
| Temperatura (°C) | 60 | 70 | 80 |
| Agitação (RPM) | 600 | 900 | 1200 |
| Potência (%) | 0 | 40 | 80 |

Avaliação da cinética reacional da obtenção de MAG e DAG em ultrassom

Com os resultados obtidos nos planejamentos de experimentos, um estudo cinético da reação foi realizado nesta etapa, adotando a razão molar glicerol:óleo de (0,8: 1), a temperatura de 70 °C, concentração de enzima 10% em massa (com base na massa total de substratos – glicerol e óleo). Também foram adotadas as condições de potência do ultrassom em 0, 40, 80 e 100% e de 0, 600, 900 e 1200 rpm para a agitação. As

amostras foram retiradas do sistema nos seguintes tempos: 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1,1,5, 2, 3 e 4 horas para posterior análise da conversão da reação.

Determinação das velocidades iniciais de reação

A velocidade inicial de uma reação enzimática é definida pela razão da variação de conversão em um determinado tempo pela variação do tempo na faixa linear da curva cinética. Assim, a velocidade inicial de cada reação (r) foi calculada através da seguinte equação:

$$r = \frac{(\Delta C)}{t} = \frac{C - C_0}{t - t_0} \quad (5)$$

Onde:

r = velocidade inicial da reação (mmol/min);

C = conversão de monoacilgliceróis ou diacilgliceróis no tempo t (mol);

C_0 = conversão de monoacilgliceróis ou diacilgliceróis no tempo 0 (mol);

t = tempo (min);

t_0 = tempo do início da reação (min).

Para o cálculo das conversões de formação de MAGs e DAGs foi utilizado como base a massa molar dos compostos escolhidos como representativos, a monooleína e a dioleína.

Análise estatística dos resultados

A análise estatística relacionada com os efeitos estimados de cada variável e otimização dos processos foi realizada através do erro padrão relativo entre os dados experimentais. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho, relacionados à caracterização dos óleos de soja e canola, a verificação do efeito das variáveis de processo, temperatura, razão molar entre os substratos, concentração de enzima, agitação e potência do ultrassom na produção de mono- e diacilgliceróis, utilizando a técnica de planejamento experimental. Também serão expostos os estudos cinéticos realizados nas reações em ultrassom e sob agitação mecânica em sistema livre de solvente.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Na Tabela 5 é apresentada a caracterização dos óleos refinados de soja e canola, utilizados neste trabalho, quanto ao índice de acidez e índice de peróxido. Pode-se observar, através desta tabela, que o índice de acidez para ambos os óleos pode ser considerado baixo, 0,07 g ácido oleico/100 g para óleo de soja e 0,09 g ácido oleico/100 g para óleo de canola. Estes resultados já eram previstos pois, segundo a legislação brasileira (ANVISA, 2005), o teor de acidez de um óleo comercial refinado em gramas de ácido oleico pode ser no máximo 0,3 g/100 g. O índice de peróxido de ambos os óleos também tiveram valores baixos, 1,05 meq O₂/kg óleo para o óleo de soja e 1,25 meq O₂/kg óleo para o óleo de canola. Estes valores estão de acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2005) que prevê um máximo, para óleos refinados, de 10 meq O₂/kg óleo. Como o teor de peróxidos indica o grau de auto-oxidação do óleo (FENNEMA, 2000), fica claro que os óleos refinados possuem boa proteção quanto à oxidação, devido à presença de antioxidantes (REDA, 2004). Tendo como base os resultados obtidos, baixos valores de índice de peróxido e índice de acidez, pode-se afirmar que estes óleos atendem às exigências legais para o óleo refinado de boa qualidade.

Tabela 5 - Caracterização de óleos refinados comerciais de soja e canola, quanto ao índice de acidez e peróxido.

| | Soja | Canola |
|--|------|--------|
| Índice de acidez (g ácido oleico/100 g) | 0,07 | 0,09 |
| Índice de peróxido (meq O ₂ /kg óleo) | 1,05 | 1,25 |

Na Tabela 6 são apresentadas as composições em ácidos graxos dos óleos estudados. O óleo de soja, como pode se observar, é composto pelos ácidos palmítico (10,4%), palmitoleico (0,1%) esteárico (3%), linolênico (5,4%), araquidônico (0,3%), e como ácidos graxos majoritários oleico (26,7%) e linoleico (52,2%). O óleo de canola apresenta um perfil similar ao óleo de soja quanto ao tipo de ácidos graxos, porém em proporções diferentes: mirístico (0,1%), palmítico (4,4%), palmitoleico (0,2%), esteárico (2,3%) linolênico (7,7%), araquidônico (0,7%) e como ácidos graxos majoritários oleico (63,3%) e linoleico (19,2%). Essas composições, tanto para óleo de soja quanto para óleo de canola, são similares aos resultados obtidos por Scherr & Ribeiro (2010), que analisaram e compararam as características de diferentes óleos comerciais. Tomando-se como base a composição dos ácidos graxos insaturados: oleico, linoleico e linolênico, observa-se que todos os óleos estudados possuem alto grau de insaturação (REDA, 2004). O elevado teor de monoinsaturados (oleico) e polinsaturados (linoleico e linolênico) representa uma excelente composição de ácidos graxos, tornando ambos os óleos como potenciais para a aplicação em inúmeros processos para a indústria de alimentos e fármacos.

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos dos óleos de canola e soja comerciais refinados.

| Ácido graxo | Nomenclatura | Óleo de soja (%(m/m)) | Óleo de canola (%(m/m)) |
|-------------|--------------|--------------------------|----------------------------|
| C14:0 | Mirístico | - | 0,1 |
| C16:0 | Palmítico | 10,4 | 4,4 |
| C16:1 | Palmitoléico | 0,1 | 0,2 |
| C18:0 | Esteárico | 3,0 | 2,3 |
| C18:1 | Oleico | 26,7 | 63,3 |
| C18:2 | Linoleico | 52,2 | 19,2 |
| C18:3 | Linolênico | 5,4 | 7,7 |
| C20:0 | Araquidônico | 0,3 | 0,7 |
| Total | | 98 | 97,9 |

Através da análise dos óleos de soja e canola em cromatógrafo líquido de alta eficiência foi possível a análise qualitativa e quantitativa da composição dos grupos químicos dos óleos. Nesta análise foi possível observar que ambos os óleos refinados são compostos unicamente por TAGs (100%), isto indica as boas condições físico-químicas dos óleos utilizados neste estudo. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois, óleos vegetais são constituídos principalmente de triacilgliceróis (> 95%) e pequenas quantidades de mono- e diacilgliceróis (LEHNINGER, NIELSON E COX, 1995). O baixo teor de ácidos graxos livres corrobora o baixo índice de acidez dos óleos analisados, como apresentado anteriormente. Com o resultado da composição em ácidos graxos e a identificação dos grupos químicos presentes nos óleos foi possível o cálculo das massas molares correspondentes, onde o óleo de soja apresentou massa molar de 872,91g/mol e o óleo de canola, massa molar de 879,75 g/mol. Estes valores condizem com os valores encontrados na literatura (FIRESTONE, 1999).

4.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO DE MAG E DAG

Para a obtenção das equações dos padrões de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, monooleína e dioleína, foram construídas as curvas padrões (concentração *versus* área). As curvas dos dois componentes podem ser observadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Cada ponto representado nas figuras é uma média da duplicata realizada. Assim, a partir das curvas de calibração, foram obtidas as seguintes equações da reta: $Y = 0,0003 * X$ e $Y = 0,0009 * X$, respectivamente para MAGs e DAGs, onde $Y =$ concentração (ppm ou mg/L) e $X =$ Área (UA). O resultado encontrado para cada composto, utilizando a curva de calibração, foi dividido pela concentração inicial da amostra e multiplicado por 100. Foram obtidos, assim, resultados em porcentagem do componente em relação à massa total da amostra (% m/m) (KRÜGER, 2010).

Figura 9 - Curva padrão para determinação da concentração de monooleína.

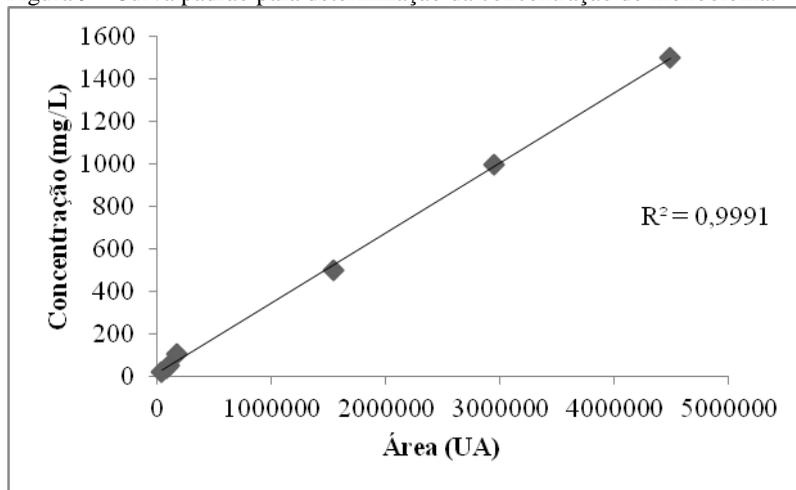
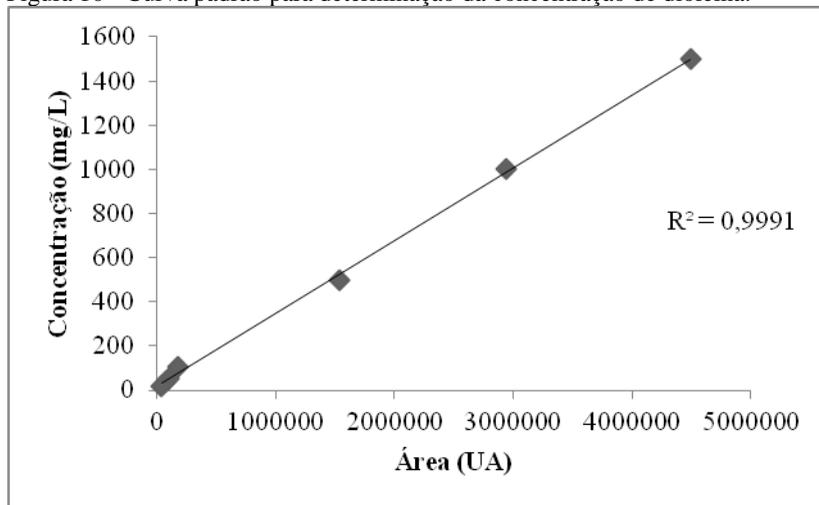


Figura 10 - Curva padrão para determinação da concentração de dioleína.



Alguns cromatogramas das análises dos padrões e de algumas das análises realizadas para o acompanhamento da cinética encontram-se, para visualização, no Apêndice A.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE MAG E DAG

Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial do tipo Plackett & Burman (valores (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m) para óleo de soja e óleo de canola.

| Ensaio | Temp. (°C) | Razão* Molar | Conc. Enzima (% , m/m) | Agitação (rpm) | Potência (%) |
|---------------|----------------------|------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | 1 (70) | -1 (0,8:1) | 1 (10) | -1 (0) | -1(40) |
| 2 | 1 (70) | 1 (3:1) | -1 (2,5) | 1 (600) | -1 (40) |
| 3 | -1 (40) | 1 (3:1) | 1 (10) | -1 (0) | 1 (100) |
| 4 | 1 (70) | -1 (0,8:1) | 1 (10) | 1 (600) | -1 (40) |
| 5 | 1 (70) | 1 (3:1) | -1 (2,5) | 1 (600) | 1 (100) |
| 6 | 1 (70) | 1 (3:1) | 1 (10) | -1 (0) | 1 (100) |
| 7 | -1(40) | 1 (3:1) | 1 (10) | 1 (600) | -1 (40) |
| 8 | -1 (40) | -1 (0,8:1) | 1 (10) | 1 (600) | 1 (100) |
| 9 | -1 (40) | -1 (0,8:1) | -1 (2,5) | 1 (600) | 1 (100) |
| 10 | 1 (70) | -1 (0,8:1) | -1 (2,5) | -1 (0) | 1 (100) |
| 11 | -1 (40) | 1 (3:1) | -1 (2,5) | -1 (0) | -1 (40) |
| 12 | -1 (40) | -1 (0,8:1) | -1 (2,5) | -1 (0) | -1 (40) |
| 13 | 0 (55) | 0 (1,9:1) | 0 (6,25) | 0 (300) | 0 (70) |
| 14 | 0 (55) | 0 (1,9:1) | 0 (6,25) | 0 (300) | 0 (70) |
| 15 | 0 (55) | 0 (1,9:1) | 0 (6,25) | 0 (300) | 0 (70) |

codificados e reais) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis

| Óleo de Soja | | | Óleo de Canola | | |
|--------------|----------|----------|----------------|----------|----------|
| MAG | DAG | MAG+DAG | MAG | DAG | MAG+DAG |
| (%, m/m) | (%, m/m) | (%, m/m) | (%, m/m) | (%, m/m) | (%, m/m) |
| 5,91 | 4,18 | 10,46 | 2,70 | 4,58 | 7,27 |
| 10,01 | 23,08 | 33,09 | 6,59 | 9,07 | 15,66 |
| 1,20 | 2,18 | 3,38 | 0,66 | 1,33 | 1,99 |
| 30,13 | 32,32 | 62,45 | 28,30 | 24,05 | 52,35 |
| 8,73 | 11,71 | 20,44 | 0,93 | 1,82 | 2,75 |
| 2,30 | 6,61 | 8,91 | 0,78 | 0,70 | 1,48 |
| 6,19 | 14,06 | 20,25 | 3 | 6,17 | 9,17 |
| 6,74 | 8,01 | 14,75 | 3,52 | 6,10 | 9,62 |
| 2,78 | 2,33 | 5,01 | 0,29 | 0,79 | 1,08 |
| 2,67 | 6,22 | 8,89 | 0,93 | 1,61 | 2,54 |
| 0,24 | 1,56 | 1,80 | 1,65 | 1,31 | 2,96 |
| 0,18 | 0,47 | 0,75 | 0,41 | 0,17 | 0,58 |
| 7,7 | 14,74 | 22,44 | 11,61 | 13,14 | 24,75 |
| 9,9 | 12,17 | 22,16 | 10,26 | 16,43 | 26,9 |
| 7,04 | 14,75 | 21,79 | 13 | 11,51 | 24,51 |

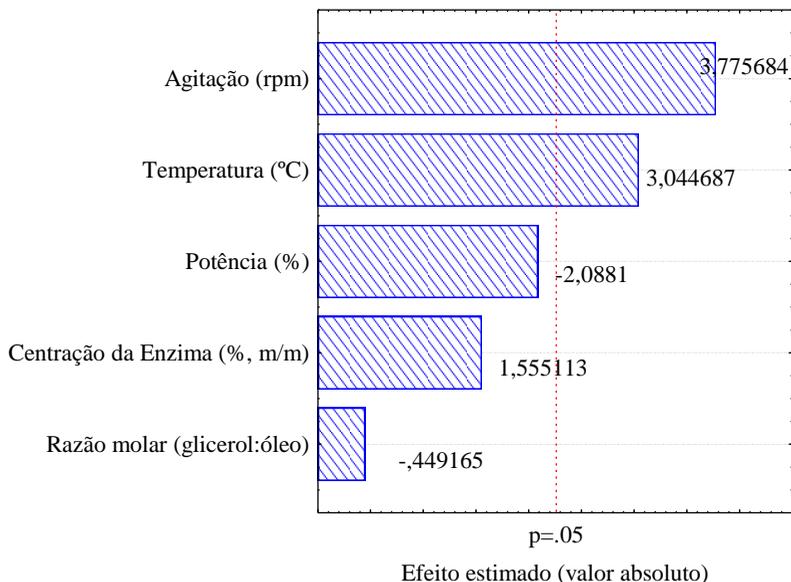
*Razão molar: (glicerol:óleo)

Tomando como base estudos preliminares realizados por Fiametti (2011) foi proposta a utilização do planejamento de experimentos utilizando o modelo proposto por Plackett & Burman com 12 ensaios, com triplicata do ponto central, para avaliação dos efeitos das variáveis temperatura, razão molar, concentração de enzima, agitação e potência de ultrassom na produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como catalisador a enzima Novozym 435, em meio livre de solvente orgânico, em banho de ultrassom. O tempo de reação foi fixado em 3h, para os óleos comerciais refinados de soja e de canola. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento de experimento e as respostas em termos de rendimento em MAG, DAG e MAG+DAG para os óleos de soja e de canola, respectivamente.

Na Tabela 7 pode-se observar que, no caso do óleo de soja, o ensaio que apresentou maior rendimento foi o 4 (62,45%), o qual corresponde à temperatura mais elevada (70 °C), menor razão molar entre os substratos (0,8:1), maior concentração de enzima (10% m/m), maior agitação (600 rpm) e menor potência de ultrassom (40%), em 3 horas de reação. Os dados apresentados na Tabela 7 quanto ao óleo de soja, e seus resultados quanto ao rendimento total da reação (% MAG+DAG) foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 11, onde se pode observar que a temperatura e a agitação apresentaram um efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão em MAG+DAG.

Na Tabela 7 onde estão apresentadas os resultados quanto ao planejamento Plackett & Burman realizado com o óleo de canola. Pode-se observar que os melhores resultados quanto ao rendimento da reação (52,35%) também foram encontrados no ensaio 4 do planejamento, conduzido com as mesmas condições reacionais para o óleo de soja. O ensaio que apresentou os maiores rendimentos em MAG e DAG correspondem à temperatura mais elevada (70 °C), menor razão molar entre os substratos de (0,8:1), maior concentração de enzima (10% m/m), maior agitação (600 rpm) e menor potência de ultrassom (40%), após 3 horas de reação.

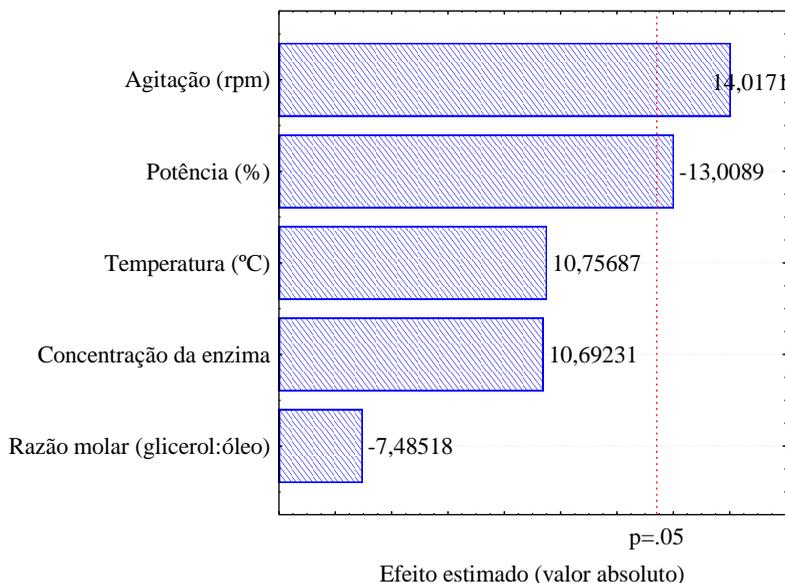
Figura 11 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando a lipase Novozym 435 em sistema livre de solvente em banho de ultrassom utilizando como substrato o óleo de soja em função das variáveis independentes.



Os dados apresentados na Tabela 7, quanto a óleo de canola, foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 12, onde pode-se observar que a agitação apresentou efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) e a potência do ultrassom apresentou efeito negativo significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão em MAG e DAG com óleo de canola.

Os resultados em conversão em MAG e DAG com ambos os óleos, principalmente com o óleo de soja que apresentou maiores rendimentos (~62%) em comparação ao óleo de canola (~52%), obtidos nesta primeira avaliação são resultados que podem ser considerados relevantes, principalmente quando considerado o curto tempo de reação e a ausência de solventes e/ou surfactantes, que tornariam o processo mais oneroso e com maiores custos de produção e separação do produto final.

Figura 12 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando a lipase Novozym 435 em sistema livre de solvente em banho de ultrassom utilizando como substrato o óleo de canola em função das variáveis independentes.



Liu et al. (2012) obtiveram altos rendimentos, cerca de 53% (m/m), em DAG, na glicerólise enzimática de óleo de soja em sistema livre de solvente catalisada pela enzima Lipozyme IM-LU em 12 horas de reação em condições ótimas de reação. Kaewthong e H-Kittikun (2004) também obtiveram alto rendimento na reação de glicerólise enzimática de oleína de palma, cerca de 56% (m/m), em MAG, catalisada pela lipase Amano PS, utilizando a mistura de 10% (m/v) da mistura de acetona e iso-octano (3:1) em relação à oleína de palma, utilizando a razão molar (8:1) glicerol: óleo, em 24 horas de reação a 45 °C.

Valério et al. (2009), utilizando como biocatalisador a lipase Novozym 435, na glicerólise de azeite de oliva em meio livre de solvente, na presença do surfactante Triton X-100, obtiveram um teor superior a 35% (m/m) de MAG+DAG. Em estudo semelhante, Valério et al.(2010), utilizando o mesmo catalisador, porém com o surfactante Tween 65, obtiveram 26 e 17% de MAG e DAG, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos no planejamento Plackett & Burman e na busca da maximização da produção de MAG e DAG, foram realizados planejamentos sequenciais, do tipo Delineamento Composto Central 2^3 e 2^2 para óleo de soja e canola, respectivamente. Estes planejamentos também foram realizados com triplicata no ponto central a fim de calcular o erro experimental e em todos os experimentos o tempo de reação foi fixado em 3 horas. No planejamento DCC 2^3 como óleo de soja, manteve-se constante a concentração de enzima (10% m/m) e razão molar (glicerol: óleo) (0,8:1), variando a temperatura, a potência do ultrassom e a agitação nas reações. As Tabelas 8 e 9 apresentam a matriz do planejamento DCC 2^3 com os valores codificados e reais, as respostas para a produção de MAG e DAG e as atividades enzimáticas residuais de cada ensaio, respectivamente para o óleo de soja e de canola. O tratamento estatístico dos dados apresentados na Tabela 8 é apresentado na Figura 13.

Tabela 8 - Matriz do planejamento de experimentos (valores reais e codificados) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (% , m/m) para óleo de soja.

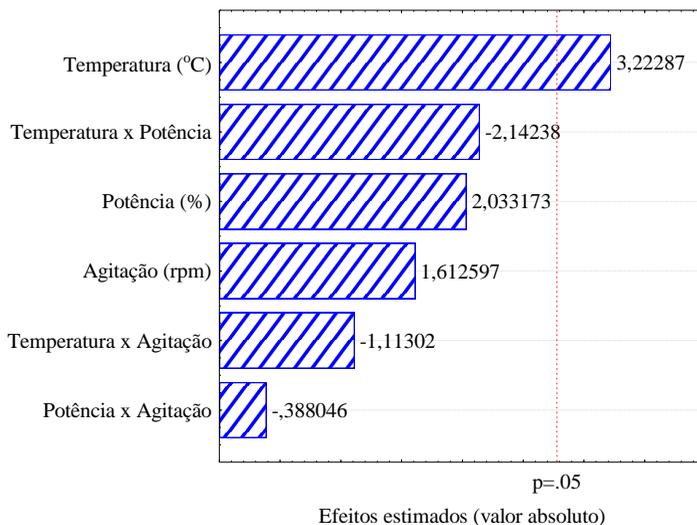
| Ensaio | Temp. (°C) | Potência (%) | Agitação (rpm) | MAG (%,m/m) | DAG (%,m/m) | MAG+ DAG (%,m/m) | Ativ. Residual (%) |
|--------|---------------|-----------------|-------------------|----------------|----------------|------------------------|--------------------------|
| 1 | -1 (60) | -1 (0) | -1 (600) | 16,64 | 25,39 | 42,03 | 96,34 |
| 2 | 1 (80) | -1 (0) | -1 (600) | 25,011 | 31,52 | 56,63 | 78,01 |
| 3 | -1 (60) | 1 (80) | -1 (600) | 23,49 | 29,01 | 52,51 | 101,53 |
| 4 | 1 (80) | 1 (80) | -1 (600) | 24,73 | 31,83 | 56,57 | 111,11 |
| 5 | -1 (60) | -1 (0) | 1 (1200) | 23,64 | 25,75 | 49,39 | 82,03 |
| 6 | 1 (80) | -1 (0) | 1 (1200) | 31,36 | 26,51 | 57,88 | 71,26 |
| 7 | -1 (60) | 1 (80) | 1 (1200) | 25,01 | 31,87 | 56,88 | 58 |
| 8 | 1 (80) | 1 (80) | 1 (1200) | 28,10 | 29,37 | 57,47 | 123,65 |
| 9 | 0 (70) | 0 (40) | 0 (900) | 22,30 | 34,80 | 57,1 | 112 |
| 10 | 0 (70) | 0 (40) | 0 (900) | 20,85 | 41,25 | 62,12 | 99,35 |

| | | | | | | | |
|----|--------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|
| 11 | 0 (70) | 0 (40) | 0 (900) | 27,48 | 27,40 | 54,88 | 95,02 |
|----|--------|--------|---------|-------|-------|-------|-------|

*Atividade inicial da enzima= 38,52 U/g

Pode-se observar na Tabela 8 que a conversão mais elevada em MAG e DAG (62,12%) foi obtida no ensaio 10, que apresentava valores intermediários para as variáveis temperatura (70 °C), agitação (900 rpm) e potência de ultrassom (40%), confirmando o efeito positivo dessas variáveis na produção de MAG e DAG a partir dos substratos glicerol e óleo de soja. Os resultados dos principais efeitos das variáveis (Figura 13) permitiram observar que a temperatura apresentou efeito positivo e significativo ($p < 0,05$) sobre a conversão em MAG e DAG.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como substrato o óleo de soja em função das variáveis independentes temperatura, potência de ultrassom e agitação.



A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento DCC 2² com os valores codificados e reais, as respostas para a produção de MAG e DAG e as atividades enzimáticas finais de cada ensaio. O planejamento DCC 2² foi realizado como óleo de canola, mantendo-se constante a concentração de enzima (10% m/m) e razão molar (glicerol:óleo) (0,8:1) e a temperatura (70 °C), variando a potência do ultrassom e a agitação nas reações. Podemos observar nesta tabela que as conversões mais elevadas em MAG e DAG (~60%) foram obtidas nos ensaios 5,6 e 7,

que representam os pontos centrais, ou seja, os valores intermediários para as variáveis, agitação (600rpm) e potência de ultrassom (40%), confirmando o efeito positivo dessas variáveis na produção de MAG e DAG a partir dos substratos glicerol e óleo de canola.

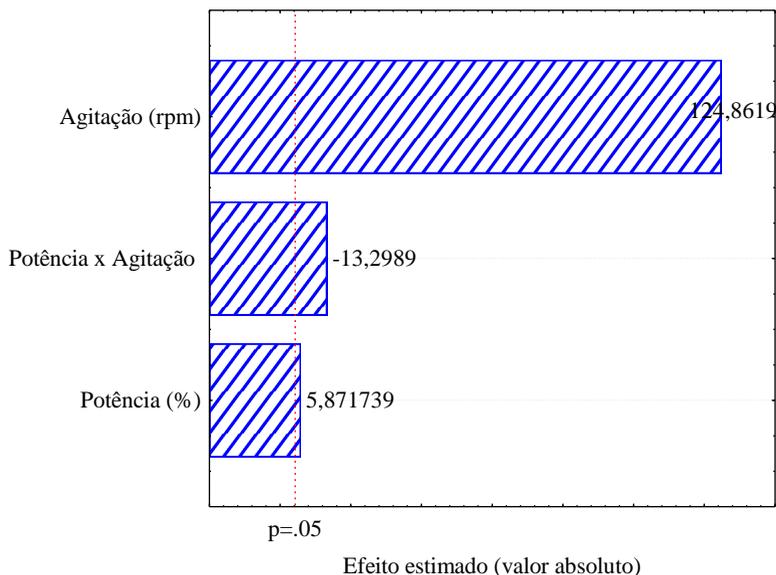
Tabela 9 - Matriz do planejamento de experimentos (valores reais e codificados) com resposta em termos de teor de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (%. m/m) para óleo de canola.

| Ensaio | Potência (%) | Agitação (rpm) | MAG (%.m/m) | DAG (%.m/m) | MAG+DAG (%, m/m) | Atividade residual (%) |
|--------|-----------------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|---------------------------|
| 1 | -1 (0) | -1 (0) | 1,31 | 3,22 | 4,53 | 64,85 |
| 2 | 1 (80) | -1 (0) | 2,40 | 7,06 | 9,46 | 70,33 |
| 3 | -1 (0) | 1 (1200) | 12,06 | 28 | 40,06 | 98,42 |
| 4 | 1 (80) | 1 (1200) | 13,0 | 25,15 | 38,15 | 102,50 |
| 5 | 0 (40) | 0 (600) | 21,60 | 39,05 | 60,65 | 72,69 |
| 6 | 0 (40) | 0 (600) | 24,38 | 36,06 | 60,44 | 95,95 |
| 7 | 0 (40) | 0 (600) | 18,92 | 41,65 | 60,57 | 77,88 |

*Atividade inicial da enzima= 38,52 U/g

A respostas do planejamento DCC 2² foram tratados estatisticamente e os principais efeitos das variáveis são apresentados na Figura 14, onde pode-se observar que a agitação e a potência, assim como a interação entre elas apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$).

Figura 14 - Gráfico de Pareto para a produção enzimática de mono- e diacilgliceróis utilizando como substrato o óleo de canola em função das variáveis independentes potência e agitação.



Em reações que envolvem o uso de glicerol, óleo e lipase imobilizada, um sistema trifásico é obtido, com uma fase oleosa hidrofóbica, uma fase hidrófila contendo o glicerol e uma fase sólida à qual a enzima é ligada (PAWONGRAT ET AL., 2007). Por isso, um obstáculo importante que tem de ser ultrapassado nestas reações é a baixa miscibilidade entre os substratos, óleo e glicerol (FELTES et al., 2012). A temperatura é uma importante ferramenta na melhoria da solubilidade desses substratos, que, além de bastante viscosos, são imiscíveis. Isto porque a alta temperatura pode aumentar as chances de colisão das moléculas do substrato e as enzimas, formando complexo enzima-substrato, levando a um aumento da atividade da enzima (ANTCZAK et al., 2009; ZHONG et al., 2010) e também porque, com o aumento da temperatura, a viscosidade dos fluidos diminui, aumentando assim a solubilidade dos mesmos, melhorando a difusão dos substratos, reduzindo as limitações de transferência de massa, acarretando o aumento da velocidade de reação, devido ao favorecimento das

interações entre as partículas de enzima e substratos (KRISTENSEN et al., 2005; KRÜGER, 2010; WANG et al., 2010b).

No entanto, a temperatura é um fator muito importante para a enzima, já que estes catalisadores dependem da temperatura, pois são facilmente desnaturadas. A enzima utilizada neste estudo, Novozym 435, tem sua faixa ideal de temperatura entre 40 e 70 °C (DAMSTRUP et al., 2006). Os melhores resultados para a produção de MAG e DAG, como pôde ser observado nas Tabelas 8 e 9, foram obtidos na temperatura de 70 °C. As atividades residuais das enzimas utilizadas com a temperatura de 70 °C (Tabela 8) quando se utilizou óleo de soja como substrato, não apresentaram grandes perdas de atividades, o que significa que a alta temperatura provavelmente não afetou a enzima, o que possibilita seu reuso, gerando menores custos de processo. Algumas atividades enzimáticas residuais, no entanto, merecem destaque, por, diferentemente do comportamento da maioria das enzimas, apresentarem aumento na atividade de esterificação em comparação à atividade inicial da enzima Novozym 435 (~38 U/g) (experimentos 4, 8 e 9, Tabela 8 e experimentos 1, 4, 8 e 9, Tabela 9). Algumas hipóteses para o aumento da atividade de algumas enzimas que sofrem tratamento ultrassônico é que pode ter ocorrido alguma mudança de conformação na estrutura ou suporte da enzima após o tratamento com ultrassom (FIAMETTI, 2012). De acordo com a literatura, uma onda ultrassônica, que é uma flutuação de pressão periódica, pode controlar as características da enzima alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica (HOSHINO et al., 2006). O uso do ultrassom é conhecido por perturbar interações fracas e para induzir mudanças conformacionais na estrutura da proteína (GEBICKA et al., 1997). Assim, os efeitos do ultrassom sobre a atividade enzimática incluem ativação e inativação, onde algumas literaturas trazem o foco na inativação de algumas enzimas por ultrassom (KADKHODAEI et al., 2008). No entanto, poucos autores relatam a ativação de algumas enzimas com o auxílio do ultrassom (LEE et al., 2008).

A redução da atividade enzimática nas reações que envolvem o uso de glicerol como substrato é provavelmente devido ao fato deste composto se aderir facilmente à superfície das enzimas, formando uma “camada” em torno do suporte da enzima e estas, durante a reação, acabam formando grandes aglomerados que prejudicam o contato com o outro substrato (óleo) para a formação dos produtos desejados (KRÜGER, 2010). Segundo Krüger (2010), o glicerol aderido na enzima tornava-se uma etapa crítica, pois a lavagem com hexano deve ser feita inúmeras vezes até conseguir a máxima remoção do glicerol aderido, o

mesmo foi observado em algumas enzimas desse estudo, principalmente quando a razão molar óleo:glicerol foi maior e quando o ensaio não utilizava agitação e/ou potência de ultrassom.

Assim, fica evidente que o excesso de glicerol pode se tornar um problema nas reações de glicerólise, já que se sabe que o glicerol é hidrofílico e insolúvel em lipídeos, sendo, desta forma, facilmente adsorvido na superfície da lipase imobilizada, resultando em um efeito negativo sobre a atividade da enzima e estabilidade da reação (KRÜGER, 2010). A irradiação de ultrassom provoca a cavitação, fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido (MIZUKOSHI et al., 1999; RASO et al., 1999). Quando bolhas da cavitação entram em colapso perto do limite de fase de dois líquidos imiscíveis, a onda de choque resultante pode proporcionar uma agitação muito eficiente, havendo uma mistura das camadas, aumentando a velocidade de reação em reações heterogêneas (YACHMENEV et al., 2004; YOSHIMOTO et al., 2005), evitando que o glicerol fique aderido à superfície da enzima.

A agitação mecânica é muito importante para a conversão das reações de glicerólise, além de ajudar a promover a miscibilidade dos substratos ela evita que a enzima fique retida no fundo do reator, onde ela tem contato direto com o glicerol (ZHONG et al., 2010). Porém, a agitação é um parâmetro a ser utilizado com cautela, pois, altas taxas de agitação podem danificar o suporte da enzima comercial ou acabar retirando a enzima imobilizada do seio da reação, caso o suporte seja lançado para as paredes do recipiente de reação, ou seja, sendo retirada da solução, diminuindo a capacidade catalítica (BABICZ et al., 2010a). Como pode se observar nas Tabelas 8 e 9 os melhores resultados foram obtidos com valores intermediários de agitação (900 rpm) e também de potência (40%).

Em relação à temperatura, de acordo com a Tabela 8, pode-se observar que o uso de temperatura de 80 °C conduziu rendimentos de MAG e DAG, semelhantes aos obtidos com 70 °C, porém pela questão da especificação da enzima (DAMSTRUP et al., 2006a) e do menor custo energético optou-se por trabalhar com a temperatura de 70 °C como a condição maximizada para as reações.

Com a análise dos resultados obtidos com o auxílio do planejamento Plackett & Burman e dos planejamentos sequenciais realizados, foi possível consolidar a primeira etapa do presente estudo, ou seja, a definição das condições maximizadas de produção dos emulsificantes monoacilgliceróis e diacilgliceróis, através de glicerólise enzimática de óleo de soja e canola em sistema livre de solvente, em

banho de ultrassom. De forma geral, para sintetizar, as condições maximizadas definidas para cada sistema foram: 70°C, razão molar dos substratos (glicerol:óleo) de 0,8:1 e concentração da enzima Novozym 435 de 10% (m/m), 40% de potência de ultrassom e agitação de 600 rpm. Elevadas conversões em MAGs+DAGs, cerca de 60% m/m, foram obtidas com óleo de soja nesta condições, com agitação de 900 rpm e 600rpm e também elevadas conversões 52% m/m, foram obtidos com 600rpm e 900rpm de agitação, respectivamente, para o óleo de canola. Com isso, foi possível dar continuidade ao estudo, através da investigação dos efeitos da potência do ultrassom e da agitação mecânica sobre a cinética de produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis para cada óleo estudado.

4.4 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE EM BANHO DE ULTRASSOM

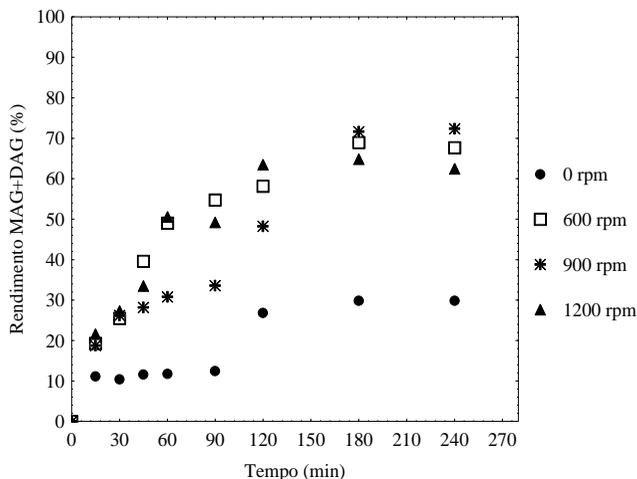
A partir das condições experimentais definidas anteriormente para cada sistema estudado, 70°C, razão molar dos substratos de 0,8:1 e 10% (m/m) de enzima, foram investigados, nesta etapa, os efeitos da potência do ultrassom e da agitação mecânica sobre a cinética de produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. O tempo definido para as realização das reações de glicerólise foi de 4h com amostragem destrutiva. As amostras foram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240min. Os resultados das cinéticas e suas velocidades iniciais de reação de formação de MAGs+DAGs são apresentados abaixo, sendo as velocidades iniciais de reação calculadas para os primeiros minutos de reação, os quais correspondem à faixa linear da curva.

Influência da agitação na cinética de produção enzimática de mono e diacilgliceróis em sistema livre de solvente em banho de ultrassom

Com o intuito de avaliar a influência da velocidade de agitação mecânica na conversão de MAG e DAG foram mantidas fixas as condições: temperatura 70°C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e potência do ultrassom de 100%, variando a agitação mecânica em 0, 600, 900 e 1200rpm, tornando possível a construção de curvas cinéticas experimentais de conversão total de MAG+DAG *versus* tempo de reação. Na Figura 15 podem ser observadas as curvas relacionadas à cinética da reação de glicerólise

enzimática de óleo de soja em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção.

Figura 15 - Avaliação cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de soja em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e potência do ultrassom de 100%).



A partir da Figura 15 verifica-se que os melhores resultados foram encontrados com a agitação de 600 e 900rpm, onde, com 180min de reação e velocidade de agitação de 900rpm, os rendimentos quanto a MAG+DAG foram de cerca de 72%. Utilizando 600rpm nesse mesmo tempo de reação, os rendimentos chegaram a 64% em MAG+DAG. Através da Tabela 10 pode-se verificar que, nessas condições, maiores velocidades iniciais foram obtidas: $0,947\text{min}^{-1}$ (900rpm) e $0,8558\text{min}^{-1}$ (600rpm), sendo a velocidade inicial de reação da curva com 900rpm a maior em comparação com as demais curvas com diferentes taxas de agitação para o óleo de soja. Analisando ainda a Figura 15, chama a atenção também que com a velocidade de agitação de 600rpm, em 45min de reação, o rendimento em teor de MAG e DAG atingiu cerca de 40%, um valor elevado em comparação com outras velocidades de agitação avaliadas, neste tempo. Este comportamento está coerente com os resultados obtidos nos planejamentos de experimentos, onde foi observado que taxas intermediárias de agitação conduziram à maior produção de mono e diacilgliceróis.

A curva obtida com a velocidade de agitação de 1200rpm (Figura 15) também apresentou valores satisfatórios de velocidade inicial de

reação ($0,88 \text{ min}^{-1}$) porém, ao longo do tempo, a conversão em MAG e DAG não apresentaram rendimentos consideráveis, em comparação com as demais taxas de agitação. Este resultado pode ter sido causado pela perda da atividade da enzima em função do período de exposição da enzima a alta velocidade de agitação, podendo ter ocasionado alguma mudança estrutural na enzima, devido ao alto valor de cisalhamento imposto a enzima, e ainda mais aliado a altos valores de sonicação (100%). Os menores valores de velocidade inicial de reação e a conversão da reação nos diferentes tempos estudados foram obtidos na condição experimental referente a não utilização de agitação (0rpm) ($0,74 \text{ min}^{-1}$). Estes valores não são considerados baixos comparados aos da literatura, porém nesta condição obteve-se baixos rendimentos com o decorrer do tempo de reação, isso sugere que provavelmente só a potência do ultrassom não é suficiente para a completa homogeneização do meio reacional, havendo assim diminuição no rendimento, já que os substratos são imiscíveis, o que limita bastante a condução da reação. Quanto aos valores de atividade residual apresentados na Tabela 10 pode-se observar que estas medidas, determinadas após 240 min de reação nas diferentes taxas de agitação avaliadas (0, 600, 900 e 1200rpm), apresentam valores significantes atividade.

Tabela 10 - Velocidades iniciais de reação e atividades residuais dos estudos cinéticos, após 4 horas de reação dos óleos de soja e canola à $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, razão molar de 0,8:1 (glicerol:óleo), 10% (m/m) de enzima e 100% potência ultrassônica.

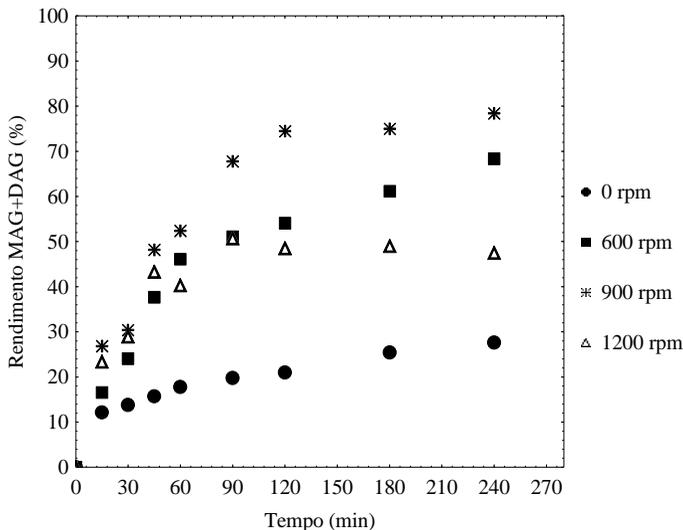
| Óleo | Agitação (rpm) | Atividade residual (%) | Velocidade inicial de reação (min^{-1}) |
|--------|----------------|------------------------|--|
| Soja | 0 | 78,43 | 0,7416 |
| | 600 | 93,17 | 0,8558 |
| | 900 | 77,72 | 0,947 |
| | 1200 | 53,94 | 0,8838 |
| Canola | 0 | 67,03 | 0,8045 |
| | 600 | 73,73 | 0,8093 |
| | 900 | 81,25 | 1,1425 |
| | 1200 | 89,37 | 1,086 |

*Atividade inicial = 38,52 U/g

Na Figura 16 podem ser observadas as curvas cinéticas da reação de glicerólise de óleo de canola em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção. Nela pode-se verificar que as maiores conversões em MAG+DAG, utilizando o óleo de canola como substrato, foram obtidas na condição com agitação de 900 rpm e 120 min de reação, cerca de 75% de rendimento, valores elevados, principalmente quando levado em conta o curto tempo de reação. Um fator relevante para melhores conversões com o óleo de canola em um curto tempo pode estar relacionado com sua composição, isto porque como já foi citado neste estudo, o óleo de canola é composto em sua maioria por triacilgliceróis monoinsaturados.

Observando a Tabela 10 pode-se também ressaltar as altas velocidades iniciais de reação no estudo cinético realizado com o óleo de canola, principalmente na melhor condição de velocidade de agitação de 900rpm ($1,1425\text{min}^{-1}$) e com a condição de 1200rpm ($1,086\text{min}^{-1}$). Altos rendimentos, cerca de 69%, também foram encontrados na condição de agitação de 600rpm em 240min de reação. As velocidade de agitação de 0 e 1200rpm assim como também ocorreu na cinética com óleo de soja, conduziram a rendimentos inferiores, o que condiz com os resultados obtidos nos planejamentos de experimentos com o óleo de canola, onde foi observado que velocidades intermediárias de agitação conduziram à maior produção de emulsificantes MAG e DAG, assim como quando utilizado o óleo de soja como substrato. Baseado nos elevados teores de MAG+DAG (75%) encontrados com nessa avaliação cinética com 900rpm, 100% de potência, 10% de enzima, razão molar 0,8:1 dos substratos e temperatura de 70°C , e também com alta velocidade inicial de reação ($1,1425\text{min}^{-1}$) e boa atividade residual da enzima (81%), como pode ser observado na Tabela 10, essa condição foi definida como a melhor condição para produção enzimática de emulsificantes utilizando óleo de canola como substrato em sistema livre de solvente em banho de ultrassom. Já para o sistema contendo óleo de soja, como não ficou bem elucidado nas etapas anteriores quais as melhores condições de produção de MAG e DAG, foi realizada uma avaliação cinética variando a potência do ultrassom.

Figura 16 - Avaliação cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de canola em função da agitação em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e potência do ultrassom de 100%).



Influência da potência do ultrassom na cinética de produção enzimática de mono e diacilgliceróis em sistema livre de solvente em banho de ultrassom

A fim de avaliar o efeito da potência do ultrassom na obtenção de MAG e DAG, foram mantidas fixas as condições: temperatura 70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e agitação mecânica em 600 rpm, variando a potência do ultrassom em 0, 40, 80 e 100%. Na Figura 18 podem ser observadas as curvas quanto à avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de soja em função da potência do ultrassom em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção.

Através da análise desta figura pode-se observar que após 90 minutos de reação e 40% de potência de ultrassom foram obtidos os maiores valores em conversão de MAG+DAG (65%). Além disso, essa condição apresentou alta velocidade inicial de reação ($1,06\text{min}^{-1}$) e bons valores de atividade residual da enzima, 76%, como pode ser observado na Tabela 12. Os altos rendimentos obtidos nas reações com irradiações,

comparados aos valores obtidos quando se trabalhou sem irradiação de ultrassom (0%), contribuem para a teoria de que a irradiação de ultrassom pode ser considerada uma ferramenta alternativa para a melhoria dos processos químicos, físicos e biológicos, particularmente em sistemas de reação altamente viscosos e não miscíveis (Löning, Horst e Hoffmann, 2002).

Figura 17 - Avaliação cinética da reação de glicerólise de óleo de soja em função da potência do ultrassom, em termos de conversão de MAG e DAG, na condição maximizada de produção (70 °C, razão molar dos substratos de 0,8:1, concentração de enzima 10% (m/m) e agitação mecânica em 600 rpm).

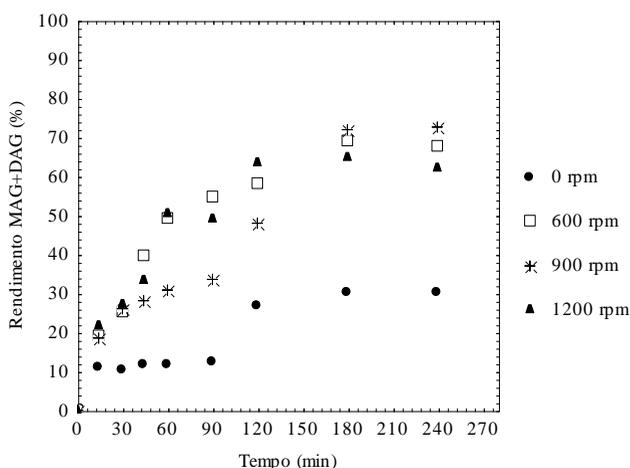


Tabela 11 - Atividades residuais dos estudos cinéticos, após 4 horas de reação de óleo de soja à 70 °C, razão molar de 0,8:1 (glicerol:óleo), 600 rpm e 10% (m/m) de enzima.

| Óleo | Potência (%) | Atividade residual (%) | Velocidade inicial (min ⁻¹) |
|------|--------------|------------------------|---|
| Soja | 0 | 64,15 | 0,9873 |
| | 40 | 76,01 | 1,0611 |
| | 80 | 91,61 | 1,066 |
| | 100 | 53,94 | 0,8998 |

*Atividade inicial = 38,52 U/g.

Alguns autores relataram que, em reações enzimáticas quando as enzimas são expostas a moderadas irradiações bons resultados foram obtidos. Batistella (2011) definiu como a condição experimental que conduziu a maior conversão em ésteres etílicos utilizando a enzima Novozym 435 (66,9%) o ensaio de maior temperatura (70°C) e concentração de enzima (20% (m/m)), em baixas concentrações de água (5%), razão molar (óleo/etanol) (1:3) e potência de ultrassom de 40% de 132W. Em outro sistema de reação constituído por glicerol e ácido ascórbico, Lerin (2010) obteve valores mais expressivos na produção de ascorbil palmitato (27%) em ultrassom, utilizando como catalisador a enzima Novozym 435 a 70°C, concentração de enzima de 5% em massa em 3h de reação.

Babicz et al. (2010) investigaram o efeito da irradiação por ultrassom com as características de hidrólise enzimática de óleo de soja em comparação com o método convencional de agitação mecânica para a produção de DAG, utilizando Lipozyme TL IM, 125W e frequência de 47kHz, sob agitação mecânica. Melhores rendimentos (cerca de 40% em massa de DAG) e os tempos de reação mais curtos (1,5h) foram obtidos com 1% (m/m) de enzima, mostrando que o uso de ultrassom pode ser eficaz para aumentar o rendimento de DAG, reduzindo o tempo de reação. Gonçalves et al. (2012) também obtiveram bons rendimentos na hidrólise de óleo de palma para a produção de DAGs, em curtos tempos de reação e condições brandas de irradiação ultrassônica, utilizando como catalisadores as lipases comerciais Lipozyme PS IM e Lipozyme TL IM.

Fiametti et al. (2011) avaliaram a glicerólise enzimática de óleo de oliva em sistema de ultrassom, os quais obtiveram teores elevados de produtos de MAG e DAG (~60 % m/m), especialmente MAG, na reação de glicerólise enzimática catalisada pela lipase Novozym 435 em ultrassom utilizando condições brandas de irradiação (~ 130 W) e de temperatura, em um tempo de reação relativamente curto (2 h) e baixo teor de enzimas (7,5 %, m/m), mostrando que a glicerólise enzimática em ultrassom pode ser uma via alternativa potencial para os métodos convencionais.

Comparando os resultados obtidos com 40% de potência com os rendimentos obtidos com 80 e 100% de potência, nota-se que estes últimos foram inferiores. Uma hipótese para esses resultados é o de que a exposição às ondas ultrassônicas por maiores períodos de tempo pode causar algum dano à enzima. Acredita-se que principalmente pela condição de potência com 100% ter menores rendimentos do que a com 80%, que possa ter ocorrido a perda de atividade de esterificação da

enzima pelo rompimento/desfragmentação do suporte da enzima (LERIN, 2010). Fiametti (2012) verificou que, quando a potência de irradiação é elevada, maior perda de atividade de esterificação da enzima Novozym 435 foi verificada, possivelmente devido ao contato direto entre as partículas de enzima e a sonda ultrassônica, o qual interfere, de certo modo, no rendimento da reação.

4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui apresentados representam alternativas na tecnologia de modificação de óleos, bem como no desenvolvimento de novas rotas de produção de mono e diacilgliceróis. Buscou-se neste capítulo estudar e avaliar as variáveis de produção e maximizar o processo de glicerólise enzimática. A utilização do ultrassom mostrou-se como uma rota potencial para a maior conversão dos produtos em um curto tempo de reação, onde os melhores resultados para ambos os óleos, soja e canola, foram obtidos em reações com sonicação. A agitação e a temperatura também foram parâmetros decisivos na maximização da produção dos compostos de interesse, confirmando assim, a baixa miscibilidade entre os substratos, óleo e glicerol, como a principal barreira para a produção dos emulsificantes. Foi interessante também observar as altas velocidades iniciais de reação observadas nos estudos cinéticos, assim como as altas atividades enzimáticas residuais alcançadas quando se trabalhou com agitações intermediárias (900 e 600 rpm) e com níveis de potência do ultrassom (40% a 100%).

Pode-se destacar os altos teores alcançados de MAGs+DAGs cerca de 75% m/m utilizando o óleo de canola como substrato, em 120 minutos de reação, 70 °C, 900 rpm, razão molar glicerol:óleo de 0,8:1, 100% de potência e 10% m/m de enzima. Já utilizando o óleo de soja os maior teores de MAGs+DAGs encontrados foram cerca de 65%, em 90 minutos de reação, 70 °C, 900 rpm, razão molar glicerol:óleo de 0,8:1, 40% de potência e 10% m/m de enzima. As concentrações alcançadas representam elevados valores de conversão de monoacilgliceróis e diacilgliceróis, em curtos espaços de tempos, o que representa avanços na produção destes compostos de grande interesse na indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e química.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 CONCLUSÕES

Primeiramente, com base nas análises feitas nos óleos de soja e canola comerciais refinados utilizados neste estudo, pode-se verificar que estes se encontram em excelente estado de conservação e dentro dos padrões nacionais para consumo humano.

No presente trabalho foi estudada a produção de emulsificantes mono e diacilgliceróis via glicerólise enzimática, utilizando como substrato os óleos de soja e de canola, em sistema livre de solvente e com ultrassom. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Quando utilizado o óleo de soja como substrato conteúdos apreciáveis de MAGs+DAGs 72% (m/m) foram obtidos com a temperatura de 70 °C, razão molar dos substratos, glicerol:óleo, de 0,8:1, com concentração de enzima relativamente baixa (10%, m/m), 600 rpm de agitação e 100% de potência de ultrassom, em 180 minutos de reação. Nas condições de 70 °C, 10% (m/m) de enzima, agitação de 900 rpm, relação molar glicerol:óleo de 0,8:1 e 40% de potência de ultrassom, no tempo de 90 minutos, concentração de MAGs + DAGs em torno de 65% (m/m).

- Quando utilizou-se o óleo de canola como substrato, altos rendimentos de MAGs+DAGs 75% (m/m) foram obtidos na condição de 70 °C, com razão molar dos substratos, glicerol:óleo, de 0,8:1, com concentração de enzima relativamente baixa (10%, m/m), 900 rpm de agitação e 100% de potência de ultrassom, em 120 minutos de reação.

De maneira geral, verificou-se que o uso do ultrassom nas reações de glicerólise enzimática dos óleos de soja e canola contribuiu, em termos de melhoria da eficiência do processo, diminuindo a resistência à transferência de massa no sistema glicerol/óleo/lipase imobilizada, para maximização da produção de MAGs e DAGs.

Sob um foco mais amplo, o presente estudo contribuiu para o melhor entendimento da reação da glicerólise enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom, utilizando como substratos óleos com altos valores nutricionais e menores custos de mercado, utilizando como meio o ultrassom, uma tecnologia considerada limpa e viável economicamente, trazendo assim novas perspectivas para a produção de emulsificantes com alto valor de mercado.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser delineadas:

- Avaliar o número de ciclos de utilização da lipase imobilizada Novozym 435 em modo batelada nas condições maximizadas das reações de glicerólise, sem perda de eficiência;

- Analisar a composição em ácidos graxos dos MAGs e DAGs produzidos nas condições maximizadas no planejamento experimental para as reações com os substratos óleo de soja e canola;

- Realizar a análise posicional dos isômeros formados, a saber, 1(3)-monoacilgliceróis, 2-monoacilgliceróis, 1,2(2,3)-diacilgliceróis, 1,3-diacilgliceróis, para ambos os óleos utilizados neste estudo;

- Avaliar a reação de glicerólise dos óleos de soja e canola utilizando outras lipases (livres ou imobilizadas) como catalisadores, com intuito de reduzir os custos do processo;

- Realizar a avaliação cinética com o óleo de canola variando a potência do ultrassom;

- Realizar a avaliação cinética variando a concentração de enzima, com os óleos de soja e canola;

- Estudar o escalonamento da produção de MAG e DAG via glicerólise enzimática, nas condições maximizadas de ambos os óleos estudados;

- Realizar a separação e purificação de MAGs e DAGs ao final da glicerólise enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3ed. CRC Press-Taylor & Francis Group, 2008.

ALAMBERT, M. R. **Estimação Estocástica De Parâmetros Produtivos Da Soja:Uso do modelo PPDSO em um estudo de caso em Piracicaba/SP**. 2010. Fundação Getulio Vargas. Escola de Economia de São Paulo. São Paulo.

ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. **Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process**. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185–1194, 2009.

ANTUNES, O. A. C. **Interfaces com a Indústria**. *Química Nova*, v. 28, p. 64-75, 2005.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; ALMEIDA FELIPE, M. G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n.26, dez. 2006/jan. 2007.

AWADALLAK, J. A. **Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: síntese de diacilglicerol**. 2012. (mestrado em Engenharia química). Departamento de Engenharia química, UNIOESTE, Toledo.

BABICZ, I., LEITE, S. G. F., SOUZA, R. O. M. A., & ANTUNES, O. A. C. Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 17(1), 4–6, 2010.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática De óleo de palma**. 2009. Mestrado em Ciências e Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Escola de Química da Universidade Federal do Rio De Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro.

BACKES, A. M. **Desenvolvimento de produto cárneo fermentado adicionado de óleo de canola**. 2011. (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, UFSM, Santa Maria.

Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 4. New York: John Wiley & Sons, 1979.

Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6. New York: John Wiley & Sons, 2005.

BAJAJ, A.; JOHAN, P.; JHA, PN.; MEHROTRA, R., Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p.9-14, 2010.

BARON, A.M. **Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais.** 2003. 113 f. (Mestrado em Química). UFPR, Curitiba, 2003.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. Ultra-som (I): influencia do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 14, n. 4, p. 302-316, 1992.

BASHARI, M.; EIBAIID A.; WANG J.; TIAN Y.; XU X.; JIN, Z. Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase, **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n.1 p.155-16, 2012.

BATISTA, E.; MONNERAT, S.; KATO, K.; Liquid-Liquid Equilibrium for Systems of Canola Oil, Oleic Acid, and Short – Chain Alcohols. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.44, n.6, p.1360 – 1364, 1999.

BATISTELLA, L. **Produção enzimática de biodiesel em solvente orgânico em banho de ultrassom.** 2011. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Engenharia de alimentos), URI, Erechim.

BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, E.; MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, p. 362-369, 2001.

BIESALKI, H. K.; GRIMM, P. **Nutrição: texto e atlas.** 1 edição. Porto Alegre: ARTMED, 2007.

BON, E. P. S.; PEREIRA, J.R., N.; ANTUNES, A. M. S.; MAIOR, A. M. S.; ABARZÚA, E. G. O.; PINTO, G. F.; SILVA JR., J. G.; ANTUNES, O. A. C. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIRJAN / SENAI, v. 1. p.113, 1999.

BOSLEY, J. A.; CASEY, J.; MACRAE, A. R.; MYCOCK, G. **Process for the esterification of carboxylic acids with tertiary alcohols using a lipase from *Candida antarctica***. PATENT, U. S. US Patent 5658769 1997.

BOYLE, E., Monoglycerides in Food Systems: Current e Future Uses. **Food Technology**, v. 51, n. 8, p. 52-59, ago. 1997.

BRASIL, L., DECRETOS, ETC. Resolução RDC n. 270 de 22 de setembro de 2005. 2005. Disponível em: < www.anvisa.gov.br >. Acesso em: 05 de março de 2013.

BUCHHOLZ, K. **Characterization of Immobilized Biocatalysts**. Weinheim:VCH, 1979.

CARR, R. A. Rapessed Canola. Ind: World Conference proceedings edible fats and oils processing: basic principles and modern practices. **Proceedings**. Champaing: American OCS, p. 289-298, 1990.

de CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quím. Nova**, 27, n.1, p.146-156, 2004.

CHATTERJEE, T., BHATTACHARYYA, D.K. Synthesis of terpene esters by an immobilized lipase in a solvent-free system, **Biotechnology Letters**, 20 (1998) 865–868.

CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, n.1, p. 71-80, 2007.

CHEONG, L.Z.; TAN, C.P.; LONG, K.; YUSSOF, M.S.A.; ARIFIN, N.; LO, S.K.; LAI, O.M. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipasecatalyzed partial hydrolysis: Optimization using

response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1614-1622, 2007.

CHEW, Y. H.; LEE, C. T.; SARMI, M. R.; AZIZ, R. A.; RAZALI, F. External mass transfer model for the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase. **Food and Bioproducts Processing**, 86, 267 – 282, 2008.

CHO, K.; HONG, J.; LEE, K. Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 99-107, 2010.

CLAUSS, J.; **Óleos & Grãos**. 1996, 5, 31.

CONAB a. Boletim de grão julho 2012. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

CONAB b. Safra canola julho 2011. Disponível em: <www.conab.gov.br/>. Acesso em 22 de novembro de 2012.

COSTA, J.A. **Cultura da Soja**. Porto Alegre. Evangraf. 233p., 1996.

CURI, R. ET AL. **Entendendo as gorduras: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 583 p., 2002.

DAI, G.; LI, J.; JIANG, L. Conformation change of glucose oxidase at the water-air interface, **Colloids and Surface B**, 13 , 2, p. 105–111, 1999.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 900 p., 2010.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DRAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. Production of heat-sensitive monoacylglycerols by enzymatic glycerolysis in *tert*-pentanol: Process Optimization by response surface methodology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 27-33, 2006.

DOSSAT, V., COMBES, D., MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil, **Enzyme and Microbial Technology**, 30, p. 90-94, 2002.

D'SOUZA, S.F. Immobilized enzymes in bioprocess. **Current Science**, v. 77, p. 69-79, 1999.

FARIA, A. A.; LELES, M. I. G.; ET. AL. Estudos da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA. Ecl. Quím., São Paulo, 2002.

FATEMI, S. H. AND HAMMOND, E. G. **Lipids**, 15, 379-385 (1980).

FELIZARDO, P. M. G., **Produção de Biodiesel a Partir de Óleos Usados de Fritura**. 2003. QUERCUS - Centro de Informação de Resíduos.

FELTES, M. M. C.; PITOL, L. O.; CORREIA, J. F. G.; GRIMALDI, R.; BLOCK, J. M.; NINOW, J.L. Incorporation of medium chain fatty acids into fish oil triglycerides by chemical and enzymatic interesterification. **Grasas y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 168-176, 2009.

FELTES, M. M. C. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe**. 2010, 223 p. (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

FELTES M. M. C., OLIVEIRA D., BLOCK J. M. & NINOW J. L. The Production, Benefits, and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest: review. **Food and Bioprocess Technology**, 2012.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A.C.; BAPTISTA, F.O.; 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, p. 699-711, 2001.

FIAMETTI, K. G. **Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de óleo de oliva na presença de surfactante**. 2008. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, URI, Erechim.

FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J. V. Kinetics of solvent-free lipase catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil in Aerosol-OT surfactant. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 2, p. 708-712, 2009.

FIAMETTI, K. G. **Desenvolvimento de técnicas alternativas para produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2012, 117 p. (Doutorado em Engenharia Química). Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis.

FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. Washington: 1999, 152p.

FLICKINGER, B.D.; MATSUO, N. Nutritional characteristics of DAG oil. **Lipids**, 38, p. 129–32, 2003.

FORDE, J.; Ó'FÁGÁIN, C. Immobilized enzymes as industrial biocatalysts. In: FLYNNE, W. G. (Ed.). **Biotechnology and Bioengineering**. New York: Nova Science Publishers, 2008. cap. 1, p.9-36.

FRANCISCHI, R.P.P.; PEREIRA, L.O.; FREITAS, C.S.; KLOPFER, M.; SANTOS, R.C.; VIEIRA, P.; LANCHÁ JUNIOR, A.H. Obesity: updated information about its etiology, morbidity and treatment. **Reviews in Nutrition**, 13(1):17-28, jan.-abr. 2000.

FREGOLENTE, L. V. **Obtenção de Monoglicerídeos de Alta Concentração através do Processo de Destilação Molecular**. 2006. (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas.

FREITAS, L. **Seleção de Rota Enzimática para Produção de Monoglicerídeos empregando Lipase Imobilizada em Matriz obtida pela Técnica Sol-Gel**. 2006. (Mestrado em Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; de CASTRO, H. F. Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, 31, n.6, p. 1514 – 1521, 2008.

GEBICKA, L.; GEKICKI, J. L. The effect of ultrasound on heme enzymes in aqueous solution. **Journal of Enzyme Inhibition**, 12 133–141, 1997.

GHAMGUI, H., KARRA-CHAABOUNI, M., GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system, **Enzyme and Microbial Technology**, 35, p. 355–363, 2004.

GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Application of lipase in kinetic resolution of racemates. **Chirality**, v.17, p.1-15, 2005.

GOLDBERG, I. (Ed.). **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Chapman & Hall 1994.

GOLDBECK, R. **Triagem, produção e avaliação da atividade da enzima lipase a partir de leveduras silvestres**. 2008. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). UNICAMP, Campinas.

GUISEPPI-ELIEA, S., CHOI, K., GECKELERA K., Ultrasonic processing of enzymes: effect on enzymatic activity of glucose oxidase, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 58, p.118–123, 2009.

GULSEREN, I.; GUZEY, D.; BRUCE, B.D.; WEISS J. **Ultrasonics Sonochemistry**, 14 173–183, 2007.

GUO, Z., & SUN, Y. Solvent-free production of 1,3-diglyceride of CLA: Strategy consideration and protocol design. **Food Chemistry**, 100, 1076–1084, 2007.

GUNSTONE, F. D. **Chemical proprieties. In: The Lipids Handbook.** 2nd Edition (F. D. Gunstone , J. L. Harwood, and Pandley, eds) Chapman & Hall, London, pp. 594-595, 1994.

GUTARRA, M.L.E.; CAVALCANTI, E.D.C.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. 2005. Lipase Production by solid-state fermentation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 121-124, p. 105-116, 2005.

HAMMOND, E. G.; GLATZ, B. A. **Food Biotechnology**; Kling, R. D.; Cheetham, P. S. J., eds.; Elsevier Publishers Limited, v. 2, p. 173-217, 1988.

HASAN, F.; SHAN, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASAN, F.; SHAH, A.A. ; HAMEED, A. **Biotechnology Advances**, 27, p. 782–798, 2009.

HASLER, C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges – A position paper from the American Council on science and health. **Journal of Nutrition**, 132, 12, p. 3772-3781, 2002.

HAUMANN, B. F. Tools: hydrogenation, interesterification. **Inform, Champaign**, v.5, p.668-678, 1994.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible Oil Analysis by High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Recent Advances and Future Perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, p. 499-506, 2003

H-KITTIKUN A.; PRASERTSAN, P.; SUNGPUD, C. Continuous production of fatty acids from palm olein by immobilized lipase in a two-phase system. **Journal of American Oil and Chemistry Society**, 77, p. 599 – 603, 2000.

HOSHINO, Y.; KAWASAKI, T.; OKAHATA, Y. Effect of ultrasound on DNA polymerase reactions: monitoring on a 27-MHz quartz crystal microbalance. **Biomacromoleculares**, v. 7, p. 682-685, 2006.

ILLANES, A. **Biotecnología de enzimas**. Ediciones Universitarias de Valparaíso de La Universidad Católica de Valparaíso, Chile, 1994.

ISEO. **Food fats and oils**. Nova York: Institute of Shortening and Edible Oils 2006.

JACKSON, M.A.; KING, J.W. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide, **J. Am. Oil Chem. Soc.** 74, 2, p. 103–106, 1997.

JAMBRAK, A.R., MASON, T.J., LELAS, V., HERCEG, Z., HERCEG, I.L. **Journal of Food Engineering**, 86. 81–287, 2008.

JIAN, S.; WENYI, T.; WUYONG, C. Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. **J. Clean Prod.** 16,p. 591–597, 2008.

JONES, J.B. Enzyme in organic synthesis. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 42, p. 3351-3403, 1986.

KADKHODAEI, R.; POVEY, M.J.W. Ultrasonic inactivation of *Bacillus a-amylase*. I. effect of gas content and emitting face of probe, **Ultrason. Sonochem.** 15, p. 133–142, 2008.

KAEWTHONG W.; H-KITTIKUN A., Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, 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**, 40, 1525 - 1530, 2005.

KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 375–380, 1997.

KAWASHIMA, H. et al. One-Year Ad Libitum Consumption of Diacylglycerol Oil as Part of a Regular Diet Results in Modest Weight Loss in Comparison with Consumption of a Triacylglycerol Control Oil

in Overweight Japanese Subjects. **Journal of the American Dietetic Association**, Japan, v. 108, n. 1, p. 57-66, 2008.

KENTISH, S., WOOSTER, T.J, ASHOKKUMAR, M., BALACHANDRAN, S., MAWSON, R., SIMONS, L. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, 9, 170–175, 2008.

KIRK, O; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C., Industrial Enzymes applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.345-351, 2002.

KLIBANOV, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents, **Nature**, 409, p. 241–246, 2001.

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**, v. 53, p. 7059-7064, 2005.

KROG, N. **Lipid Technologies and Applications**, Marcel Dekker, New York, USA, 1997.

KRÜGER, R. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2010. 131p. (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Enzymatic transesterification of *Jatropha* oil. **Biotechnology and Biofuels**, 2:1, Open Access, 2009.

LEE, S.H.; NGUYEN, H.M.; KOO, Y.M.; HA S.H. Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids, **Process Biochem.** 43,p. 1009–1012, 2008.

LEHNINGER, A.; NIELSON, D.L.; COX, M.M. **Bioquímica**, 3.ed. New York: Whoth Publisher, 1995. 1152p.

LERIN, L. A. **Produção enzimática de ascorbil palmitato em diferentes sistemas reacionais**. 2010. (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica, UFRJ, Rio de Janeiro.

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

LÓPES, F. D; REVILLA, J. L. G; MUNILLA, M. H. Glicerol. In: **Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melão, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, p. 393-397,1999.

LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. University of Missouri, Columbia 2004.

LIU, Y.; JIN, Q.; SHAN, L.; LIU, Y.; SHEN, W.; WANG, X. The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p. 402-407, 2008.

LI, C., YOSHIMOTO, M., OGATA, H., TSUKUDA, N., FUKUNAGA, K., NAKAO K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks, **Ultrasonics Sonochemistry**, 12, 373–384, 2005.

LO, S. K.; TAN, C.-P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A; LAI, O.-M. Diacylglycerol Oil—Properties, Processes and Products: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, p. 223-233, 2008.

LOTTI M & ALBERGHINA L. Lipases: Molecular Structure and Functions. In: Polaina J and MacCabe A P. **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. Dordrecht: Springer, 2007, 263-282.

MA, Y.Q., YE, HAO, Y.B. XU, G.N. XU, G.H. LIU, D.H. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15, p. 227–232, 2008.

MA, H., HUANG, L., JIA, J., HE, R., LUO, L., ZHU, W. Effect of energy-gathered ultrasound on alcalase, **Ultrasonics Sonochemistry**, 18, 419–424, 2011.

MACHADO, M. D.; PEREZ-PARIENTE, J.; SASTRE, E.; CARDOSO, D.; DE GUERENE, A. M.; **Applied Catalysis A**, 203, 321, 2000.

MACRAE, A. R. Lipase-catalyzed interesterification oil and fats. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 60, 2, p. 291-294, 1983.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Reviews**, 3, Intercept Ltd., 1985.

MAKI, K.C.; DAVIDSON, M.H.; TSUSHIMA, R.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; UMPOROWICZ, D.M.; DICKLIN, M.R.; FOSTER, G.S; INGTAM, K.A.; ANDERSON, B.D.; FROST S.D.; BELL, M. Consumption of diacylglycerol oil as a reducedenergy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil, **American Journal of Clinical Nutrition**, 76 1230–1236, 2002.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G. Jr.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fat and oils: a review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, p. 890-910, 1990.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas Fundação Cargill. 86 p., 1987.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados omega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p.761-770, 2006.

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

MATSUYAMA, T. et al. Effects of diacylglycerol oil on adiposity in obese children: initial communication. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 19, p. 795-804, 2006.

MASON, T.J. A general introduction to sonochemistry, in: T.J. Mason (Ed.), **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK, pp. 1–8, 1990.

MASON, T.J. Developments in ultrasound – non-medical. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 93, p. 166-175, 2007.

MURASE, T. et al. Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice: dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism. **Journal of Lipid Research**, Japan, v. 43, p. 1312–1319, 2002.

MATOS, L. M. C. **Hidrólise parcial do óleo de palma catalisada por lipases sob irradiação de micro-ondas. Síntese de diacilglicerol.** Dissertação de mestrado em Química do Instituto de química, UFRJ, Rio de Janeiro, 2010

MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F.; KING, J. W.; PALCIC, M. M. Kinetic modeling of glycerolysis reaction for soybean oils in supercritical carbon dioxide media. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 82, nº 8, p. 613 – 617, 2005.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos.** Ed. Varela, São Paulo, 1998.

MOSCHIDIS, M. C. PHOSPHONOLIPIDS. **Progress in Lipid Research**, 23, p. 223-246, 1985.

MOTA, C. J. A.; da SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, 32, p. 639 – 648, 2009.

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.W.; GUTSMAN M.R. A continuous process for the glycerolysis of soybean oil, **Journal of the American Oil Chemists Society**, 81, p. 203–207, 2004.

NOVOZYMES. **Novozymes Standard Method: Immobilised lipase activity based on ester synthesis (Propyl laurate units; PLU).** Novozymes, p.6p. 2004.

Novozym 435.Ficha de informação de produto. Novozymes, p.2p. 2010a.

Novozym 435, carrier and enzyme leakage studies. Novozymes, p.3p. 2010b.

O'BRIEN, R. D. *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. **Technomic Publishing** Company: Lancaster, 592 p., 1998.

OGAWA, H.; OKUSHIMA, S.; KODAMA, H. The Cooking Characteristics of Diacylglycerol rich Cooking Oil When Preparing Dishes. **Journal for the Integrated Study of Dietary Habits**, Japan, v. 12, n. 2, p. 100-108, 2001.

OLIVEIRA, L.G.; MANTOVANI, S.M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 1, p. 93-103, 2002.

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

PEIXOTO, E. C. D.; RODRIGUES, C. E. C.; MEIRELLES, A. J. A. Estudo do Equilíbrio Líquido-líquido do Sistema Óleo de Soja Refinado/Ácido Linoléico Comercial/Etanol Hidratado, a 25 C. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Unicamp, Campinas, 2005.

PERSSON, M., MLADENOSKA, I., WEHTJE, E., ADLERCEUTZ P. Perparation of lipases for use in organic solvents, **Enzyme and Microbial Technology**, 31, p. 833-841, 2002.

PIGHINELLI, A. L. M.; PARK K. J.; RAUEN A. M.; BEVILAQUA G.; GUILLAUMON FILHO, J. A. Otimização e prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa continua tipo expeller. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2011.

PIGOTT, G. M.; TUCKER, B. W. **Seafood: effects of technology on nutrition**. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 1990.

PINHEIRO, D.M. **Produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1992. 157 f. (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, 1992.

RASO, J.; MANAS, P.; PAGÁN, R.; SALA, F.J. Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 5, p. 157-162, 1999.

REDA, S. Y. **Estudo Comparativo de Óleos Vegetais Submetidos a Estresse Térmico**. 2004. Mestrado em Ciência de Alimentos. UEPG, Ponta Grossa.

RENDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E., Solvent Engineering Applied to Lipase-Catalized Glycerolysis of Triolein. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 78, n. 10, p. 1061 - 1066, 2001.

RODRIGUES, C. **Seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. (Doutorado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

ROMERO, M.D., CALVO, L., ALBA, C., DANESHFAR, A. A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane, **Journal of Biotechnology**, 127, 269–277, 2007.

ROSU, R., YASUI, M., IWASAKI, Y., & YAMANE, T. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 76, 839–843, 1999.

RUDKOWSKA, I. et al. Diacylglycerol: efficacy and mechanism of action of an antiobesity agent. **Obesity Research**, v. 13, p. 1864–1876, 2005.

SANTOS, J. S. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe meio com surfactante de grau alimentício**. 2010, 157 p. (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y.A.; Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research**, Pergamon, v.39 p.507-558, 2000.

SCHNEIDER, M.; ENGEL, N.; BOENSMANN, H. Enzymatische Synthesen chiraler Bausteine aus prochiralen Substraten: Herstellung von Malonsäuremonoalkylestern. **Angewandte Chemie**, v. 96, p. 54-55, 1984.

SCHERR, C.; RIBEIRO, J. P. Gorduras em Laticínios, Ovos, Margarinas e Óleos: Implicações para a Aterosclerose. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 95, n. 1, p. 55-60, 2010.

SHARMA R, CHISTI Y, BANERJEE U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**; 19: 627-662, 2001.

da SILVA, M. A. M.; MEDEIROS, V. C.; FREIRE, D. M. G.; LANGONE, M. A. P.; Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, Brasil, 2002.

SMANIOTTO, A. Produção e caracterização parcial de uma ‘lipase sintética’ produzida por uma nova cepa de *Sporobolomyces ruberrimus*. 2010. Departamento de Engenharia de Alimentos, URI, Erechim.

SONNTAG, N.O.V.; Glycerolysis of fats and methyl esters: status, review and critique, **Journal of the American Oil Chemists Society**, 59, p. 795A–802A, 1982.

SU, E.; WEI, D. Improvement in lipase-catalysed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 55, 118 – 125, 2008.

TADA, N. Physiological actions of diacylglycerol outcome. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 7, p. 145–149, 2004.

TAKENO, N.; SHIMOTOYODOME, A.; MEGURO, S. **Inhibitor of increase in postprandial blood insulin**. PATENT, U. S. USA: Kao Corporation. US 2009/0124691 A1 2009.

TEPELLI, F.; KING, J. W.; LIST, G. R. Conversion of oils to monoglycerides by glycerolysis in supercritical carbon dioxide media. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 73, 699 – 706, 1996.

TIAN, Z.M., WAN, M.X., WANG, S.P., KANG, J.Q. Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin, **Ultrasonics Sonochemistry**, 11, 399–404, 2004.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326-335, 1999.

TOMM, G. O. Canola: planta que traz muitos benefícios à saúde humana e cresce em importância no Brasil e no mundo. **A lavoura**, p. 46-47, 2007.

TOMM, G. O. A cultura de colza padrão canola no Brasil. **Óleos & Grãos**, n. 52, São Bernardo do Campo, 8 , p. 26-30, jan. 2000.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

VALÉRIO, A.; KRÜGER, R. L.; NINOW, J. L.; CORAZZA, F. C.; DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis of Olive Oil in Surfactant System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 8350 – 8356, 2009.

VALÉRIO, A.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; VLADIMIR, J. V. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 33, n. 7, p. 805-812, 2010.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and

molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308-317, 2003.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 515-536, 2007.

VOLL, J. C.; BRITO, M. N. Metabolismo e características nutricionais do óleo 1,3-diacilglicerol. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 121-126, 2010.

VULFSON, E.N., SARNEY, D.B, LAW, B.A. Enhancement of subtilisincatalyzed interesterification in organic solvents by ultrasound irradiation, **Enzyme Microbiol. Technol.** 13 123–126, 1991.

VULFSON, E.N. **In: Lipases: Their structure, biochemistry and Application:** WOOLEY, P.; PETERSEN, S.B. (eds.), Cambridge University Press: Great Britain, 1994.

WANG, Z.; LIN, L.; LI, P.; ZHANG, J.; WANG, S.; MA H. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment, **Bioresource Technology**, 117,p. 222–227, 2012.

WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; NAITO, S; TAGUCHI, H; GOTO, N.; NAGAO, T.; MATSUO, N.; TOKIMTSU, I.; YASUKAWA, T.; TSUSHIMA, R.; SHIMASAKI, H.; **fat-soluble vitamin status is not affected by diacilglicerol consumption**, Ann. Nutr. Metab.45, p. 259-264, 2001.

WEBER, N., & MUKHERJEE, K.-D. (2004). Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 5347–5353.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Fat intake and energybalance effects. **Physiology & Behavior**, v. 83, n. 4, p. 579– 585, 2004. 1312–1319, 2002.

WHITE, P. J.; O'BRIEN R. D.; FARR, W. E & WAN P. J. **Fats and Oils Technology**, 2nd ed., AOCS Press, Champaign, Illinois, 2000, pp. 341–353.

WU, J.C.; ZHANG, G.F.; HE, Z.M. Enhanced activity of *Candida rugosa* lipase modified by polyethylene glycol derivatives, **Biotechnol. Lett.** 23,p. 211–214, 2001.

XU, X. Biocatalysis for lipid modifications. In: DUNFORD, N. T. e DUNFORD, H. B. (Ed.). **Nutritionally enhanced edible oil and oilseed processing**. Champaign: AOCS Press, p. 239-263, 2004.

YACHMENEV, V.G.; BLANCHARD, E.J.; LAMBERT, A.H. Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton, **Ultrasonics**, 42 87–91, 2004.

YACHMENEV, V., BRIAN, C., THOMAS, K., ALLAN, L. Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound, **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, 3 25–31, 2009.

YAMADA, Y., SHIMIZU, M., SUGIURA, M., & YAMADA, N. **Process for producing diglycerides**. KAO CORP (JP) Ed. Patent WO9909119, (1999).

YANG, T., ZHANG, H., MU, H., SINCLAIR, A. J., & XU, X. Diacylglycerols from butterfat: Production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 81, 979–987, 2004.

YOSHIMOTO M.; LI, C.; OGATA H.; TSUKUDA, N.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K. Effects of ultrasonic intensity and reactor scale on kinetics of enzymatic saccharification of various waste papers in continuously irradiated stirred tanks, **Ultrason. Sonochem.** 12, p. 373–384, 2005.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M., The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017 – 8021, 1988.

ZHENG, Y.; QUAN, J.; NING, X.; ZHU, L-M.; JIANG, B.; HE, Z-Y. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 25, 41 – 46, 2009.

ZHONG, N.; LI, L.; XU L.; CHEONG X.; ZHAO, X.; LI B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Journal of Food Chemistry**, 122, 228–232 2010.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS

Neste capítulo são apresentados, para exemplificação, alguns cromatogramas obtidos no decorrer do estudo. A Figura 1A corresponde aos cromatogramas de monooleína, padrão de monoácilgliceróis utilizados neste estudo, com as concentrações de 1500mg/L e 500mg/L, respectivamente. A Figura 2A corresponde a cromatogramas de Dioléina, padrão de diacilgliceróis utilizados neste estudo, com as concentrações de 1500mg/L e 700mg/L, respectivamente.

Na figura 3A estão os cromatogramas correspondentes aos ensaios 4 e 5 do planejamento Plackett & Burman utilizando como substrato o óleo de soja. O ensaio 4 teve as seguintes condições: 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 0,8:1 e agitação de 600 rpm e potência de ultrassom de 40% ao longo das 3h de reação e o segundo cromatograma, ensaio 5, com as condições: 2,5% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e agitação de 600rpm e potência de ultrassom de 100% ao longo das 3h de reação . Ao final deste experimento obteve-se em torno de 32% (m/m) de MAG e 56% (m/m) de DAG para o ensaio 4 e 26% (m/m) de MAG e 49% (m/m) de DAG para o ensaio 5 (resultados em base livre de solvente e glicerol).

Na figura 4A estão os cromatogramas correspondentes aos ensaios 2 e 4 do planejamento Plackett & Burman utilizando como substrato o óleo de canola. O ensaio 2 teve as seguintes condições: 2,5% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e agitação de 600rpm e potência de ultrassom de 40% ao longo das 3h de reação e o segundo cromatograma, ensaio 4 com as condições: 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 0,8:1 e agitação de 600rpm e potência de ultrassom de 40% ao longo das 3h de reação. Ao final deste experimento obteve-se em torno de 7% (m/m) de MAG e 9% (m/m) de DAG para o ensaio 2 e 28% (m/m) de MAG e 24% (m/m) de DAG para o ensaio 4 (resultados em base livre de solvente e glicerol).

Figura 1A – Cromatogramas do padrão de monoacilgliceróis, monooleína, quantificados para a obtenção da curva padrão e verificação do tempo de retenção, com as concentrações de 1500mg/L e 500 mg/L.

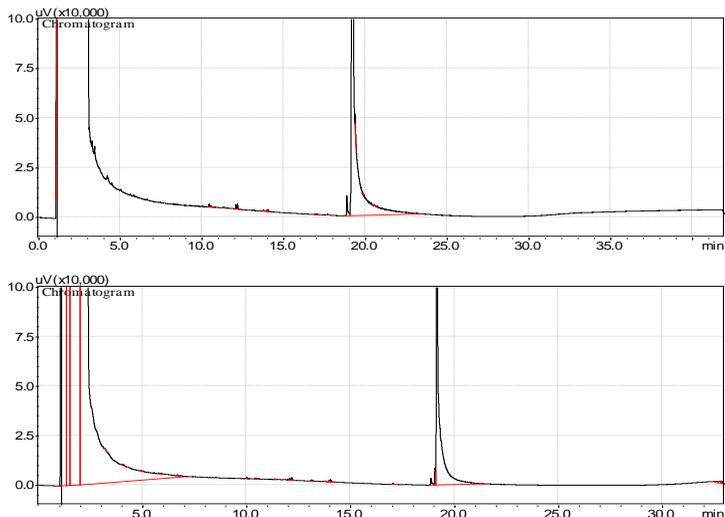


Figura 2A – Cromatogramas do padrão de diacilgliceróis, dioleína, quantificados para a obtenção da curva padrão e verificação do tempo de retenção, com as concentrações de 1500 mg/L e 700 mg/L.

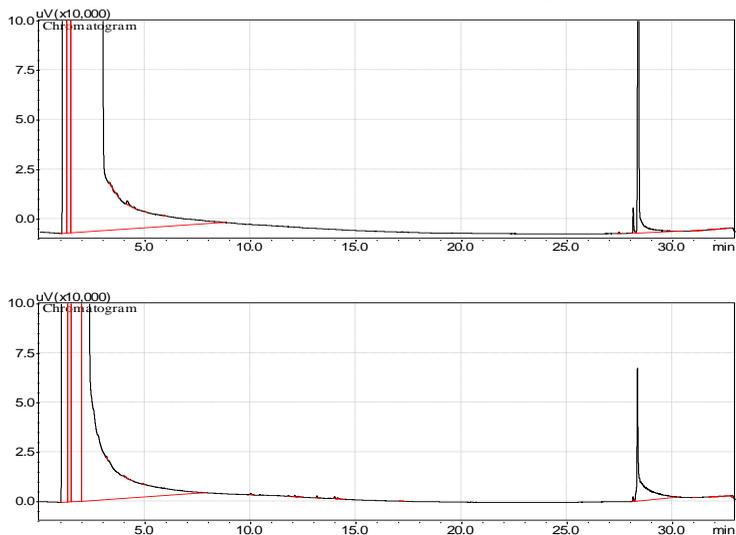


Figura 3A – Cromatogramas daos ensaios 4 e 5 referentes ao planejamento Plackett & Burman realizados nas reações de glicerólise enzimática utilizando em 3 horas de reação, em sistema livre de solvente, em ultrassom, utilizando o óleo de canol como substrato. Onde: as áreas entre 4,5 a 5,5 min. correspondem à região de glicerol, de 10,5 a 12,5 min. correspondem a região de ácidos graxos livres, de 12,5 a 24 min. correspondem a região de MAGs, de 23 a 30 min. correspondem a região de DAGs e de 32 a 40 min. correspondem a região de TAGs.

