

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS A PARTIR DA
GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA**

Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

ROBERTA LETÍCIA KRÜGER

**Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador - UFSC
Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza
Co-Orientador - UFPR**

Florianópolis/SC, 2010.

Dedico mais esta etapa de minha vida à duas pessoas que, pela sua simplicidade e pouco estudo, nunca entenderam o que é um Doutorado, mas sabiam que se tratava de algo bom, algo especial, e assim, por mim sempre torceram, sempre rezaram para que tudo desse certo... meus avós Joanna e Atílio Belin, que sempre estiveram ao meu lado, e continuam, só que agora, como anjos...

Agradecimentos

A Deus, por sempre me colocar entre as pessoas certas e na hora certa.

A minha família, em especial aos meus pais, Rudolfo e Naides, minha irmã Katiane e minhas tias Elizabeth e Rosemary pelo apoio sempre incondicional.

Ao meu orientador Marcos L. Corazza, por sua incansável motivação e por ser o principal responsável por este trabalho ter atingido seus objetivos.

Ao meu orientador Jorge L. Ninow, por todo o suporte, apoio e confiança repassada ao longo de todo o trabalho.

A Empresa Erechinense Instaladora Técnica Industrial Ltda – INTECNIAL, em especial ao Eng. Ari Baldus e Marcelo Cantele, pela confiança depositada e pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação de Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, por toda a estrutura e apoio disponibilizado durante o trabalho, em especial aos professores José Vladimir de Oliveira, Débora de Oliveira e Marco Di Luccio.

Ao Programa de Pós-graduação de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, pela oportunidade e pelo precioso conhecimento repassado.

A professora Fernanda de Castilhos, pela disposição, contribuições e amizade.

Ao colega Fernando Voll pelo empenho e contribuições na etapa de modelagem dos dados.

Ao meu “namorado” Érison Raimundo pelo constante incentivo e compreensão.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que fizeram destes últimos anos, tempos de verdadeiro companheirismo e alegrias, em especial a Clarissa Dalla Rosa, Elton Franceschi, Elisandra Rigo, Alexandra Valério, Manuela Balen, Melânia Sychoski, Karina Fiametti, Camila da Silva e Gustavo Borges.

À Universidade Paranaense – UNIPAR – Campus de Toledo, em especial à Coordenadora do Curso de Farmácia, Patrícia M. F. Dobliski, pelo apoio e incentivo.

As demais pessoas que de alguma forma compartilharam comigo os desafios desta etapa, e as quais os nomes não estão escritos nesta página, mas tem suas marcas eternizadas em meu coração.

"Podemos escolher em recuar em direção à segurança
ou avançar em direção ao crescimento...
A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes,
e o medo tem que ser superado a todo a cada momento."

Abraham Maslow

Resumo da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS A PARTIR DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA

Roberta Letícia Krüger

Setembro/2010

Orientadores: Jorge L. Ninow
Marcos L. Corazza

Este trabalho apresenta dados experimentais referentes à glicerólise de óleo de oliva usando a enzima Novozym 435 em sistema com solvente orgânico *tert*-butanol na produção de monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs). Os experimentos foram desenvolvidos em sistema batelada para o estudo das cinéticas das reações e avaliação dos efeitos da temperatura (40 a 70°C), concentração de enzima imobilizada (2,5 a 15%, m/m, em relação aos substratos), relação molar de glicerol:óleo (0,33:1; 0,8:1; 3:1; 6:1 e 9:1) e relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 e 5:1 (v/v). Os resultados mostraram que a glicerólise catalisada por lipase em meio com *tert*-butanol pode ser uma potencial rota para a produção de altos conteúdos de MAGs e DAGs. Os resultados também mostraram que é possível maximizar a produção de MAGs e/ou DAGs, dependendo da relação molar de glicerol:óleo utilizada no sistema reacional. Altos conteúdos de MAGs (~73% m/m) e DAGs (~56% m/m) foram obtidos usando relação molar de glicerol:óleo de 9:1 e 0,8:1, e concentrações de enzima de 15 e 10% (m/m), respectivamente, ambos em 12 horas de reação a 55°C e 600 rpm. Os maiores conteúdos da mistura de MAGs + DAGs (~89% m/m) foram obtidos utilizando relação molar de glicerol:óleo de 6:1, a 70°C, 600

rpm e concentração de enzima de 10% (m/m). Este trabalho também apresenta um estudo de modelagem matemática dos dados experimentais. Reações paralelas de glicerólise e hidrólise foram consideradas para estimar as constantes da velocidade por minimização da função objetivo. De um modo geral, correlações satisfatórias foram obtidas entre os dados experimentais e os modelos propostos, obtendo-se assim, um melhor entendimento da cinética da reação. A única condição que não apresentou boa correlação dos dados experimentais com o modelo foi o uso da relação molar de glicerol:óleo de 9:1. Isto aconteceu, provavelmente, pelos diversos fenômenos que envolvem o uso do excesso de glicerol em reações enzimáticas.

Abstract of Thesis presented to Chemistry Engineering and Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor in Food Engineering.

PRODUCTION OF MONO AND DIACYLGLYCEROLS FROM ENZYMATIC GLYCEROLYSIS OF OLIVE OIL

Roberta Leticia Krüger

September/2010

Advisors: Jorge L. Ninow
Marcos L. Corazza

This work reports experimental data regarding the glycerolysis of olive oil using Novozym 435 in tert-butanol organic system aiming at the production of monoacylglycerols (MAGs) and diacylglycerols (DAGs). Experiments were performed in batch mode, recording the reaction kinetics and evaluating the effects of temperature (40 to 70°C), immobilized enzyme concentration (2.5 to 15wt%), glycerol:oil molar ratio (0.33:1; 0.8:1; 3:1; 6:1 and 9:1) and using tert-butanol:oil/glycerol volume ratio of 1:1 and 5:1 (v/v). Experimental results showed that lipase-catalyzed glycerolysis in tert-butanol might be a potential route for the production of high contents of MAGs and DAGs. Results also showed that it is possible to maximize the production of MAGs and/or DAGs, depending on the glycerol to oil molar ratio employed in the reactional system. Higher contents of MAGs (~73wt%) and DAGs (~56wt%) were achieved using glycerol to oil molar ratio of 9:1 and 0.8:1, and enzyme concentration of 15 and 10wt%, respectively, both in 12 hours of reaction at 55°C and 600 rpm. Higher contents of the mixture of MAGs + DAGs (~ 89% wt%) were achieved using glycerol to oil molar ratio of 6:1, at 70°C, 600 rpm, enzyme concentration of 10% (wt%). This work also reports the kinetic modeling of experimental data. The glycerolysis and hydrolysis parallel reactions were considered with rate constants estimated by minimizing a maximum likelihood

function. In general, a satisfactory agreement between experimental data and model results was obtained, thus allowing a better understanding of the reaction kinetics. The condition that did not present a good correlation between the experimental data and the proposed kinetic model was the relationship molar glycerol:oil of 9:1. This occurred, probably, because the several phenomena involved in the use of excess glycerol in enzymatic reactions.

SUMÁRIO

	página
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
Sumário.....	x
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Abreviações.....	xxiii

Capítulo 1

1	Introdução.....	1
---	-----------------	---

Capítulo 2

2	Revisão Bibliográfica.....	4
2.1	Limites atuais da tecnologia de modificação de óleos e gorduras.....	4
2.2	Azeite de Oliva.....	6
2.3	Glicerol.....	7
2.4	Monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos.....	8
2.5	Glicerólise de óleos vegetais.....	10
2.6	Lipases como catalisadores.....	20
2.7	Glicerólise enzimática de óleos vegetais.....	21
2.8	Solvente orgânico.....	23
2.9	Cinética de reações enzimáticas.....	24
2.10	Modelagem matemática de reações de glicerólise.....	26
2.11	Considerações parciais.....	30

Capítulo 3

3	Material e Métodos.....	32
3.1	Material.....	32
3.2	Investigação e desenvolvimento de metodologia para análise de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs.....	33
3.2.1	Condições cromatográficas.....	33

3.2.2	Preparação e análise das soluções de calibração.....	33
3.2.3	Validação das curvas de calibração	35
3.3	Descrição do aparato e procedimento experimental utilizado nas reações de glicerólise enzimática em batelada.....	35
3.4	Preparação e análise das amostras	37
3.5	Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico.....	37
3.6	Determinação das velocidades iniciais	38
3.7	Determinação da atividade enzimática residual.....	40
3.8	Determinação do teor de água.....	41
3.9	Modelagem matemática da reação de glicerólise.....	42

Capítulo 4

4	Resultados e Discussão.....	44
4.1	Investigação e desenvolvimento de metodologia para análise de MAGs, DAGs, TAGs e ácidos graxos livres.....	44
4.1.1	Preparação e análise das soluções de calibração.....	44
4.1.2	Validação das curvas padrões.....	48
4.2	Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico.....	48
4.2.1	Influência da concentração de enzima imobilizada no meio reacional.....	51
4.2.2	Influência da temperatura da reação	52
4.2.3	Influência da relação molar glicerol:óleo.....	55
4.2.4	Influência da relação volumétrica de solvente:substratos (glicerol e óleo).....	56
4.2.5	Determinação do erro experimental.....	60
4.3	Medidas da atividade enzimática	61
4.3.1	Influência da temperatura e relação molar glicerol:óleo	61
4.3.2	Influência da concentração de solvente orgânico terc-butanol no meio reacional.....	63
4.4	Determinação do teor de água.....	64
4.5	Modelagem matemática	65

4.5.1	Mecanismo cinético 1	65
4.5.1.1	Modelagem matemática de dados da literatura.....	67
4.5.1.2	Modelagem matemática da reação de glicerólise enzimática na presença de solvente terc-butanol.....	73
4.5.2	Mecanismo cinético 2	83
4.6	Considerações finais	89
Capítulo 5		
5	Conclusões	91
5.1	Sugestões para trabalhos futuros.....	92
Capítulo 6		
6	Referências Bibliográficas	94
Capítulo 7		
7	Produção científica.....	104
7.1	Artigo completo publicado em periódico.....	104
7.2	Artigo aceito para publicação.....	104
7.3	Artigo submetido.....	104
7.4	Trabalhos apresentados em Congressos.....	104
APÊNDICE A – Cromatogramas.....		105
APÊNDICE B – Detalhamento dos resultados do estudo cinético..		108
ANEXO 1 – Modelagem matemática utilizando a abordagem do mecanismo cinético 2.....		123

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 – Estrutura genérica de um TAG.....	7
Figura 2.2 – Estrutura de uma molécula de glicerol.....	8
Figura 2.3 – Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.....	11
Figura 2.4 – Tratamento da cinética de reações enzimáticas utilizando esquema de Cleland. a) ping-pong bi bi; b) sequencial ordenado bi bi; c) sequencial randômico bi bi.....	26
Figura 3.1 – Vista da unidade experimental para produção enzimática de MAGs e DAGs via glicerólise enzimática. Onde: a) reator encamisado; b) banho termostático e c) agitador mecânico com controle de velocidade.....	36
Figura 3.2 – Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática. Onde: a) reator encamisado; b) banho termostático e c) agitador magnético.	40
Figura 4.1 – Curva padrão para determinação por cromatografia da monooleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.....	45
Figura 4.2 – Curva padrão para determinação por cromatografia da dioleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.....	45
Figura 4.3 – Curva padrão para determinação por cromatografia da trioleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.....	46
Figura 4.4 - Curva padrão para determinação por cromatografia do ácido oléico. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.....	46

Figura 4.5 - Perfis obtidos por cromatografia gasosa típicos da análise de reações de glicerólise. a) tempo zero de reação. b) tempo de reação: 8h.....	47
Figura 4.6 - Cinética da reação de glicerólise sem adição de enzima. Condições: 70°C, relação molar G:O de 3:1 e 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.....	51
Figura 4.7 - Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 70°C, relação molar G:O de 3:1, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Concentração de enzima imobilizada Novozym 435 em relação a mistura glicerol e óleo (m/m): (a) 2,5%, (b) 10% e (c) 15%. Resultados em base livre de solvente e glicerol	53
Figura 4.8 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas com relação molar G:O de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Temperatura de reação: (a) 70°C, (b) 55°C e (c) 40°C. Resultados em base livre de solvente e glicerol	54
Figura 4.9 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Relação molar de G:O: (a) 3:1, (b) 6:1 e (c) 9:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol.....	57
Figura 4.10 – (a) Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 70°C, 2,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, relação molar G:O de 3:1. (b) Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 55°C, 2,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, relação molar G:O de 9:1. Linhas contínuas (1): relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Linhas pontilhadas (2): relação solvente:mistura glicerol e óleo de 5:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.	58
Figura 4.11 – Cinética da reação de glicerólise enzimática realizada em triplicata para avaliação do erro experimental. Condições utilizadas: 40°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada	

Novozym 435, relação molar G:O de 9:1, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.61

Figura 4.12 – Medida das atividades enzimáticas residuais ao longo da glicerólise enzimática de óleo de oliva. Onde: Condição A: 70°C e relação molar G:O de 9:1; Condição B: 70°C e relação molar G:O de 0,8:1; Condição C: 40°C e relação molar G:O de 9:1; Condição D: 40°C e relação molar G:O de 0,8:1.62

Figura 4.13 – Medida das atividades enzimáticas residuais ao longo da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva. Onde: Condição E: relação volumétrica solvente:mistura de 1:1 (v/v) e Condição F: relação volumétrica solvente:mistura de 5:1 (v/v).....64

Figura 4.14 – Curvas cinéticas obtidas pelos dados experimentais e pelo modelo para a reação de glicerólise enzimática com relação molar glicerol:óleo de 4,5:1: (a) sem solvente e sem adição de água, 40°C e 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos, (b) sem solvente e com adição de 2,6% de água (no glicerol), 40°C e 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos e (c) com solvente (relação molar de solvente:óleo de 2:1), 45°C e 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.469

Figura 4.15 – Simulação da reação de glicerólise enzimática a 45°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, relação molar G:O de 0,8:1 e relação de solvente em óleo de 2:1 (v/v), utilizando o modelo empregado neste trabalho. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.470

Figura 4.16 – Cinética da reação de glicerólise enzimática sem solvente no meio reacional. Condições: 55°C, relação molar G:O de 3:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e 600 rpm. Resultados em base livre de glicerol.....71

Figura 4.17 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1

(v/v). Relação molar G:O: (a) 0,8:1 e (b) 0,33:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol.72

Figura 4.18 – Avaliação da ordem de reação dos coeficientes de desativação enzimática (n e q). Condições enzimáticas: 55°C, relação molar glicerol:óleo de 9:1, 10% (m/m) de enzima.....75

Figura 4.19 – Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Relação molar G:O: (a) 3:1; (b) 6:1; (c) 9:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.....78

Figura 4.20 - Modelo e dados experimentais do efeito da concentração de glicerol na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 9:1, 40°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.....79

Figura 4.21 - Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Relação molar G:O: (a) 0,8:1; (b) 0,33:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.....80

Figura 4.22 - Modelo e dados experimentais do efeito da temperatura na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 40°C; (b) 55°C; (c) 70°C. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.....81

Figura 4.23 - Modelo e dados experimentais do efeito da concentração de enzima na reação de glicerólise de óleo de oliva

na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1, 70°C e agitação de 600 rpm. Concentração de enzima imobilizada Novozym 435 (m/m): (a) 2,5%; (b) 10%; (c) 15%. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.....82

Figura 4.24 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 3:1; (b) 6:1. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).....84

Figura 4.25 - Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da relação de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 6:1; (b) 0,8:1; (c) 033:1. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).86

Figura 4.26 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da temperatura na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar glicerol:óleo de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 40°C; (b) 55°C; (c) 70°C. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).....87

Figura 4.27 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da concentração de enzima imobilizada Novozym 435 (m/m) na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar glicerol:óleo de 6:1, 70°C e agitação de 600 rpm. (a) 2,5%; (b) 10%; (c) 15%.

Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).....88

Figura 1A – Cromatogramas da cinética da reação de glicerólise enzimática utilizando solvente *tert*-butanol, 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e relação volumétrica de solvente:mistura de 1:1 (v/v). Tempo de reação: (a) zero; (b) 30 min; (c) 1h; (d) 2h; (e) 4h; (f) 8h e (g) 12h. Onde: as áreas entre 4,5 a 5,5 min. correspondem a região de glicerol, de 10,5 a 12,5 min. correspondem a região de ácidos graxos livres, de 15 a 19 min. correspondem a região de MAGs, de 23 a 28 min. correspondem a região de DAGs e de 30 a 35 min. correspondem a região de TAGs.....107

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 – Alguns dos principais estudos sobre glicerólise encontrados na literatura	14
Tabela 3.1 – Preparação das soluções de calibração dos glicérides	34
Tabela 3.2 – Preparação das soluções de calibração para ácido graxo livre	34
Tabela 3.3 – Condições utilizadas nas reações de glicerólise com solvente orgânico <i>tert</i> -butanol. Agitação mecânica de 600 rpm.....	39
Tabela 4.1 - Concentrações das amostras sintéticas e resultados obtidos por análise em cromatografia gasosa para validação das curvas de calibração, com os respectivos erros seguidos, entre parênteses, pelos desvios padrões	49
Tabela 4.2 – Velocidades iniciais das cinéticas estudadas em relação à formação de MAGs e DAGs e ao consumo de TAGs. Valores para uma base de cálculo de 100 g de substratos.....	50
Tabela 4.3 - Teor inicial de água determinado nos substratos da reação de glicerólise. Os resultados representam a média seguida pelo desvio padrão entre parênteses	65
Tabela 4.4 – Constantes cinéticas obtidas a partir da modelagem cinética utilizando os dados de Yang <i>et al.</i> (2005a).....	68
Tabela 4.5 – Constantes cinéticas obtidas na modelagem dos dados experimentais utilizando a abordagem do mecanismo cinético 1.	76
Tabela 4.6 – Parâmetros estimados pelo modelo cinético (Equação de redução de atividade enzimática)	76

Tabela B.1 – Resultados da cinética sem enzima. Condições: 70°C, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.6).....	109
Tabela B.2 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 2,5% de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7a).....	109
Tabela B.3 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7b).....	110
Tabela B.4 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 15% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7c).....	111
Tabela B.5 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8a).....	112
Tabela B.6 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8b).....	113
Tabela B.7 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8c).....	114
Tabela B.8 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9a).....	115
Tabela B.9 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9b).....	116

Tabela B.10 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9c).....	117
Tabela B.11 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 2,5% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 5:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10a).....	118
Tabela B.12 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 2,5% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10b).....	118
Tabela B.13 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 2,5% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 5:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10b).....	119
Tabela B.14 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 1).....	119
Tabela B.15 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 2).....	120
Tabela B.16 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 3).....	120
Tabela B.17 – Resultados da cinética sem solvente. Condições: 55°C, 15% (m/m) de enzima e relação molar G:O de 3:1 (Referente a Figura 4.17)	121
Tabela B.18 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 0,8:1 e relação	

solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.18a).....121

Tabela B.19 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 0,33:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.18b)122

LISTA DE ABREVIACÕES

AGL – Ácido Graxo livre
AOT - (bis (2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio)
DAG – Diglicerídeo ou diacilglicerol
E – Enzima
Eq. - Equação
E_T – Enzima total
EC – *Enzyme Commission*
FA – ácido graxo livre
Gly – Glicerol
G:O – Glicerol:óleo
GRAS – *Generally Recognized As Safe*
Log *P* – Logaritmo do coeficiente de partição
k_i - K_i*[E_T]
K_i – Constante cinética de velocidade
MAG – Monoglicerídeo ou monoacilglicerol
MSTFA - N-methy-N-trimethyltrifluoroacetamide
OMS – Organização Mundial da Saúde
TAG – Triglicerídeo ou triacilglicerol
Terc – Terciário

- CAPÍTULO 1 -

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem surgido um grande interesse nas áreas da química e da biotecnologia visando obter novos produtos a partir de óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato de que oleoquímicos são derivados de recursos renováveis (óleos vegetais e gordura animal) (Schmid, 1987; Damstrup *et al.*, 2006a). Adicionalmente, o uso de enzimas para modificar a estrutura e a composição de óleos e gorduras vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, caracterizando-se em avanços significativos na área de biotransformação (Rendón *et al.*, 2001). É neste contexto que surge o uso de monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs) na indústria alimentícia e farmacêutica. Estes glicerídeos são os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como estabilizantes de emulsões) e farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) (Boyle e German, 1996; Flack, 1970; Bornsceuer, 1995). Além disso, os DAGs têm grande aplicação como aditivo funcional em alimentos, trazendo benefícios para saúde, tal como, a redução da gordura abdominal visceral (Cheong *et al.*, 2007).

Atualmente, a produção de MAGs e DAGs em escala industrial é realizada pela reação de glicerólise (transesterificação) a partir de glicerol e triacilgliceróis (TAGs) de óleos vegetais, empregando-se altas temperaturas (acima de 240°C) e catalisadores químicos. Os rendimentos obtidos são relativamente baixos e os produtos são geralmente de baixa qualidade (Boyle, 1997). Em geral, o produto final torna-se de cor escura e de odor desagradável, decorrentes da formação de produtos indesejáveis obtidos devido às reações de polimerização (Fregolente, 2006).

Por outro lado, os processos enzimáticos destacam-se pelos benefícios obtidos, pois utilizam baixas temperaturas de operação (40 – 70°C) e empregam, como catalisadores, lipases específicas aos produtos que se deseja (no caso, MAGs e DAGs) e o emprego de gorduras hidrogenadas não se faz necessário por não haver subprodutos de

polimerização (Fregolente *et al.*, 2009). Dependendo da metodologia e da enzima aplicadas pode-se garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas a ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida ocorrência de subprodutos (Koblitz, 2003).

A produção destes emulsificantes através da reação de glicerólise é também de grande interesse econômico e tecnológico por haver a possibilidade de se utilizar como um dos substratos o glicerol resultante do processamento de biodiesel, dando a este subproduto novas aplicações e novos mercados, o que consequentemente tornaria ainda mais interessante a produção destes biocombustíveis (Felizardo, 2003). O glicerol, devido à combinação das suas propriedades físicas e químicas, apresenta uma ampla variedade de aplicações e o fato de ser atóxico, incolor e inodoro são aspectos apreciados pela indústria de alimentos.

A glicerólise consiste na reação de um mol de TAG 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 MAG (Fregolente, 2006).

Um dos fatores primordiais para viabilidade da reação de produção de MAGs e DAGs reside no fato de que o glicerol deve estar disperso no óleo. Devido à natureza polar do glicerol e apolar dos óleos vegetais, tais compostos apresentam miscibilidade mútua bastante limitada (Kaewthong e H-Kittikun, 2004). Uma alternativa para dispersar o glicerol no óleo é utilizar uma molécula com características polares e apolares, substância esta que pode ser um solvente orgânico. Um meio reacional com um solvente satisfatório melhora a miscibilidade entre os substratos e resulta em um sistema mais homogêneo, com menor resistência à transferência de massa (Pawongrat *et al.*, 2007).

A partir do contexto acima exposto, o objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo cinético da glicerólise de óleo de oliva catalisada por uma lipase imobilizada comercial em meio com solvente orgânico e tratar matematicamente os dados experimentais, buscando a melhor compreensão possível das etapas que envolvem esta reação para que seja possível direcionar e maximizar o(s) produto(s) de interesse, de acordo com as condições reacionais pré-estabelecidas.

Por sua vez, os objetivos específicos envolvem:

- Investigação e desenvolvimento de metodologia para análise de MAGs, DAGs, TAGs e ácidos graxos livres.
- Estudo do efeito das variáveis do processo (temperatura, agitação, concentração de enzima, de substratos e de solvente)
- Estudos de casos da literatura para avaliação do uso das ferramentas para modelagem e simulação de processos, no caso utilizando rotinas do programa MATLAB.
- Otimização da produção de MAGs e DAGs utilizando concentrações mínimas de enzima e solvente orgânico.
- Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico.
- Medidas de perda de atividade da enzima ao longo da reação.
- Modelagem matemática da cinética dos dados experimentais sem considerar a influencia da presença da enzima no meio reacional.
- Comparar a modelagem desenvolvida com uma modelagem matemática dos mesmos dados que leva em conta a influencia da presença da enzima no meio.

- CAPÍTULO 2 -

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O setor industrial oleoquímico tem apresentado interesse permanente em desenvolver técnicas capazes de modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e organolépticas das matérias-primas oleosas, ampliando, desta forma, a possibilidade de aplicação de seus produtos. Tal interesse aplica-se também para a indústria de biocombustíveis, em especial ao biodiesel, que tem como subproduto do processo o glicerol, para o qual também se busca aplicações alternativas. O potencial da biotecnologia para o desenvolvimento de novas rotas de processos visando à obtenção de produtos conhecidos e/ou novos a custos mais competitivos vem ao encontro da necessidade destes setores em alcançar suas metas de expansão.

Este capítulo tem por finalidade reunir informações sobre reações de glicerólise para obtenção de MAGs e DAGs, por via enzimática e com solvente orgânico, bem como informações pertinentes sobre os mecanismos cinéticos envolvidos que auxiliarão no tratamento matemático dos dados experimentais apresentados no Capítulo 4.

2.1 Limitações atuais da tecnologia de modificação de óleos e gorduras

Óleos e gorduras são ésteres de ácidos carboxílicos com o glicerol, denominados triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAGs), substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada à três moléculas de ácidos graxos. A natureza física destes compostos é definida pelo comprimento da cadeia, pelo grau de insaturação e pela distribuição dos radicais. Os TAGs são os principais componentes de qualquer gordura animal ou vegetal. Dependendo da origem do óleo, o conteúdo em TAGs e ácidos graxos pode variar significativamente (Moretto e Fett, 1998).

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoléico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (Karleskind, 1996; Gurr e Harwood, 1996).

Desde os anos 80 tem surgido um crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (de Castro *et al.*, 2004).

Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um composto. Existem casos, entretanto, que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação.

Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de TAGs. A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser modificada, por meio da síntese de ésteres para produção de emulsificantes (esterificação), 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 e Glatz, 1988). Sem levar em consideração os outros processos existentes, como o fracionamento, pode-se afirmar que as limitações na obtenção desses produtos estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação.

Nesse contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma alternativa atrativa para exploração na indústria de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas das vantagens dessa rota, tais como maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia, redução da quantidade de resíduos e introdução de rotas mais acessíveis de produção (de Castro *et al.*, 2004).

2.2 Azeite de oliva

Dentre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva (*Olea europae sativa*) é um dos mais importantes e antigos, sendo largamente empregado nos países que margeiam o Mediterrâneo. Dentre os óleos vegetais não refinados, o óleo de oliva apresenta um dos mais apreciados *flavours*. Apresenta ainda algumas propriedades nutricionais que fazem com que os habitantes do Mediterrâneo tenham menor incidência de doenças coronarianas do que povos de outras regiões que consomem mais gorduras saturadas (Kiritsakis e Markakis, 1987).

O azeite de oliva contém aproximadamente 90% de ácidos graxos insaturados, sendo o principal componente o monoinsaturado ácido oléico. Seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados é de nível baixo, aproximadamente 10%. Tanto a polpa como a semente contém óleo e é interessante notar que o óleo da semente e o da polpa do fruto da oliveira são idênticos em composição (Moretto e Fett, 1998).

A composição do azeite de oliva extra virgem é resultante de uma interação complexa entre as variedades de olivas, condições ambientais, grau de maturidade do fruto e tecnologia de extração. O azeite extra virgem é o único que não é extraído por solventes, sendo obtido por prensagem a frio da oliva. Este azeite conserva seus componentes originais, entre os quais os polifenóis, característicos pelo odor do azeite. No entanto, quando o processamento inclui o uso de solventes (azeites refinados), boa parte destes compostos fenólicos é perdida. Isto ocorre também quando o azeite é alcalinizado para reduzir a acidez, constituindo assim em perda de qualidade do produto (Angelis, 2001).

O azeite de oliva, como a maioria de óleos e gorduras comestíveis, é composto por duas frações: a fração saponificável (glicerídica) e a insaponificável (não glicerídica). Os compostos glicerídicos incluem os TAGs, DAGs, MAGs e fosfolipídeos (Ruiz-Gutierrez e Pérez-Camino, 2000). A fração saponificável do azeite de oliva, como na maioria dos óleos vegetais, representa em torno de 98-99% da composição do óleo, sendo os TAGs os principais componentes (95 - 98%), ou seja, ésteres de ácidos graxos e glicerol (Aued-Pimentel, 1991). Na Figura 2.1 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.

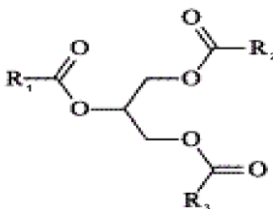


Figura 2.1 – Estrutura genérica de um TAG.

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

2.3 Glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol) 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, ou seja, ao 1,2,3-propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais que contenham 95% (m/m) ou mais de glicerol na sua composição. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. O termo glicerina loira tem sido utilizado para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerosa sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% (m/m) de glicerol, além de

água, metanol e sais dissolvidos (Mota *et al.*, 2009). A estrutura genérica de uma molécula de glicerol encontra-se na Figura 2.2.

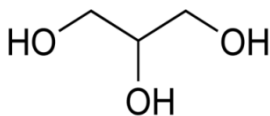


Figura 2.2 – Estrutura de uma molécula de glicerol.

A glicerina natural, produzida a partir de óleos e gorduras, pode ser obtida como subproduto na produção de sabões, biocombustíveis, ácidos graxos e alcoóis de ácidos graxos, entre outros. A glicerina pode ser vendida na sua forma bruta (glicerina natural), sem qualquer purificação, ou ainda, comercializada na forma de padrão analítico (PA). A partir de 1995, a crescente oferta de glicerol, produzido como subproduto da produção de biodiesel, ocasionou uma diminuição no seu preço de mercado. Tornou-se, desta forma, necessário buscar novas aplicações para a utilização da glicerina (Felizardo, 2003).

Devido à combinação das suas propriedades físicas e químicas, a glicerina apresenta uma vasta gama de aplicações. O fato de ser atóxica, incolor e inodora faz desta uma substância apreciada pela indústria em geral. Além disso, a glicerina pode ser utilizada como amaciante em pães e a sua viscosidade permite sua utilização em xaropes (Ullmanns, 1992).

2.4 Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis

Os monoglicerídeos ou monoacilgliceróis (MAGs) e os diglicerídeos ou diacilgliceróis (DAGs) são os produtos mais valiosos que se obtém em reações de glicerólise (Moquin *et al.*, 2006). MAGs são moléculas constituídas por uma molécula de glicerol ligada a uma molécula de ácido graxo. DAGs, por sua vez, são moléculas constituídas por uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácido graxo. Por apresentarem um balanço hidrofílico-hidrofóbico em suas estruturas (sendo o glicerol hidrofílico e o ácido graxo hidrofóbico), os MAGs ou misturas deste com DAGs possuem importantes aplicações industriais, representando de 70 a 75% de todos os emulsificantes sintéticos

utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Ferreira-Dias *et al.*, 2001; Damstrup *et al.*, 2005; Moquin *et al.*, 2005; Cheirsilp *et al.*, 2007).

O campo de aplicações destes compostos em alimentos é variado: emulsificantes, 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 e King, 1997; Noureddini *et al.*, 2004; Moquin *et al.*, 2005; Damstrup *et al.*, 2005). 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 e H-Kittikun (2004) afirmam ainda que, devido às propriedades lubrificantes e plastificantes, os MAGs são também utilizados em processos têxteis e produção de plásticos.

Devido à importância mundial dos MAGs e os seus derivados como aditivos ativos na superfície em uma gama extensiva de alimentos, considerável atenção foi dada recentemente para melhorar sua síntese.

Os DAGs estão naturalmente presentes como componentes secundários em vários óleos e gorduras comestíveis, são conhecidos como aditivos funcionais em alimentos, na medicina e em indústrias de cosméticos, às vezes associados com MAGs. Os DAGs foram aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (USA FDA) para uso como emulsificante e aceito como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Geralmente Reconhecido como Seguro) em 2000 e aprovados para diversas aplicações em alimentos. Recentemente, produtos lipídicos contendo mais que 80% de DAGs adicionados aos alimentos foram relacionados com diversos benefícios à saúde. No Japão, os DAGs foram aprovados para venda como um *Food for Specified Health Use* (FOSHU) (Alimento para Uso Específico em Saúde) em 1999 (Blasi *et al.*, 2007).

Recentemente, mostrou-se que os DAGs têm efeitos benéficos na prevenção e administração da obesidade comparados com os TAGs, principais compostos de óleos comestíveis (Kasamatsu *et al.*, 2005). Estudos clínicos mostram que óleos ricos em DAGs previnem o

acúmulo de gordura no corpo, especialmente gorduras viscerais (Watanabe *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 2000).

O gosto e as propriedades físico-químicas dos DAGs são comparáveis àqueles óleos vegetais disponíveis tradicionalmente (Soni *et al.*, 2001), uma vez que são estruturalmente muito similares (Fregolente *et al.*, 2009). Taguchi *et al.* (2001) mediram o valor energético de DAGs e TAGs através de uma bomba calorimétrica, onde obtiveram valores de 9,30 e 9,46 kcal/g, respectivamente, entretanto, não observou-se diferença significativa na taxa de absorção pelo organismo, que para ambos foi de 96,3%. Assim, justificam que a característica dos DAGs em reduzir o acúmulo de gordura corporal não é causada por diferenças no valor energético ou na taxa de absorção, mas nos diferentes mecanismos metabólicos de TAGs e DAGs. Pesquisas realizadas com ratos relatam que, ao contrário dos TAGs que em excesso no organismo são estocados em forma de gordura localizada, os DAGs são facilmente utilizados pelo organismo como fonte de energia (Maki *et al.*, 2002; Yasunaga *et al.*, 2004). Kasamatsu *et al.* (2005) afirmam que sucessivos aquecimentos e resfriamentos de DAGs não apresentam efeitos genotóxicos, como ocorrem tradicionalmente com óleos vegetais convencionais.

Os MAGs e DAGs são surfactantes não-iônicos e são os principais tipos de emulsificantes alimentícios. São consumidos em um nível anual de 85 milhões de quilogramas nos Estados Unidos, em produtos alimentícios. As diretivas da Organização Mundial de Saúde (OMS) requerem que estas misturas (EEC, código 471) tenham pelo menos 70% de MAGs + DAGs, e um mínimo de 30% em MAGs, e que os conteúdos de glicerol e TAGs estejam abaixo de 10%. Os MAGs também são emulsificantes com estado GRAS (Arcos e Otero, 1996).

2.5 Glicerólise de óleos vegetais

Glicerólise é a reação que produz MAGs e DAGs a partir de moléculas de glicerol ligadas à moléculas de TAGs. Esta reação pode ser representada pelas seis etapas da Figura 2.3, sendo que as etapas representadas pelas Equações (2.1) a (2.3) indicam as reações envolvidas na glicerólise e as etapas representadas pelas Equações (2.4)

a (2.6) indicam as reações de hidrólise que podem ocorrer paralelamente caso haja água suficiente no meio.

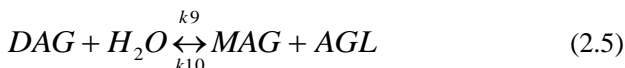


Figura 2.3 - Etapas da reação de glicerólise (2.1 – 2.3) e hidrólise (2.4 – 2.6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.

Como mostrado na Figura 2.3, 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). Ou seja, teoricamente, a glicerólise de um mol de TAG e dois moles de glicerol pode produzir três moles de MAGs, entretanto, o rendimento em MAGs depende do equilíbrio estabelecido em diferentes condições (Cheirsilp *et al.*, 2007). 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.

A presença de água no sistema, se controlada, pode aumentar a conversão de TAGs em DAGs (Equação (2.4)) e este em MAGs (Equação (2.5)), mas se não houver controle na quantidade de água presente, estes substratos podem ser convertidos em ácidos graxos livres (Equação (2.6)). Cabe salientar que as etapas de hidrólise podem ocorrer paralelamente a de glicerólise e que a partir de baixas concentrações de

água no meio, ácidos graxos livres já começam a ser formados. 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). Além disso, o teor de água em estudos de enzimas em meio orgânico é uma etapa fundamental, uma vez que esta definirá, por exemplo, algumas propriedades da enzima, como atividade, estabilidade e especificidade. 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). Moquin *et al.* (2005), em seu estudo de glicerólise utilizando dióxido de carbono supercrítico consideraram a presença de até 8% (m/m) de água no meio reacional positiva em relação ao aumento da formação de MAGs. Por outro lado, Yadav e Devi (2004) em seu estudo de hidrólise de oleína de palma pela lipase imobilizada Lipozyme TL para a produção de ácidos graxos, encontraram que concentrações acima de 3,6% (m/m) de água no meio reacional começam a inibir a atividade da enzima. De acordo com estes mesmos autores, adição 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). Para Zheng *et al.* (2009), a concentração de água encontrada como limite para o início da inativação da enzima foi de 2% (m/m) no meio reacional.

Os processos comerciais para a produção de MAGs e DAGs utilizam glicerólise contínua de gorduras e óleos vegetais usando catálise inorgânica alcalina, tais como NaOH, Ca(OH)₂ ou CaO, requerem alta demanda energética por serem conduzidos a altas temperaturas (200 – 260°C), produzindo, dependendo da relação molar entre glicerol e triglicerídeos utilizada no meio reacional, de 35 a 60% (m/m) de MAGs, 35 a 55% (m/m) de DAGs; 1 a 20% (m/m) de TAGs e 1 a 10% (m/m) de ácidos graxos livres (Ferreira-Dias *et al.*, 2001; Damstrup *et al.*, 2005; Cheirsilp *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2008). Este processo de produção apresenta algumas desvantagens: baixa produtividade, dificuldade de obtenção de produtos puros e o uso de altas temperaturas, o que pode ocasionar sabor e coloração indesejáveis (Boyle, 1997; Bellot *et al.*, 2001; Damstrup *et al.*, 2005). Além disso, catalisadores químicos causam outros problemas, tais como, corrosão de

equipamento, perigo de queimaduras aos operadores, não são reutilizáveis, a neutralização do volume reagido gera quantidades relativamente grandes de sais, entre outros.

Ao final deste processo é necessária a purificação por destilação molecular não somente para remoção de impurezas como também para concentrar MAGs e DAGs a uma concentração maior que 90% (m/m) (Kaewthong e H-Kittikun, 2004) (uma vez que a Organização Mundial da Saúde requer que o produto final contenha abaixo de 10% (m/m) de glicerol mais TAGs). Este método de separação não se trata de uma destilação propriamente dita, pois nesta técnica a separação dos compostos ocorre pela diferença de suas massas moleculares, e não através de equilíbrio entre fases. Assim sendo, a destilação molecular é considerada um processo de não equilíbrio (Batistela e Maciel, 1996; Micov *et al.*, 1997). O uso deste processo é de grande gasto energético, o que acaba sendo mais uma desvantagem para o processo de glicerólise convencional (Chew *et al.*, 2008). Para separação e purificação dos acilgliceróis (TAGs, DAGs, MAGs, AGLs e glicerol) formados na reação enzimática, a técnica de destilação convencional não é recomendada, pois esses compostos podem sofrer degradação e oxidação quando expostos às elevadas temperaturas (Guo e Xu, 2006).

Em geral, MAGs são os produtos mais abundantes da reação de glicerólise, com uma concentração que não chega a passar dos 58% (m/m) (Noureddini *et al.*, 2004). Para aumentar este rendimento, um melhor entendimento da cinética da reação é necessário e métodos alternativos de condução da reação têm ganhado força. Recentemente, tem se destacado na literatura o interesse pelo desenvolvimento de processos enzimáticos que possam substituir as tradicionais rotas químicas para a produção de MAGs e DAGs.

Na Tabela 2.1 apresenta-se um resumo de algumas das principais publicações em glicerólise, com o objetivo de ter-se uma visão geral dos estudos já realizados para a produção de emulsificantes a partir da reação de glicerol com óleos vegetais.

Tabela 2.1 – Alguns dos principais estudos sobre glicerólise encontrados na literatura.

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Temelli <i>et al.</i> (1996)	Óleo de soja (25:1)	250°C, 4% de água no glicerol (m/m), 20,7 MPa	-	CO ₂ supercrítico	-	4	0,13 moles MAG/100g amostra
Tüter e Aksoy (2000)	Óleo de palma (1:2)	40°C, 1300 rpm	Lipase (<i>Humicola lanuginosa</i>) (500 U/g óleo)	-	-	24	18% MAG 38% DAG (m/m)
Tüter e Aksoy (2000)	Óleo de palmito (1:2)	40°C, 1300 rpm	Lipase (<i>Humicola lanuginosa</i>) (500 U/g óleo)	-	-	24	31% MAG 42% DAG (m/m)

(Continua)

(Continuação Tabela 2.1)

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Kaewthong e H-Kittikun (2004)	Oleína de Palma (8:1)	45°C, 300 rpm, 10% de água no glicerol (m/m)	Lipase PS (<i>Pseudomonas sp.</i>) (50% em relação a oleína – m/v)	Acetona + isooctano (3:1– v/v). Uso de 10% (m/v) de óleo no solvente	-	16	55,7% MAG 21,2% DAG (m/m)
Noureddini <i>et al.</i> (2004)	Óleo de soja (2,5:1)	230°C, 3600 rpm, reator contínuo (40mL/min)	0,18% de NaOH (em relação ao óleo – m/m)	-	-	0,5 (tempo de residência)	58% MAG 36% DAG (m/m)
Yang <i>et al.</i> (2005a)	Óleo de girassol (4,5:1)	40°C, 500 rpm, 2,6% (m/m) de água no glicerol	Novozym 435 (15% na mistura G:O – m/m)	-	-	8	10% MAG 32% DAG (m/m)

(Continua) ⁵

(Continuação Tabela 2.1)

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Yang <i>et al.</i> (2005a)	Óleo de girassol (4,5:1)	45°C, 500 rpm	Novozym 435 (15% na mistura G:O – m/m)	<i>tert</i> -butanol (solvente: óleo, 2:1 – m/m)	-	3	70% MAG 20% DAG (m/m)
Damstrup <i>et al.</i> (2005)	Óleo de girassol (4:1)	50°C, com agitação magnética	Novozym 435 (30% em relação ao óleo – m/m)	<i>tert</i> -pentanol (solvente: mistura, 4:1 – m/m)	-	1	74% MAG 23% DAG (m/m)

(Continua)

(Continuação Tabela 2.1)

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Damstrup <i>et al.</i> (2006a)	Óleo de girassol (5:1)	40°C, com agitação magnética	Novozym 435 (30% em relação ao óleo – m/m)	<i>tert</i> -butanol + <i>tert</i> -pentanol (8:2 – v/v) (solvente: mistura, 2:1– m/m)	-	0,5	55,4% MAG 17% DAG (m/m)
Moquin <i>et al.</i> (2006)	Óleo de canola (34:1)	250°C, 8% (m/m) de água no meio reacional, 20 MPa	-	CO ₂ supercrítico		6	0,16 moles MAG e 0,05 moles DAG /100g óleo

(Continua)

(Continuação Tabela 2.1)

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Fiametti (2008)	Óleo de oliva (2:1)	70°C, 600 rpm	Novozym 435 (7,5% na mistura G:O – m/m)	-	AOT (16% na mistura G:O – m/m)	2	61,1% MAG (m/m)
Esmelindro <i>et al.</i> (2008)	Óleo de oliva (2:1)	30°C, 30 bar, 600 rpm	Novozym 435 (10% na mistura G:O – m/m)	propano supercrítico (solvente: mistura, 4:1 –m/m)	AOT (10% na mistura G:O – m/m)	1	60% MAG (m/m)
Valério <i>et al.</i> (2009a)	Óleo de oliva (6:1)	70°C, 600 rpm	Novozym 435 (9% na mistura G:O – m/m)	-	Triton-X 100 (15% na mistura G:O)	6	31,1% MAG 16,4% DAG (m/m)

(Continua) 18

(Continuação Tabela 2.1)

Referência	Óleo vegetal (relação molar G:O)	Condições de reação	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Fregolente <i>et al.</i> (2009)	Óleo de soja (8:1)	70°C, 300 rpm, 3,5% de água	Novozym 435 (2% em relação ao óleo – m/m)	-	-	24	24,3% MAG 48,2% DAG (m/m)
Valério <i>et al.</i> (2009b)	Óleo de oliva (2:1)	70°C, 10 bar, 600 rpm	Novozym 435 (7,5% na mistura G:O – m/m)	n-butano supercrítico (solvente: mistura, 4:1–m/m)	AOT (7,5% na mistura G:O – m/m)	2	>65% MAG (m/m)

As principais vantagens destes processos catalisados por enzimas são as condições amenas de temperatura e de pH utilizadas, ou seja, baixas temperaturas e pH próximo do neutro (Ferreira-Dias *et al.*, 2003). Tais condições diminuem o consumo energético e minimizam a ocorrência de reações indesejadas de polimerização. 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) (Bornscheuer, 1995; Fregolente, 2006).

Como se observa na Tabela 2.1, além da glicerólise enzimática, há outros estudos, como por exemplo, o uso da tecnologia de fluidos supercríticos e/ou gases pressurizados como solventes (Temelli *et al.*, 1996; Moquin *et al.*, 2006b; Esmelindro *et al.*, 2008; Valério *et al.*, 2009b) que também procuram melhorar o rendimento e a qualidade dos produtos obtidos. Porém, fica evidente que o maior número de estudos em glicerólise envolvem a aplicação de lípases, principalmente da enzima *Novozym 435*.

2.6 Lipases como catalisadores

A biotransformação pode ser aplicada às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos. Os óleos e gorduras são matérias-primas versáteis para a aplicação desta tecnologia, sendo diversos os processos implementados em escala comercial (de Castro *et al.*, 2004).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais. As razões do enorme potencial biotecnológico dessa enzima incluem fatos relacionados com: i) modificação de óleos e gorduras; ii) especificidade em sínteses orgânicas; iii) alta estabilidade em solventes orgânicos; iv) não requerem a presença de co-fatores; v) melhora do *flavor* de alimentos processados e vi) exibem uma alta enantioseletividade. O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no

desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (de Castro *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Catalisam a hidrólise de TAGs de cadeia longa, levando à formação de ácidos graxos, MAGs, DAGs e glicerol. A hidrólise de TAGs utilizando lipases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado através da variação da concentração de reagentes e/ou produtos (Abdel-Fattah e Gaballa, 2008).

As lipases podem catalisar não só hidrólises de óleos e gorduras, mas, também, várias reações reversas, tais como, esterificação e interesterificação, entre outras (Blasi *et al.*, 2007). Lipases são proteínas com atividade de superfície considerável. Seus substratos naturais são acilgliceróis de cadeia longa que têm baixa solubilidade aquosa (Reis *et al.*, 2006). A aplicação de lipases é ainda, limitada pelo alto custo da enzima. A imobilização de lipases pode minimizar o problema de alto custo destas enzimas, uma vez que assim, tornam-se de fácil separação dos produtos e podem ser reutilizadas várias vezes ou ainda utilizadas em processos contínuos (H-Kittikun *et al.*, 2000; Kaewthong *et al.*, 2005). A aplicação de lipases imobilizadas está se mostrando de grande interesse em indústrias de oleoquímica, pelas vantagens sob reações químicas convencionais (Chew *et al.*, 2008).

McNeill *et al.* (1992) já consideravam interessante o processo de síntese de MAGs a partir de TAGs utilizando lipases como catalisadores, pela alta especificidade e atividade em temperaturas relativamente baixas, em sistemas com solvente orgânico com baixo conteúdo de água. Estes autores também concordam que a qualidade dos MAGs obtidos por via enzimática é superior em relação à síntese por via química.

2.7 Glicerólise enzimática de óleos vegetais

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. As principais vantagens destes processos catalisados por enzimas são as condições amenas utilizadas 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).

A glicerólise enzimática de TAGs com lipase pode apresentar rendimentos de 30 a 70% em MAGs (McNeil e Yamane, 1991; Bornscheuer, 1995; Kaewthong e H-Kittikun, 2004).

Uma reação típica de glicerólise (sem catalisador) é chamada de reação de estado sólido, onde são utilizadas temperaturas baixas, sendo a reação muito longa, ou seja, com velocidade baixa (mais de uma semana), tornando-se não atrativa do ponto de vista industrial. Em sistemas livres de solvente é difícil alcançar alta produção de MAGs na glicerólise enzimática (Yang *et al.*, 2005a).

O sistema de glicerólise com lipase imobilizada como catalisador pode ser considerado um sistema de três fases: uma fase hidrofóbica de óleo, uma fase hidrófila de glicerol, e uma fase sólida de enzima. Com as características comumente mais hidrófilas da enzima, o glicerol se liga frequentemente às partículas de enzima de forma que o acesso das moléculas de óleo para a enzima é dificultado. A transferência de massa de glicerol em relação ao sistema também é limitada. Devido a esta razão, a eficiência da reação é normalmente baixa, embora esta possa ser melhorada por uma otimização em uma concentração menor de glicerol. Outra opção pode ser imobilizar o glicerol em sílica-gel e assim, o glicerol fica presente no meio reacional sem estar livre para aderir imediatamente à enzima e formar a “capa” que dificulta o contato com o óleo, ou ainda, o uso de um solvente para melhorar a homogeneidade do meio (Yang *et al.*, 2005b).

Vários estudos têm demonstrado a eficiência da glicerólise enzimática, embora processos industriais ainda apresentam dificuldades para implantá-la devido à falta de eficiência, causada principalmente pelo longo tempo de reação que é atribuído à baixa miscibilidade entre o glicerol e o óleo (Damstrup *et al.*, 2005).

Cabe reforçar que do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente limpo e seguro. Neste contexto, diferentes

alternativas têm sido propostas com relação à síntese enzimática de MAGs e DAGs, desde novas e fartas fontes de lipases, aperfeiçoamento de métodos de imobilização destas, novas configurações de reatores e utilização de agentes que aumentem a miscibilidade entre os reagentes, como por exemplo, uso de solventes orgânicos (Freitas *et al.*, 2008) e fluidos pressurizados (Moquin *et al.*, 2005; Esmelindro *et al.*, 2008; Valério *et al.*, 2009b; Valério *et al.*, 2010).

2.8 Solvente Orgânico

O glicerol é hidrofílico e insolúvel em óleos e acaba sendo facilmente adsorvido na superfície de lipases imobilizadas, podendo prejudicar a atividade da enzima e a estabilidade da reação (Su e Wei, 2008). O uso de solventes orgânicos aliados à alta agitação do meio são ferramentas que podem ser utilizadas para minimizar esta situação durante as reações de glicerólise.

Damstrup *et al.* (2005) afirmam que ao optar por glicerólise via enzimática sem o uso de solventes no sistema, longos tempos de reação e baixas conversões, em geral são atribuídos à baixa miscibilidade entre o glicerol (hidrofílico) e o óleo (hidrofóbico) em baixas temperaturas, podendo tornar a reação ineficiente.

Um meio reacional com um solvente satisfatório melhora a miscibilidade entre os substratos e resulta em um sistema homogêneo, com maior transferência de massa e menor viscosidade (Pawongrat *et al.*, 2007), e por consequência, com maior formação de MAGs e DAGs. Solventes como n-hexano, n-heptano, dioxano, acetonitrila, acetona, isooctano, 2-metil-2-propanol (terc-butanol), 2-metil - 2-butanol (terc-pentanol), ou misturas de alguns deles são úteis em diferentes reações de interesterificação catalisadas por lipases (Bellot *et al.*, 2001; Kaewthong e H-Kittikun, 2004; Su e Wei, 2008).

O parâmetro *coeficiente de partição do solvente* (P) entre o 1-octanol e água pode ser introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente e $\log P$ (expressão mais comum) está relacionado com a atividade de biocatalisadores em solvente orgânico. Solventes com diferentes $\log P$ são apresentados na literatura como um parâmetro para caracterizar as propriedades dos solventes em reações envolvendo lipídeos e lípases. De uma forma geral, este coeficiente fornece uma medida da natureza lipofílica versus hidrofílica de um composto. O

valor de P descreve a distribuição de um composto em um sistema de duas fases e é definido como a razão da concentração de equilíbrio de um composto em uma fase rica em 1-octanol e a concentração em uma fase rica em água (onde 1-octanol e água estão em equilíbrio). O valor de $\log P$ tende a ser maior para compostos com estruturas apolares e valor menor, ou até negativo, para compostos altamente polares (Jesus *et al.*, 1997; Damstrup *et al.*, 2005; Su e Wei, 2008; Zheng *et al.*, 2009).

Damstrup *et al.* (2005) estudaram vários solventes e misturas destes, de polaridades variadas, ou seja, de uma ampla faixa de $\log P$ (-0,34 a 4,5), para avaliar a melhora na eficiência dos processos de glicerólise enzimática. O grupo demonstrou que com o uso de um determinado solvente, aumenta-se a transferência de massa e o equilíbrio de reação é alcançado dentro de poucas horas. Dos 13 solventes e misturas estudadas, os alcoóis terciários obtiveram os melhores rendimentos em MAGs. Com *terc*-pentanol ($\log P = 0,89$) foi possível obter conteúdos em torno de 65% de MAGs e com *terc*-butanol ($\log P = 0,35$) acima de 80% (m/m) de MAGs, ambos em torno de duas horas e meia de reação, utilizando 50 mL/10 g óleo, 30% de enzima imobilizada (em relação à massa de óleo – m/m), 50°C e relação molar glicerol:óleo de 5:1. Os piores rendimentos foram obtidos com os solventes clorofórmio ($\log P = 1,97$) e heptano ($\log P = 4,5$), com rendimentos de 0,0 e 1,1% (m/m) em MAGs, respectivamente. Para os solventes altamente polares, acetonitrila ($\log P = -0,34$), etanol ($\log P = -0,30$) e acetona ($\log P = 0,24$) os rendimentos em MAGs, para as mesmas duas horas e meia de reação foram, respectivamente, 2,0; 21,0 e 11,5% (m/m). Resultados semelhantes estão apresentados em outros estudos do mesmo grupo (Damstrup *et al.*, 2006a; Damstrup *et al.*, 2006b). Su e Wei (2008) caracterizaram os valores de $\log P$ para *terc*-pentanol e *terc*-butanol, como sendo: 1,4 e 0,8, respectivamente e em seus experimentos com 11 solventes na produção enzimática de biodiesel utilizando lipases, estes dois solventes citados foram os que conduziram às maiores conversões dos substratos.

Poucos solventes têm sido estudados em glicerólise enzimática, em alguns casos, baixos rendimentos em MAGs são obtidos ou na prática industrial é inviável devido ao alto preço ou alta toxicidade (Bornscheuer, 1995). Alguns estudos têm mostrado que o solvente *terc*-butanol, ou ainda, misturas contendo este, é satisfatório em sistemas de reações contendo glicerol (Rendón *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2003).

2.9 Cinética de reações enzimáticas

O estudo da cinética de reações enzimáticas tem por principais objetivos estudar a influência das variáveis envolvidas (concentrações iniciais de substrato e enzima, temperatura, pH, presença de inibidores, entre outros), conhecer as velocidades de consumo de substratos e de formação de produtos e buscar uma correlação entre as transformações envolvidas com equações matemáticas que possam representá-las.

Em geral, observa-se na literatura o tratamento da cinética de reações catalisadas por enzimas como um caso de reação com um só substrato. Entretanto, muitas enzimas de importância biológica catalisam dois ou mais substratos e nestes casos, a abordagem mais conhecida é a de *Cleland*. Utilizando a nomenclatura imaginária de *Cleland*, reações com dois substratos, como é o caso da glicerólise, podem ser classificadas como ping-pong ou sequencial. No *mecanismo ping-pong*, um ou mais produtos devem ser liberados antes de todos os substratos reagirem. No *mecanismo sequencial*, todos os substratos devem combinar-se com a enzima antes da reação propriamente dita ocorrer. Além disso, o mecanismo sequencial pode ser *ordenado* ou *randômico*. No *mecanismo sequencial ordenado*, os substratos se ligam com a enzima e produtos são liberados, em uma ordem específica. No *mecanismo sequencial randômico*, por outro lado, a ordem de combinação dos substratos e da liberação dos produtos não é obrigatória. Exemplos de reações de ping-pong bi bi, sequencial ordenado bi bi e sequencial randômico bi bi, utilizando esquemas de *Cleland*, podem ser observados a seguir na Figura 2.4. A expressão *bi bi* é utilizada quando a reação ocorre entre dois substratos e tem como resultado dois produtos (Marangoni, 2003).

Cada etapa da reação de glicerólise deve ser observada como um mecanismo separadamente, e observando a Figura 2.3 (página 10) e o estudo de Cheirsilp *et al.* (2007), todas estas reações demonstram se enquadrar na teoria do *mecanismo sequencial*, onde os dois reagentes devem se ligar a enzima, reagir, para só depois os produtos serem liberados.

Um fator importante a considerar, nesta etapa, é a influência da possível presença de um inibidor no meio reacional. Chama-se inibidor da reação enzimática uma substância que acarreta diminuição da velocidade da reação. Cabe resaltar que o inibidor pode ser uma das substâncias que participam da reação, quer como substrato, quer como

produto. Outro fator importante que deve ser considerado no estudo da cinética de reações é o cálculo da velocidade inicial de reação, pois o único momento em que todas as condições experimentais são conhecidas é nos instantes iniciais e, assim, a visualização da velocidade de consumo dos substratos (ou a velocidade de formação de produtos) pode fornecer dados sobre a influência das concentrações iniciais (Borzani, 2001).

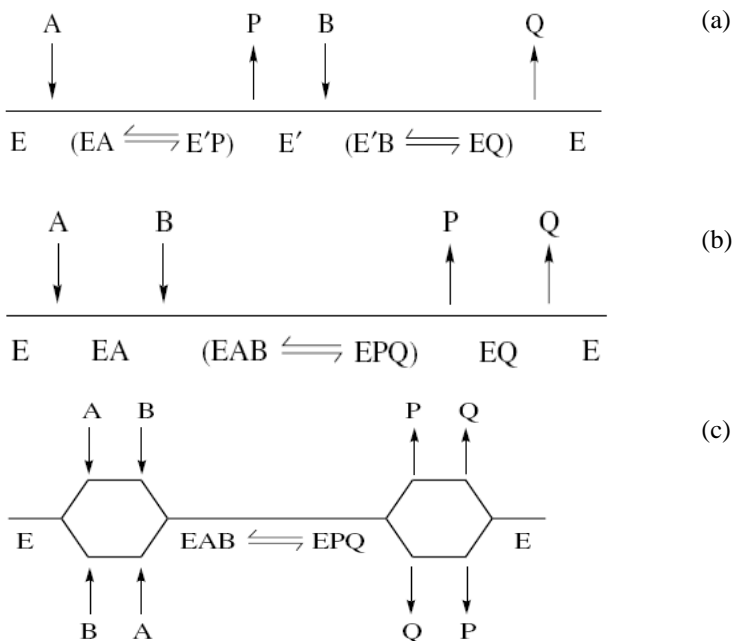


Figura 2.4 – Tratamento da cinética de reações enzimáticas utilizando esquema de Cleland. (a) ping-pong bi bi. (b) sequencial ordenado bi bi. (c) sequencial randômico bi bi. Fonte: Borzani (2001).

2.10 Modelagem matemática de reações de glicerólise

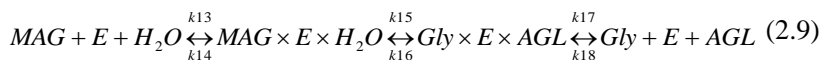
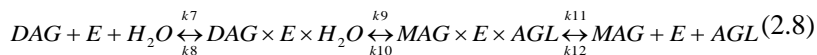
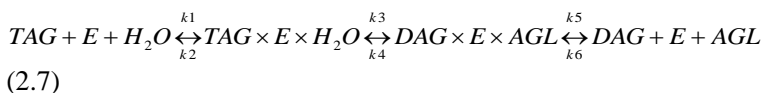
A determinação do mecanismo de uma reação enzimática não é tarefa fácil nem trivial, além disso, mecanismos de inibições podem estar envolvidos, bem como outros fenômenos nem sempre conhecidos. Talvez por este motivo, encontram-se na literatura diversos estudos

cinéticos de reações de glicerólise (Arcos e Otero, 1996; Garcia *et al.*, 1996; Jakson e King, 1997; Corma *et al.*, 1998; Tüter e Aksoy, 2000; Watanabe *et al.*, 2003; Noureddini *et al.*, 2004; Weber e Mukherjee, 2004; Kaewthong e H-Kittikun, 2004; Damstrup *et al.*, 2005; Kaewthong *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005a; Yang *et al.*, 2005b; Damstrup *et al.*, 2006a; Negi *et al.*, 2007; Blasi *et al.*, 2007; Pawongrat *et al.*, 2007; Damstrup *et al.*, 2007; Esmelindro *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2008; H-Kittikun *et al.*, 2008; Valério *et al.*, 2009b; Fregolente *et al.*, 2009; Kahveci *et al.*, 2010; Valério *et al.*, 2010, entre outros), voltados a verificar, principalmente, a influência das variáveis envolvidas na reação, como temperatura, relação molar glicerol e óleo, emprego de diferentes catalisadores e de diferentes solventes, entre outras. Porém, quando se trata de um estudo mais profundo dos mecanismos cinéticos destas reações, visando a modelagem matemática, há poucos estudos disponíveis relacionados à reações de glicerólise a partir de óleo vegetal e glicerol. Alguns referem-se à glicerólise não enzimática, como é o caso de Moquin *et al.* (2005) e Moquin *et al.* (2006) e outros poucos abordam o tratamento dos dados e modelagem matemática de reações de glicerólise enzimática para a produção de MAG e DAG, como Cheirsilp *et al.* (2007), Tan e Yin (2005) e (Valério *et al.*, 2009a). Esse limitado número de trabalhos de modelagem matemática de reações de glicerólise enzimática refletem a complexidade deste tipo de estudo.

Moquin *et al.* (2005), realizaram a modelagem matemática de dados descritos por Temelli *et al.* (1996), os quais estudaram a glicerólise de óleo de soja na presença de CO₂ supercrítico. As reações foram conduzidas a 250°C e pressão variando de 20,7 a 62,1 MPa, relação molar de glicerol:óleo de 10:1 a 25:1 e concentração de água variando de 3 a 8% (m/m) no meio. Os autores acompanharam a reação durante as quatro primeiras horas e determinaram a composição em termos de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, expressas em moles por 100g de amostra. A composição em termos de glicerol no meio reacional foi calculada por diferença entre a massa total e a soma dos demais constituintes. Em outro trabalho do grupo (Moquin *et al.*, 2006) sobre modelagem cinética de reações de glicerólise e hidrólise de óleo de canola em meio utilizando CO₂ supercrítico, as reações foram conduzidas também a 250°C, mas desta vez com pressão variando de 10 a 30 MPa, relação molar de glicerol:óleo fixa de 34:1 e concentração de água variando de 0 a 8% (m/m) no meio reacional. Em ambos os

trabalhos de Moquin *et al.*, as equações elementares adotadas equivalem às mesmas apresentadas na Figura 2.3 (página 10), onde reações de glicerólise e de hidrólise podem estar ocorrendo paralelamente. Na determinação das constantes de velocidade, encontrou-se que para todas as condições estudadas, as constantes k_2 , k_4 , k_6 , k_8 , k_{10} e k_{11} são iguais a zero, sugerindo que as equações da Figura 2.3 não são reversíveis, com exceção da Equação (2.6). A constante de velocidade de maior valor, em todos os casos, foi k_5 , indicando claramente que na ausência de glicerol, rapidamente MAGs é convertido em DAGs. Ambos os trabalhos mostraram que todas as equações de velocidade mudam sensivelmente frente a qualquer variação na concentração de água e que os maiores rendimentos em MAGs são obtidos utilizando pressão de 10 MPa e 4% de água (m/m) no meio.

Cheirsilp *et al.* (2007) estudaram a cinética da glicerólise da oleína de palma utilizando como catalisador lipase PS *Amano* imobilizada, em meio com os solventes orgânicos acetona/isoctano (razão volumétrica de 3:1), temperatura de 45°C e agitação mecânica de 300 rpm. Tais autores verificaram o efeito das concentrações de água, enzima, glicerol e oleína de palma, onde se observou que a formação de MAGs é favorecida na presença de altas concentrações de glicerol e a formação de DAGs é favorecida em relação à formação de MAGs quando menores razões molares de glicerol:óleo são utilizadas. Para o desenvolvimento do modelo matemático, os autores assumiram que a etapa de hidrólise na reação de glicerólise é a etapa determinante da velocidade, e então, a re-esterificação dos ácidos graxos liberados com o glicerol em excesso acontece rapidamente. O esquema de hidrólise/re-esterificação proposto está descrito a seguir:



Onde:



$MAG \times E \times H_2O$; $Gly \times E \times AGL$ são os diferentes complexos formados entre a enzima e as espécies envolvidas.

A partir deste balanço, equações de velocidade da reação foram propostas para os compostos livres e também para os diferentes complexos enzimáticos formados durante a reação. As velocidades de reação dos complexos enzimáticos foram descritas de acordo com a hipótese do estado pseudo-estacionário. Estes autores descreveram a concentração total de enzima como sendo a soma entre as enzimas livres e os diferentes complexos formados durante a reação. As equações da velocidade foram manipuladas algebricamente para que fossem expressas apenas em função dos compostos simples, das constantes cinéticas e da concentração total de enzima, que é um valor conhecido. A Equação (2.10) exemplifica a expressão reajustada da velocidade da reação para TAGs por Cheirsilp *et al.* (2007).

$$\frac{d[TAG]}{dt} = \frac{(-V_{mDAG} \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + V_{rDAG} \cdot [DAG] \cdot [AGL] \cdot E_T)}{([H_2O] + K_{mDAG} \cdot [DAG] + K_{mMAG} \cdot [MAG] + K_{mG} \cdot [GLy]) \cdot [AGL]} \quad (2.10)$$

Onde:

$$V_{mDAG} = \frac{k_1 \cdot k_3}{k_2 + k_3}; \quad V_{rDAG} = \frac{k_4 \cdot k_6}{k_4 + k_5}; \quad K_{mDAG} = \frac{k_5}{k_6}; \quad K_{mMAG} = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad e$$

$$K_{mG} = \frac{k_{17}}{k_{18}}$$

V_{mDAG} e V_{rDAG} são as velocidades iniciais da reação para a hidrólise de TAGs e re-esterificação de DAGs;

K_{mDAG} , K_{mMAG} e K_{mG} são as constantes de equilíbrio para DAGs, MAGs e GLy.

Esses autores obtiveram um bom ajuste entre os dados experimentais e o modelo proposto. Entretanto, observam-se inconsistências matemáticas nas equações propostas para descrever as velocidades da reação, uma vez que, em todas estas equações, a concentração de ácido graxo está multiplicando todo o denominador, de forma que temos uma indeterminação matemática quando a concentração de ácido graxo é zero. Por um lado, o modelo não permite

a suposição de uma mistura inicial livre de ácidos graxos, pois esta suposição causaria uma indeterminação na equação (divisão por zero) e, por outro lado, não é possível provar matematicamente que as constantes V_{mDAG} e V_{rDAG} representem as velocidades iniciais máximas de reação de hidrólise de TAGs e esterificação do DAGs, respectivamente, como são propostas pelos autores. O trabalho de Cheirsilp *et al.* (2007) acaba se assemelhando, em partes, com o Tan e Yin (2005), os quais também apresentam o estudo como sendo reações de glicerólise, mas na etapa de tratamento matemático dos dados acabam utilizando somente as reações de hidrólise.

Valério *et al.* (2009a) realizaram reações de glicerólise do óleo de oliva utilizando como catalisador a lipase Novozym 435, na presença de surfactante Triton X-100. Obtiveram altos rendimentos em MAGs e DAGs (mais de 35% m/m) à 50°C, com concentração de enzima relativamente baixa (9% em relação à massa de substrato – m/m) e em um curto tempo de reação (240 min). A modelagem cinética levou em consideração as reações de glicerólise e hidrólise/esterificação (Eqs. (2.1) –(2.3) e (2.4) – (2.6), respectivamente da Figura 2.3 – página 10). As Eqs. (2.4) – (2.6) foram consideradas por se admitir a presença de água no glicerol utilizado como substrato. A partir destas equações obteve-se a velocidade das reações de cada composto. Os parâmetros cinéticos foram considerados proporcionais à concentração de enzima e o efeito da temperatura foi verificado com o uso da equação de Arrhenius reparametrizada. Neste estudo obteve-se uma boa concordância entre os dados experimentais e os resultados obtidos com a cinética proposta.

2.11 Considerações Parciais

A leitura do estado da arte revelou o potencial em utilizar lipases imobilizadas como catalisadores da reação de glicerólise, uma vez que, as condições de operação tornam-se mais amenas, em relação à temperatura e pH, evitando que os produtos adquiram cor e odor indesejáveis como ocorre no processo convencional. Além disso, esforços têm sido dirigidos para encontrar as concentrações iniciais dos substratos e as variáveis de operação ideais para a maximização da velocidade da reação, ao mesmo tempo em que maximizações dos produtos são almejadas. Neste sentido, foram buscados recursos para

tentar facilitar a reação, como a utilização de solvente orgânico como promotor de um meio mais homogêneo e com menor resistência à transferência de massa, uma vez que glicerol e óleo são imiscíveis em condições normais. A literatura tem mostrado que a utilização de solventes orgânicos é de grande contribuição para a reação, com destaque para o solvente *tert*-butanol, o qual vem sendo destacado em publicações de otimização de solventes para reação de glicerólise (Yang *et al.*, 2005a; Damstrup *et al.*, 2005; Damstrup *et al.*, 2006a; entre outros).

A modelagem da cinética e, conseqüentemente a obtenção das constantes cinéticas em cada uma das etapas da reação de glicerólise, a partir dos dados experimentais obtidos em laboratório, pode ampliar a visão sobre o processo e o comportamento das variáveis frente à perturbações, as quais podem ser direcionadas à maximização do produto final em MAGs ou DAGs ou ainda, em ambos.

De todos os trabalhos apresentados na literatura, até o momento, não foi encontrado nenhum que tenha priorizado o desenvolvimento de um mesmo modelo matemático para a reação de glicerólise enzimática a partir de óleo vegetal e glicerol, na presença de solvente, para a produção de MAGs ou de DAGs. Também cabe salientar, que as metodologias oficiais de análise disponíveis referem-se, somente, para identificação e quantificação de MAG, DAG e TAG de reações de biodiesel, onde as faixas de concentrações são bem diferentes das encontradas em reações de glicerólise. Neste contexto, o presente trabalho aborda a produção de MAGs e DAGs a partir glicerólise do óleo de oliva, utilizando o solvente orgânico *tert*-butanol e lipase como catalisador, as possíveis etapas reacionais envolvidas, bem como a adequação da metodologia para análise quali e quantitativa dos compostos envolvidos na reação através da cromatografia gasosa.

- CAPÍTULO 3 -

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a descrição dos materiais utilizados, dos aparatos experimentais e dos procedimentos adotados durante o trabalho, bem como as metodologias utilizadas na determinação do rendimento da reação de glicerólise e no tratamento dos dados experimentais.

3.1 Material

Como substratos para a reação de glicerólise foram utilizados azeite de oliva comercial da marca Arisco (extra virgem) e glicerol (99,5%, Merck). O solvente orgânico utilizado foi o *terc*-butanol (99%, Vetec).

O catalisador empregado neste trabalho foi a lipase comercial Novozym 435 (*Candida antarctica* – EC.3.1.1.3) (Novozymes A/S), imobilizada em resina acrílica aniônica macroporosa (diâmetro na faixa de 0,3 - 0,9 mm), a qual atua randomicamente nas três posições do triglicerídeo por ser uma enzima não específica. O solvente n-hexano (Quimex, 99,5%) foi utilizado na etapa de remoção e lavagem das enzimas do meio reacional ao final da reação.

Nas análises cromatográficas foram utilizados n-heptano, piridina, derivatizante MSTFA (N-methy-N-trimethylsilylfluoroacetamide), padrões externos: monooleína, dioleína, trioleína e ácido oléico (ácido graxo livre), todos de grau cromatográfico e de procedência da Sigma-Aldrich. Estes compostos foram os escolhidos para a calibração por serem os majoritários em cada uma de suas classes, no caso do óleo de oliva.

3.2 Desenvolvimento de metodologia para análise de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs

A determinação do teor de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs nas amostras coletadas foi realizada a fim de conhecer o comportamento da reação ao longo do tempo e determinar o rendimento em produtos desejados (MAGs e DAGs).

3.2.1 Condições cromatográficas

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 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm (J e W Scientific, n° de série: US7162944H). As condições de operação foram segundo a Norma n° 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50°C por 1 minuto, 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 8 min. A temperatura do detector era 380°C, pressão do gás de arraste (hélio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1 μL .

3.2.2 Preparação e análise das soluções de calibração

Preparou-se uma solução mãe de cada padrão externo (monooleína, dioleína, trioleína e ácido oléico), e a partir destas preparou-se oito soluções de calibração em diferentes concentrações para os glicérides, conforme a Tabela 3.1. Para a calibração do ácido oléico, foram feitas outras sete soluções apenas com este padrão (Tabela 3.2), pelo fato de que este foi adquirido após realizada a calibração para os demais padrões.

As condições de análise das soluções de calibração e das amostras foram segundo a Norma n° 14.105 (2001) do Comitê Europeu para Padronizações, porém, sem a utilização de padrões internos. Isto porque as faixas de calibração sugeridas pelo método foram ampliadas, assim, teve-se dificuldade de encontrar as concentrações dos padrões internos que acompanhassem toda a faixa de abrangência escolhida. Optou-se então pela calibração somente com os padrões externos.

Tabela 3.1 – Preparação das soluções de calibração dos glicérides.

Padrão externo	Solução de calibração							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Monooleína (mg/L)	100	500	1000	2000	3100	200	300	6200
Dioleína (mg/L)	890	2100	530	1000	1400	200	730	50
Trioleína (mg/L)	500	5000	3000	50	10.000	7500	200	300

Tabela 3.2 – Preparação das soluções de calibração para ácido graxo livre.

Padrão externo	Solução de calibração						
	1	2	3	4	5	6	7
Ácido oléico (mg/L)	1000	50	100	750	300	25	500

Em cada solução de calibração foi adicionado 100 μL do 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 15 minutos para que o derivatizante reagisse. Em seguida, completou-se o volume (10 mL) com n-heptano. As soluções foram transferidas para os frascos de amostragem e levadas ao GC-FID para análise. Todas as soluções foram preparadas em triplicata.

3.2.3 *Validação das curvas padrões*

Foram realizados testes para verificar a eficiência e confiabilidade das curvas de calibração obtidas com os padrões externos. Para tal, foram preparadas seis amostras sintéticas, do seguinte modo: em misturas de óleo e glicerol foram adicionados padrões externos de monooleína e dioleína, todos em concentrações conhecidas. Após vigorosa agitação das amostras foram coletadas alíquotas para análise. As porcentagens (m/m) obtidas para cada composto em cada amostra foram comparadas com as porcentagens adicionadas nas amostras sintéticas. Estes testes foram realizados em duplicata para todas as amostras.

3.3 **Descrição do aparato e procedimento experimental utilizado nas reações de glicerólise enzimática em batelada**

A unidade experimental delineada e montada para a condução das reações consiste em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostático, o qual controla a temperatura do meio reacional. O aparato consiste ainda de um agitador mecânico (IKA, modelo RW 20), com controlador digital. Na Figura 3.1 é apresentada a unidade experimental.

A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada de forma destrutiva, ou seja, para cada ponto coletado, toda amostra era retirada do reator. Uma nova reação com as mesmas condições era iniciada e deixada reagir até o próximo ponto a coletar e assim sucessivamente até obter todos os pontos de cada cinética.

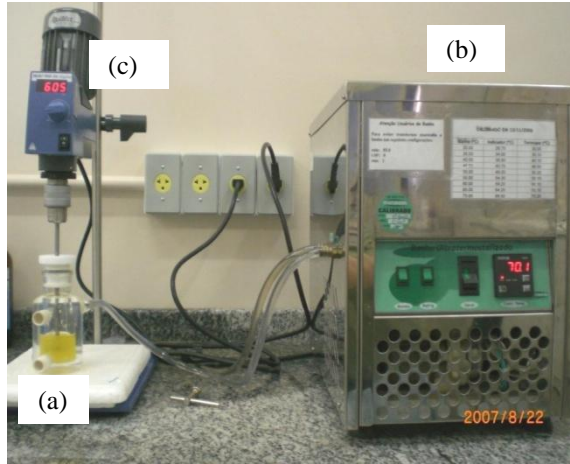


Figura 3.1 – Vista da unidade experimental para produção enzimática de MAGs e DAGs via glicerólise enzimática. Onde: a) reator encamisado; b) banho termostático e c) agitador mecânico com controle de velocidade.

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 1 hora para acondicionamento. Após, eram adicionados ao reator, o azeite de oliva e o glicerol (em quantidades nas quais o volume total era de 15 mL), o solvente orgânico e a enzima. As relações mássicas (azeite, glicerol e enzima) e volumétricas (solvente) utilizadas em cada reação foram determinadas pelo planejamento. Para medida das massas dos substratos e da enzima foi utilizado uma balança analítica com precisão de 0,0001 g. Em seguida, era acoplado o agitador mecânico ao reator 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 à vácuo com sucessivas lavagens com n-hexano para separar a amostra, principalmente o glicerol aderido, da superfície das enzimas imobilizadas. As amostras eram transferidas para frascos de amostragem e acondicionadas em estufa a vácuo (70°C; 0,5 bar) por 1 h a fim de eliminar o excesso de n-hexano e de solvente.

3.4 Preparação e análise das amostras

Na preparação das amostras para a análise cromatográfica foram pesadas 150 mg de cada amostra homogeneizada em balão volumétrico de 5 mL, após foram adicionados 150 μ L do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, o volume foi completado (5 mL) com n-heptano. Uma alíquota de 0,833 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, o qual foi completado com n-heptano, sendo que a solução preparada ficou com concentração equivalente a 5 mg amostra/mL solvente.

Paralelamente à preparação da alíquota da amostra para análise cromatográfica, outra alíquota, em média de 2 g, da mesma amostra era levada para estufa a 105°C até peso constante, a fim de calcular a quantidade de solvente contida na amostra. Assim, posteriormente foram realizados os cálculos de rendimentos em base livre de solvente. Este procedimento foi adotado como um meio de padronizar os resultados, uma vez que o solvente utilizado na reação (*terc*-butanol) pode volatilizar parcialmente e de forma não uniforme com o decorrer da reação, principalmente nas cinéticas que utilizam temperaturas de 55 e 70°C.

3.5 Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico

As faixas de temperatura utilizadas nos testes cinéticos foram baseadas na temperatura ótima de atuação da enzima (Novozym 435) fornecida pelo fabricante (Novozymes A/S), que é de 70°C. Estudos encontrados na literatura sugerem outras temperaturas ótimas para a reação de glicerólise utilizando lipases, entre 35 e 65°C (Kaewthong e H-Kittikun, 2004; Kaewthong *et al.*, 2005; Tan e Yin, 2005; Yang, *et al.*, 2005b). As faixas da relação molar glicerol:óleo de oliva inicialmente utilizadas, 3:1 a 9:1, da concentração de enzima de 2,5 a 15% m/m (em relação a mistura glicerol e óleo) e a agitação de 600 rpm foram baseadas nos resultados obtidos em estudos anteriores realizados por Fiametti *et al.* (2009) e Valério *et al.* (2009a). A concentração de solvente orgânico (*terc*-butanol) utilizada foi de 1:1 (v/v) em relação à mistura glicerol e óleo para a maioria dos estudos. Duas cinéticas foram

repetidas utilizando uma relação de 5:1 (v/v) de solvente:mistura glicerol e óleo, a fim de investigar a influência do aumento da concentração do solvente no meio. As reações foram acompanhadas durante 12 horas.

Definidas as faixas de estudo das variáveis, realizou-se um conjunto de experimentos englobando grande parte das combinações possíveis, como pode ser observada na Tabela 3.3. O experimento número 7 foi realizado em triplicata a fim de se obter o desvio padrão global do experimento, o qual foi assumido igual para todas as demais cinéticas na etapa de modelagem dos dados.

3.6 Determinação das velocidades iniciais

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:

$$r = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{C - C_0}{t - t_0} \quad (3.1)$$

Onde:

r = velocidade inicial da reação ($\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$);

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. Os valores utilizados foram 356,54 g/mol e 620,99 g/mol, respectivamente para MAGs e DAGs. Para o cálculo das conversões de consumo de TAGs foi utilizado a massa molar média para o óleo de oliva que é de 876,86 g/mol.

Tabela 3.3 – Condições utilizadas nas reações de glicerólise com solvente orgânico *terc*-butanol. Agitação mecânica de 600 rpm.

Experimento	Temperatura (°C)	Relação molar G:O*	% Enzima (m/m)**	Relação solvente:substratos (v/v)***
1	70	3:1	0	1:1
2	70	3:1	2,5	1:1
3	70	3:1	2,5	5:1
4	70	3:1	10	1:1
5	70	3:1	15	1:1
6	55	3:1	15	1:1
7****	40	9:1	10	1:1
8	55	9:1	2,5	1:1
9	55	9:1	2,5	5:1
10	55	9:1	15	1:1
11	70	6:1	10	1:1
12	40	6:1	10	1:1
13	55	6:1	10	1:1
14	55	6:1	15	1:1

* Glicerol:Óleo;

** em relação a massa dos substratos óleo e glicerol;

***em relação ao volume dos substratos óleo e glicerol;

**** ensaio realizado em triplicata

3.7 Determinação da atividade enzimática (esterificação)

O procedimento adotado para determinação da atividade enzimática das lipases foi descrito por Lagnone e Sant'Anna (1999) e Bernardes *et al.* (2007) com modificações. A atividade da enzima foi quantificada pelo consumo de ácido láurico e álcool n-propílico com a razão molar ácido:álcool de 3:1, à temperatura de 60°C, com 5% (m/m) de enzima, mantida pela adição da enzima ao meio reacional em um reator de vidro aberto de 50 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (Figura 3.2). Alíquotas de 150 µL, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL de acetona:etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e extrair ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada pela titulação com hidróxido de sódio 0,01 N. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

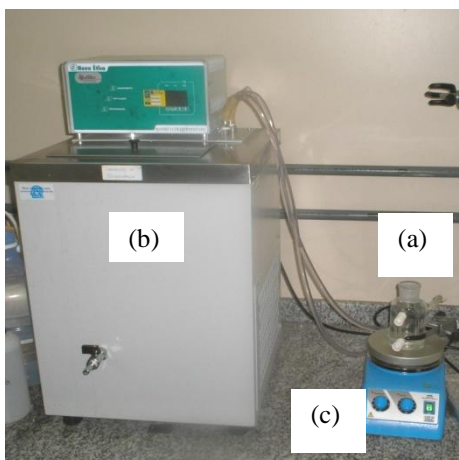


Figura 3.2 – Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática. Onde: a) reator encamisado; b) banho termostático e c) agitador magnético.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade de esterificação da lipase:

$$A_E = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_f}{t \times M_{IME} \times V_e} \quad (3.2)$$

Onde:

A_E = atividade de esterificação (μmol de ácido/ min. M_{IME} ou U/g);

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após o tempo t (mL);

M = molaridade da solução de NaOH (mmol/mL);

V_f = volume final de meio reacional (mL);

M_{IME} = massa de enzima imobilizada utilizada na reação (g);

V_e = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL);

t = tempo de reação (min).

A atividade enzimática foi determinada no tempo zero, após duas, seis e 12 horas de reação para seis condições experimentais diferentes, no qual o objetivo foi o acompanhamento da alteração da atividade das enzimas ao longo do tempo e frente à condições diversas do meio. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o resultado apresentado é relativo à média aritmética destas.

Neste trabalho, a atividade será reportada como atividade residual (%), definida como a razão entre o valor da atividade enzimática no tempo “ t ” e a inicial.

3.8 Determinação do teor de água

O teor de água foi determinado para os substratos, óleo e glicerol, utilizando o método titulométrico de *Karl Fischer* (Mettler Toledo DL 50 - Graphix). O teor de água foi estimado tomando-se por base a quantidade de reagente (com seu respectivo fator de correção) necessária para titular a água presente na alíquota da amostra ensaiada. O cálculo foi feito utilizando a seguinte equação:

$$Umidade = \left(\frac{v \times fc}{AAE} \right) \quad (3.3)$$

Onde:

v = volume de reagente de *Karl Fischer* gasto para titular a água presente na amostra (ml)

fc = fator de correção do equivalente em água capaz de ser neutralizado pelo reagente de *Karl Fischer*

AAE = alíquota de amostra ensaiada (mL)

Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.9 Modelagem matemática da reação de glicerólise

Este trabalho teve também como objetivo a modelagem da cinética da produção de MAGs e DAGs a partir de óleos vegetais e glicerol.

Considerando a complexidade dos mecanismos cinéticos que envolvem reações enzimáticas, os quais, nem sempre são claros, se propôs neste trabalho, a obtenção de um modelo matemático para glicerólise enzimática, desconsiderando as etapas de formação de complexos enzimáticos, bem como, a separação da enzima dos produtos finais, entre outras. Em relação à influência da presença da enzima na reação, apenas adicionou-se um parâmetro empírico de redução da atividade enzimática aparente, o qual considera a redução pelo excesso de glicerol e a redução por perda natural de atividade. Esta abordagem é tratada como Mecanismo cinético 1.

O modelo obtido com o Mecanismo cinético 1 foi comparado com outra modelagem matemática realizada (Anexo 1) por Voll (2010), onde todas as etapas envolvendo a formação de complexos enzimáticos foram consideradas, bem como a desativação enzimática aparente citada anteriormente. Esta abordagem é tratada como Mecanismo cinético 2.

Dentro da abordagem do Mecanismo cinético 1, fez-se, inicialmente, testes com dados experimentais da literatura (Yang *et al.*, 2005a), para verificar o ajuste utilizando as equações cinéticas sugeridas para as reações de glicerólise e eventual hidrólise. Os dados de Yang *et al.* (2005a) referem-se à reação em batelada de glicerólise com e sem solvente orgânico (*tert*-butanol) utilizando óleo de girassol e enzima Novozym 435. As condições de operação utilizadas por estes autores foram: para a reação sem solvente: 40°C, relação glicerol:óleo de 4,5:1,

10% de enzima em relação à massa dos substratos e 500 rpm e nas reações com solvente (2:1 em relação ao óleo) a temperatura foi de 45°C, a relação glicerol:óleo foi de 4,5:1, 15% de enzima e 500 rpm. A partir do modelo ajustado com os dados de Yang *et al.* (2005a) foram simuladas algumas diferentes condições de entrada para a reação de glicerólise. Estas condições simuladas também foram testadas experimentalmente para avaliar a confiabilidade da indicação deste modelo desenvolvido, principalmente em relação à maximização da produção de DAGs. Posteriormente, os dados cinéticos obtidos na primeira etapa do presente trabalho foram utilizados para o desenvolvimento dos modelos, em ambas as abordagens (Mecanismo cinético 1 e Mecanismo cinético 2).

Em todos os casos, o sistema de equações diferenciais ordinárias, estabelecido para cada mecanismo, foi implementado e resolvido no software Matlab 7.0, usando a rotina *ode23s*. Para a estimação de parâmetros cinéticos da reação foi empregado o Método de estocástico Enxame de Partículas (Particle Swarm Optimization), como subrotina no Matlab 7.0, conforme apresentado por Ferrari (2008) para a busca inicial dos parâmetros os quais eram então usados como estimativa inicial no método determinístico.

- CAPÍTULO 4 -

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados o desenvolvimento e validação da metodologia de análise de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs, vários estudos cinéticos realizados para investigação da influência das variáveis da reação e os resultados do estudo de modelagem matemática da cinética da reação de glicerólise.

4.1 Desenvolvimento de metodologia para análise de MAGs, DAGs, TAGs e AGL

4.1.1 *Preparo e análise das soluções de calibração*

As equações obtidas com as curvas padrões (concentração versus área) para cada componente podem ser observadas nas Figuras 4.1 a 4.4. Cada ponto representado nas figuras é uma média da triplicada realizada.

Assim, a partir das curvas de calibração foram obtidas as seguintes equações da reta: $Y = 0,0000325.X$; $Y = 0,0000513.X$; $Y = 0,0000634.X$; $Y = 0,0000434.X$, respectivamente para MAGs, DAGs, TAGs e AGLs, onde Y = concentração (ppm ou mg/L) e X = Área (UA). O resultado encontrado para cada composto, utilizando a curva de calibração, era dividido pela concentração inicial da amostra e multiplicado por 100. Foram obtidos, assim, resultados em porcentagem do componente em relação a massa total da amostra (% m/m). Em relação à quantificação do glicerol, optou-se por determiná-lo por diferença entre a massa total e a soma dos demais constituintes.

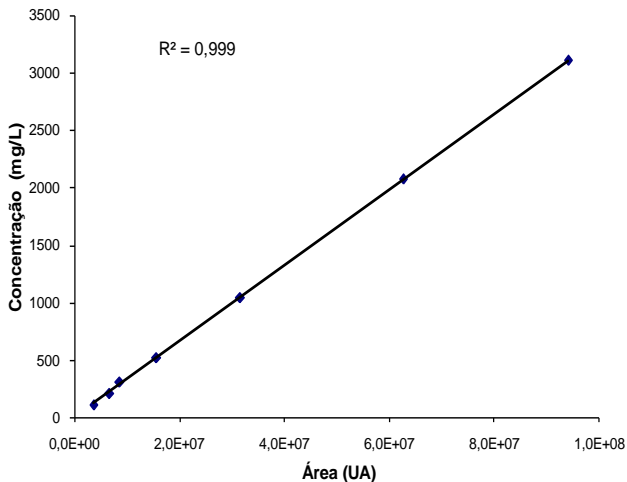


Figura 4.1 – Curva padrão para determinação por cromatografia gasosa da monooleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.

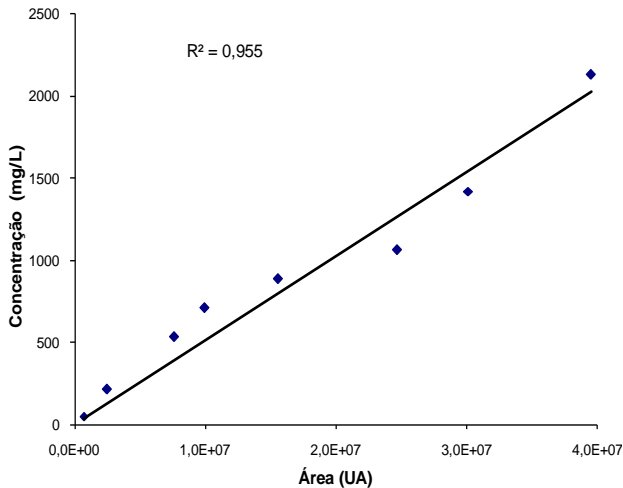


Figura 4.2 – Curva padrão para determinação por cromatografia gasosa da dioleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.

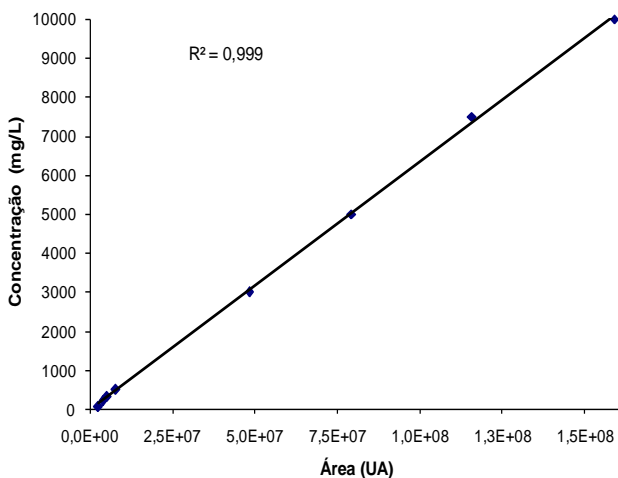


Figura 4.3 – Curva padrão para determinação por cromatografia gasosa da trioleína. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.

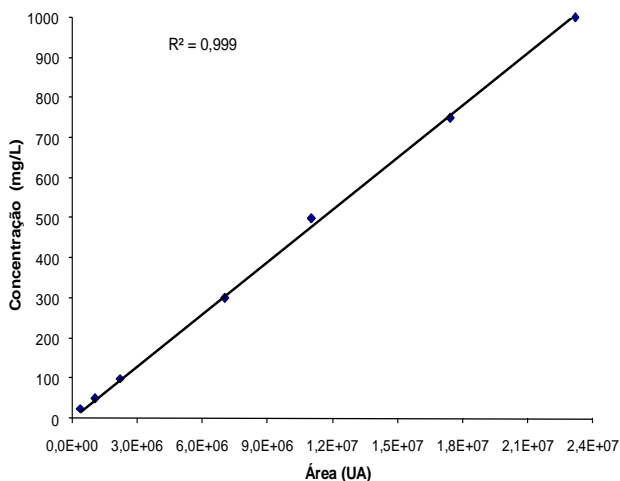


Figura 4.4 – Curva padrão para determinação por cromatografia gasosa do ácido oléico. Condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 3.2.1.

Dois cromatogramas típicos obtidos nas análises de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs, utilizando a Norma Européia de Padronização nº 14105 (2001), encontram-se a seguir, para exemplificação. A Figura 4.5(a) corresponde ao tempo zero de uma determinada reação, e a Figura 4.5(b) corresponde à mesma amostra após 8 horas de reação.

As áreas entre 4,5 a 5,5 minutos correspondem à região de glicerol, de 10,5 a 12,5 minutos corresponde à região de AGLs, de 15 a 19 minutos corresponde à região de MAGs, de 23 a 28 minutos corresponde à região de DAGs e de 30 a 35 minutos corresponde à região de TAGs.

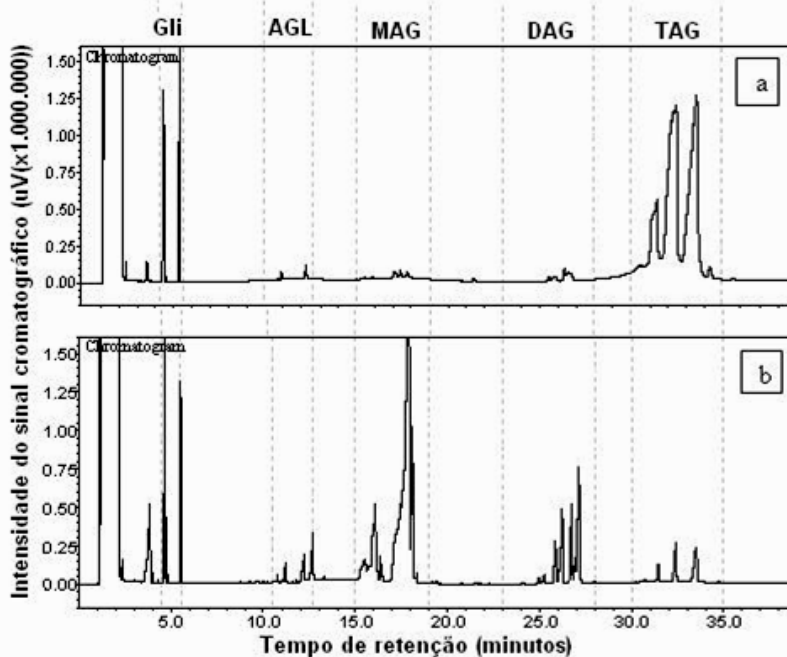


Figura 4.5 – Perfis obtidos por cromatografia gasosa típicos da análise de reações de glicerólise. (a) tempo zero de reação. (b) tempo de reação: 8h.

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

4.1.2 Validação das curvas padrões

Na Tabela 4.1 são apresentadas as concentrações de amostras sintéticas preparadas com o intuito de validar as curvas de calibração obtidas. Nesta tabela são apresentados os valores obtidos pelas equações através das áreas obtidas das análises cromatográficas e o erro percentual calculado para as amostras analisadas. A média do erro de análise por cromatografia gasosa foi de 4,89% para MAGs, 9,13% para DAGs e 6,63% para TAGs. Foram considerados, assim, erros aceitáveis e as curvas de calibração válidas para serem utilizadas nas análises das reações de glicerólise.

4.2 Estudo da cinética enzimática na presença de solvente orgânico

No presente trabalho, utilizou-se o solvente orgânico *tert*-butanol e os resultados das cinéticas aqui apresentados estão em termos de fração mássica do sistema em base livre de solvente e de glicerol. O detalhamento dos resultados obtidos encontra-se no Apêndice B. A Tabela 4.2 apresenta as velocidades iniciais de formação de DAGs e MAGs e de consumo de TAGs de cada cinética, as quais foram calculadas para os primeiros 60 minutos de reação, os quais corresponderam à faixa linear da curva. No decorrer do item 4.2 estão discutidos os resultados obtidos para as velocidades iniciais de formação dos produtos.

Tabela 4.1 – Concentrações das amostras sintéticas e resultados obtidos por análise em cromatografia gasosa para validação das curvas de calibração, com os respectivos erros seguidos, entre parênteses, pelos desvios padrões.

Amostra		% MAGs	% erro*	% DAGs	% erro*	% TAGs	% erro*
1	Adicionado	19,22	1,04	16,84	4,38	52,82	4,75
	Quantificado	19,02	(±0,141)	16,10	(±0,523)	50,31	(±1,775)
2	Adicionado	27,43	10,72	25,08	20,74	39,23	1,93
	Quantificado	30,37	(±2,079)	19,88	(±3,677)	38,47	(±0,537)
3	Adicionado	19,22	5,93	16,84	2,44	52,82	17,92
	Quantificado	20,36	(±0,806)	17,25	(±0,289)	43,36	(±6,689)
4	Adicionado	27,43	3,06	25,08	14,58	39,23	7,84
	Quantificado	28,27	(±0,594)	21,42	(±2,588)	36,15	(±2,178)
5	Adicionado	28,71	7,63	29,67	8,47	35,24	4,61
	Quantificado	26,52	(±1,548)	32,18	(±1,775)	36,87	(±1,152)
6	Adicionado	28,71	0,94	29,67	4,18	35,24	2,71
	Quantificado	28,44	(±0,191)	30,91	(±0,877)	36,20	(±0,678)

* Erro = ((|valor adicionado – valor quantificado|)/valor adicionado)

Tabela 4.2 – Velocidades iniciais das cinéticas estudadas em relação à formação de MAGs e DAGs e ao consumo de TAGs. Valores para uma base de cálculo de 100 g de substratos.

Temperatura (°C)	Relação molar G:O*	% Enzima imobilizada (m/m)	Relação volumétrica S:M**	r₀ (mmol.min⁻¹) DAGs	r₀ (mmol.min⁻¹) MAGs	r₀ (mmol.min⁻¹) TAGs
70	3:1	0	1:1	0,0257	0,0173	-0,0264
70	3:1	2,5	1:1	0,1551	0,5138	-0,3326
70	3:1	2,5	5:1	0,1837	0,5476	-0,4945
70	3:1	10	1:1	0,3936	1,8724	-1,0984
70	3:1	15	1:1	0,5011	2,0215	-1,2005
55	3:1	15	1:1	0,3271	1,9938	-1,0725
40***	9:1	10	1:1	0,1078	1,0161	-0,5024
55	9:1	2,5	1:1	0,0684	0,5489	-0,2942
55	9:1	2,5	5:1	0,1099	0,7677	-0,3888
55	9:1	15	1:1	0,2330	1,4741	-0,8257
70	6:1	10	1:1	0,2933	1,9400	-1,0397
40	6:1	10	1:1	0,1869	1,3238	-0,6993
55	6:1	10	1:1	0,2283	2,0470	-1,0230
55	6:1	15	1:1	0,3604	2,3506	-1,2303
55	0,33:1	10	1:1	1,0488	0,3291	-0,8945
55	0,8:1	10	1:1	0,5725	0,3138	-0,5492
55	3:1	15	0	0,5854	0,1792	-0,4943

*Glicerol:Óleo; **Solvente:Mistura; *** Média da triplicata.

4.2.1 Influência da concentração de enzima imobilizada no meio reacional

Na Figura 4.6 está apresentada uma cinética de reação de glicerólise sem a presença da enzima (catalisador). Pode-se observar que a reação de glicerólise não é auto-catalítica e a velocidade da reação é praticamente zero, confirmado a afirmação feita por Yang *et al.* (2005a), de que esta reação em temperaturas amenas e sem adição de catalisador condez à velocidades de reação extremamente baixas, podendo demorar semanas para ocorrer a formação de algum produto. A partir deste experimento evidencia-se então, a importância do uso de enzimas em reações de glicerólise em condições amenas de temperatura.

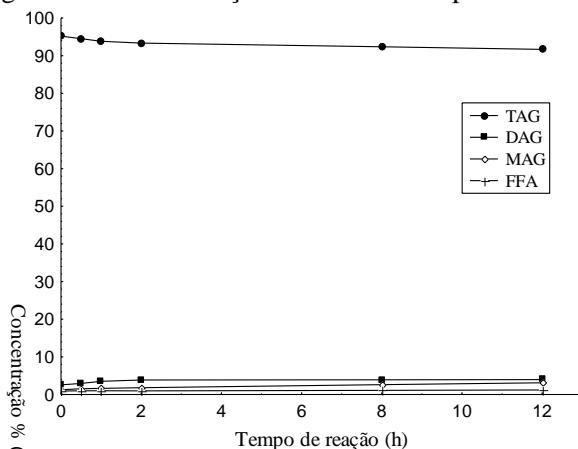


Figura 4.6 – Cinética da reação de glicerólise sem adição de enzima. Condições: 70°C, relação molar G:O de 3:1 e 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.

Na Figura 4.7 são comparadas três cinéticas realizadas nas mesmas condições, porém variando a concentração de enzima utilizada nas reações. Pode ser observado a partir das Figuras 4.7(a) e (b) que o aumento da concentração do catalisador aumenta a velocidade da reação, o que fica evidenciado ao se observar as velocidades iniciais obtidas: 0,514 e 1,872 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ para produção de MAGs e 0,155 e 0,394 $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$ para a produção de DAGs, respectivamente para as reações com 2,5 e 10% (m/m) de enzima no meio reacional. Porém, a

partir da Figura 4.7(c) observa-se que a variação na concentração de enzima de 10 para 15% (m/m) pouco altera o comportamento cinético, principalmente em relação ao rendimento, após 12 horas de reação, em MAGs (55,6 e 56,4% (m/m), respectivamente). Observando as velocidades iniciais desta última cinética (com 15% de enzima (m/m)), os valores obtidos se aproximam aos da cinética com 10% de enzima (m/m): 2,021 e 0,501 mmol.min⁻¹ para produção de MAGs e DAGs, respectivamente.

Segundo Watanabe *et al.* (2003), Yang *et al.* (2005a), Damstrup *et al.* (2007) e Valério *et al.* (2009b), a partir de uma determinada concentração de enzima, podem ocorrer limitações de homogeneidade do meio pela formação de agregados, o que afetaria a transferência de massa pela dificuldade de contato entre o sítio ativo da enzima com os substratos, fato que poderia inclusive prejudicar o rendimento nos produtos finais.

Assim, deste grupo de experimentos pode-se observar que o aumento da concentração de enzima de 10 a 15% (m/m) não se justifica, ou mesmo pode ser desnecessário, uma vez que os rendimentos dos produtos finais são pouco influenciados.

4.2.2 *Influência da temperatura da reação*

Na Figura 4.8 são comparadas as cinéticas realizadas em diferentes temperaturas na faixa de 40 a 70°C. Em relação à temperatura de reação, a partir da Figura 4.8, não observa-se influência significativa da temperatura na faixa de 55 a 70°C na velocidade da reação, uma vez que com duas horas de reação os rendimentos atingiram valores acima de 50% (m/m) para MAGs e acima de 13% (m/m) para DAGs para ambas as cinéticas. As velocidades iniciais foram muito próximas para as reações na temperatura de 55 e 70°C: 2,047 e 1,940 mmol.min⁻¹ para a produção de MAGs e 0,228 e 0,293 mmol.min⁻¹ para a produção de DAGs, respectivamente. A temperatura de 40°C apresentou um perfil semelhante às demais temperaturas, tendo, porém uma velocidade inicial da reação menor (1,324 e 0,187 mmol.min⁻¹ para a produção de MAGs e DAGs, respectivamente). No entanto, ao final das 12 horas de reação a 40°C foi obtido um rendimento em DAGs semelhante ao experimento a 55°C (19,0 e 18,4% (m/m), para as reações a 40 e 55°C, respectivamente) e rendimento em MAGs em torno de 5 e 8% (m/m) menor que as reações a 55 e 70°C, respectivamente.

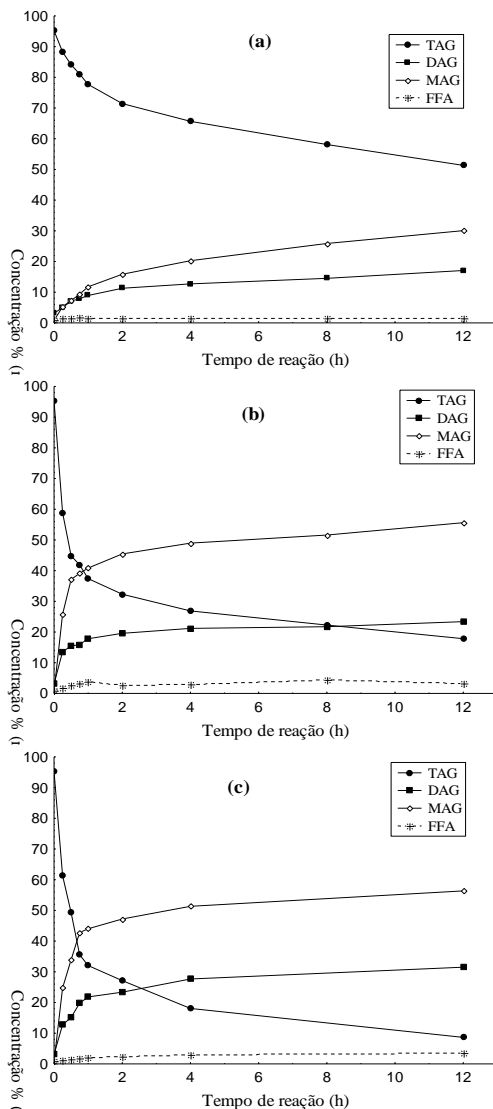


Figura 4.7 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 70°C, relação molar G:O de 3:1, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Concentração de enzima imobilizada Novozym 435 em relação a mistura glicerol e óleo (m/m): (a) 2,5%, (b) 10% e (c) 15%. Resultados em base livre de solvente e glicerol.

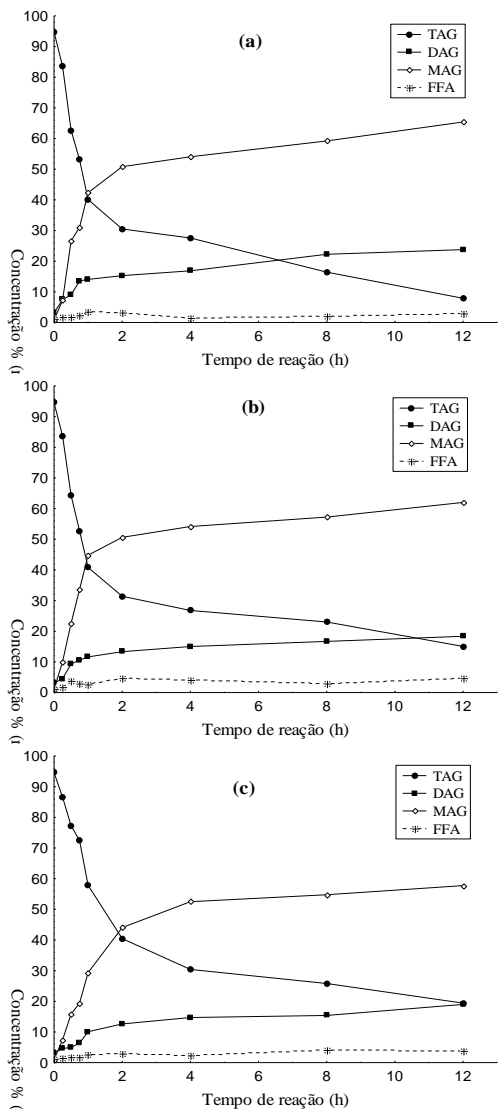


Figura 4.8 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas com relação molar G:O de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Temperatura de reação: (a) 70°C, (b) 55°C e (c) 40°C. Resultados em base livre de solvente e glicerol.

A faixa de temperatura de atuação da Novozym 435 é entre 40 a 70°C (Damstrup *et al.*, 2006a). Os resultados observados nas Figuras 4.8(a), (b) e (c) estão de acordo com resultados encontrados na literatura. Por exemplo, Yang *et al.* (2005b) avaliaram o efeito de temperatura na glicerólise enzimática de óleo de girassol em um sistema livre de solvente e de surfactante, utilizando 10% (m/m) de enzima (Novozym 435), relação molar de glicerol:óleo de 4.5:1, 500 rpm de agitação e temperaturas de 40°C e 70°C. Depois de 24 horas de reação, a conversão em MAGs alcançou 16 % (m/m) a 40°C, o mesmo valor que foi observado com 5 horas de reação a 70°C (com 8% (m/m) de enzima Novozym 435). Pawongrat *et al.* (2007) estudaram o efeito da temperatura na produção de MAGs de óleo de atum com enzima lipase IM12 AK. Eles observaram que na faixa de temperatura de 30 a 45°C, a produção de MAGs aumentou com o aumento da temperatura. Cabe enfatizar que a temperatura apresenta um papel importante no sistema reacional. Um aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e o processo de difusão entre os substratos, e assim, limitações de transferência de massa podem ser reduzidas acarretando em aumento da velocidade de reação. Por outro lado, a redução da atividade da enzima pode ser acelerada com o aumento da temperatura.

4.2.3 *Influência da relação molar de glicerol:óleo*

Na Figura 4.9 pode-se observar a influência da relação molar de glicerol:óleo, de 3:1 a 9:1, utilizando 55°C, 15% (m/m) de enzima e relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 (v/v). As cinéticas utilizando relação molar de glicerol:óleo de 3:1 e 6:1 apresentaram semelhante comportamento no rendimento de DAGs ao longo da reação, inclusive com velocidades iniciais bem próximas, 0,327 e 0,360 mmol.min⁻¹, respectivamente para relação 3:1 e 6:1. Por outro lado, para a relação molar de 9:1, a velocidade inicial da reação foi de 0,233 mmol.min⁻¹. É interessante observar que o rendimento de DAGs é maior quanto menor a relação molar de glicerol:óleo. Ao final das 12 h de reação, para as cinéticas com relação molar 3:1 e 6:1, a concentração de DAGs é cerca de 23% (m/m) em ambas e, para a relação molar 9:1 é cerca de 13% (m/m). A indicação de que a diminuição da concentração de glicerol aumenta a produção de DAGs vem a colaborar com o

entendimento de resultados semelhantes apresentados por Moquin *et al.* (2005); Moquin *et al.* (2006) e Cheirsilp *et al.* (2007).

Por outro lado, o rendimento em MAGs, ao final das 12 horas de reação, é claramente influenciado pelo aumento da relação molar de glicol:óleo, cerca de 54, 64 e 73% (m/m) para as relações molares de glicol:óleo de 3:1, 6:1 e 9:1, respectivamente. Esta afirmação fica clara ao ser observado as velocidades iniciais na formação de MAGs, para as condições com 3:1 e 6:1 que foram de 1,994 e 2,351 mmol.min⁻¹, respectivamente. A cinética utilizando a relação molar de glicerol:óleo de 9:1 conduziu a uma velocidade inicial mais baixa, 1,474 mmol.min⁻¹, aparentemente pelo aumento da viscosidade do meio causada pela grande quantidade de glicerol e conseqüente diminuição da transferência de massa inicial. Porém, a partir de 8 horas de reação, o rendimento desta última reação ultrapassou as outras duas cinéticas que utilizaram relação molar de glicerol:óleo de 3:1 e 6:1.

4.2.4 *Influência da relação volumétrica de solvente:substratos (glicerol e óleo)*

Na Figura 4.10 é apresentada a comparação das cinéticas realizadas em duas diferentes relações do solvente *tert*-butanol na mistura glicerol/óleo, 1:1 e 5:1 (v/v). Na cinética a 70°C, com 2,5% (m/m) de enzima e relação molar glicerol:óleo de 3:1 (Figura 4.10(a)), o aumento de 1 para 5 na relação de solvente na mistura, alterou consideravelmente o perfil da reação. Esta diferença foi observada principalmente nas primeiras 4 horas da reação. Porém, ao final da reação (12 horas), as diferenças no rendimento de MAGs e DAGs entre as duas reações diminuiram. Os rendimentos finais foram em torno de 36 e 30% (m/m) para MAGs e 22 e 17% (m/m) para DAGs, na reação com relação volumétrica maior (5:1) e menor (1:1), respectivamente. A velocidade inicial das cinéticas foi pouco afetada pelo aumento do solvente no meio. Foram obtidas velocidades iniciais de 0,547 e 0,514 mmol.min⁻¹ para a formação de MAGs e 0,155 e 0,184 mmol.min⁻¹ para a formação de DAGs, respectivamente, para as reações com relação volumétrica de 5:1 e com 1:1.

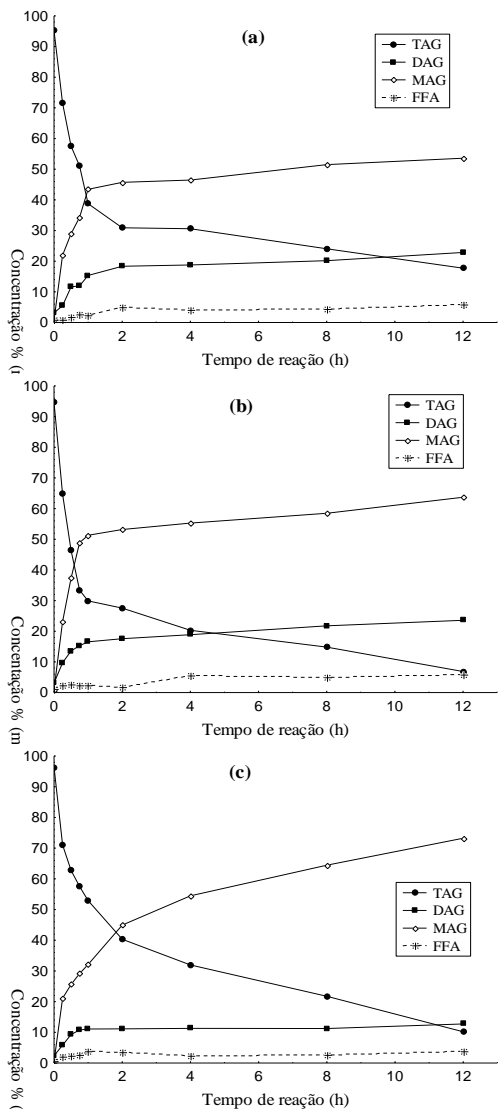


Figura 4.9 – Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Relação molar de G:O: (a) 3:1, (b) 6:1 e (c) 9:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol.

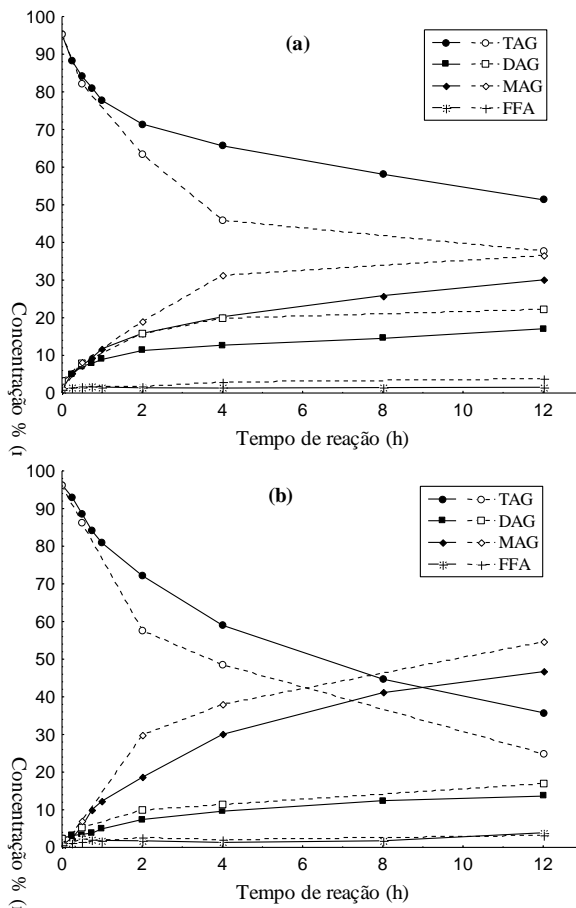


Figura 4.10 – (a) Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 70°C, 2,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, relação molar G:O de 3:1. (b) Cinéticas da reação de glicerólise enzimática realizadas a 55°C, 2,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, relação molar G:O de 9:1. Linhas contínuas (1): relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Linhas pontilhadas (2): relação solvente:mistura glicerol e óleo de 5:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.

A mesma comparação foi realizada para as reações a 55°C, com 2,5% (m/m) de enzima e relação molar de glicerol:óleo de 9:1 (Figura

4.10(b)). Nestas condições o aumento de 1 para 5 na relação de solvente na mistura, apresentou influência positiva no rendimento em MAGs, ao final da reação (cerca de 55 e 47% (m/m), para relação volumétrica 5:1 e 1:1, respectivamente). Por outro lado, o rendimento de DAGs apresentou valores próximos nas duas reações (cerca de 17 e 14% (m/m), para a relação volumétrica de 5:1 e 1:1, respectivamente). Em relação às velocidades iniciais, para estas cinéticas, as diferenças ficaram levemente mais pronunciadas, 0,768 e 0,549 mmol.min⁻¹ para a formação de MAGs e 0,110 e 0,068 mmol.min⁻¹ para a formação de DAGs, respectivamente, para as reações com relação volumétrica de 5:1 e com 1:1.

Yang *et al.* (2005b) compararam o rendimento em MAGs de reações de glicerólise em batelada a 40°C, razão molar glicerol:óleo de 4,5:1, 15% (m/m) de enzima Novozym 435 (em relação a massa de óleo e glicerol), em diferentes concentrações de solvente *tert*-butanol no meio reacional. O grupo avaliou razões mássicas de solvente:óleo de 1:1; 1,5:1; 2,2:1 e 3:1 e obteve rendimentos em MAGs em torno de 64, 70, 68 e 68%, respectivamente, concluindo assim que o aumento da relação mássica solvente:óleo acima de 1,5:1 não beneficiava a reação e justificaram pelo fato da maior concentração de solvente no meio reduzir a concentração do substratos no meio reacional. Yang *et al.* (2005b) afirmam ainda que, aumentos acima da relação mássica de 1,5:1 começam a reduzir, inclusive, a velocidade inicial da reação.

Ainda, Damstrup *et al.* (2006) realizaram testes de glicerólise em reator contínuo, utilizando uma mistura de *tert*-butanol e *tert*-pentanol (80:20 – v/v), em diferentes concentrações do meio: 0; 28; 44; 54 e 61% (m/m) em relação aos substratos e observaram que até a concentração de 54% há diferença significativa positiva em relação ao rendimento em MAGs e que acima desta não há melhora no rendimento.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que as diferenças observadas nos rendimentos finais de MAGs e DAGs utilizando o aumento de cinco vezes no volume de solvente não parecem ser consideráveis. Este aumento no volume de solvente parece ser desnecessário, ou provavelmente não se justifica, pelo menos em relação à implicação de dimensionamento de equipamento, gasto energético e tempo que a separação do solvente requer em uma etapa posterior.

Como uma forma de comparação dos resultados obtidos, cita-se o estudo recente de Valério *et al.* (2009a), onde foi realizada uma modelagem da cinética similar ao presente trabalho, porém com dados

experimentais de glicerólise enzimática de óleo de oliva em sistema livre de solvente e utilizando surfactante. Este estudo envolveu a investigação de variáveis como temperatura, concentração de enzima e surfactante e relação molar de glicerol:óleo. Conteúdos estimados de MAGs e DAGs (>35% (m/m)) foram obtidos em temperatura de 50°C, com quantidade de enzima relativamente baixa (9% m/m) em 4 horas de reação. Assim, nota-se que utilizando o *terc*-butanol como solvente, maiores rendimentos em MAGs e DAGs são obtidos.

4.2.5 *Determinação do erro experimental*

No decorrer dos experimentos houve a preocupação de mensurar os erros sistemáticos e aleatórios envolvidos no processo de glicerólise enzimática utilizando o solvente *terc*-butanol. Considerou-se que frente ao fato de a amostragem ser do tipo destrutiva, da necessidade de separação da enzima do meio reacional e da eliminação do excesso de solvente, uma avaliação neste sentido fazia-se necessária. Após estas etapas para obtenção das amostras, estas ainda passaram por derivatização e diluição antes de serem encaminhadas para a análise cromatográfica. Assim, foram realizadas três cinéticas nas mesmas condições experimentais e a reprodutibilidade destas foi avaliada. A Figura 4.11 apresenta o resultado da triplicata das cinéticas realizadas para o cálculo do erro experimental, o qual também foi utilizado na modelagem dos dados cinéticos realizados na sequência do presente trabalho.

Os resultados obtidos foram expressos pelo desvio padrão dos experimentos realizados para cada tempo de amostragem. Em relação a MAGs o desvio padrão foi de $\pm 1,85$ a $\pm 4,05\%$ (sendo o maior desvio no tempo de 12 horas de reação), em relação ao DAGs variou de $\pm 1,11$ a $\pm 2,89\%$ (sendo o maior desvio no tempo de 8 horas de reação), em relação ao TAGs foi de $\pm 1,26$ a $\pm 4,87\%$ (sendo o maior desvio no tempo de 2 horas de reação) e em relação a AGLs variou entre $\pm 0,1$ a $\pm 1,48\%$ (sendo o maior desvio no tempo de 12 horas de reação). Estes resultados mostram que apesar da grande manipulação na obtenção e preparo das amostras, a reprodutibilidade experimental pode ser considerada.

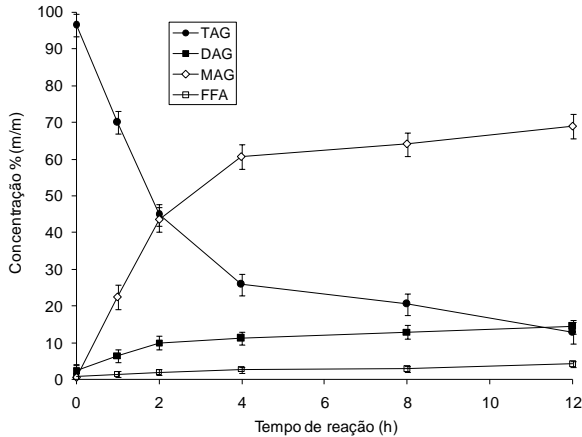


Figura 4.11 – Cinética da reação de glicerólise enzimática realizada em triplicata para avaliação do erro experimental. Condições utilizadas: 40°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, relação molar G:O de 9:1, 600 rpm e relação solvente:mistura glicerol e óleo de 1:1 (v/v). Resultados em base livre de solvente e glicerol.

4.3 Medida da atividade enzimática

4.3.1 Influência da temperatura e relação molar de glicerol:óleo

As medidas das atividades enzimáticas residuais foram determinadas ao longo das 12 primeiras horas de reação de algumas condições experimentais aleatórias em que diferentes temperaturas e relações molar de glicerol:óleo foram utilizadas, como se pode observar na Figura 4.12. Nestas cinéticas foram utilizados 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos, relação solvente:mistura de 1:1 (v/v) e agitação de 600 rpm.

Observa-se que as condições experimentais que mais mantiveram a atividade enzimática são as correspondentes à temperatura de 40°C e a menor relação molar glicerol:óleo (0,8:1), sendo o fator predominante a quantidade de glicerol, pois nas reações a 70°C, a atividade residual também foi maior na condição de menor relação molar glicerol:óleo.

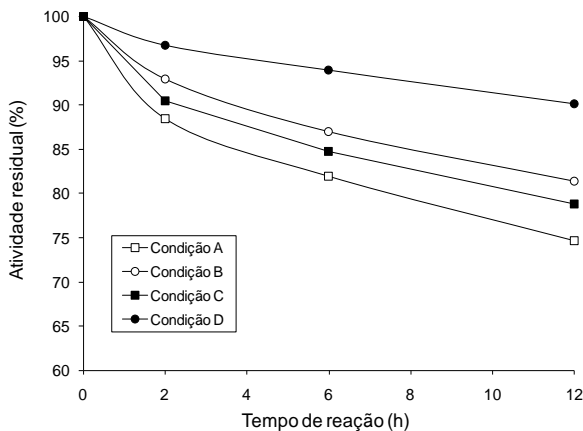


Figura 4.12 – Medida das atividades enzimáticas residuais ao longo da glicerólise enzimática de óleo de oliva. Onde: Condição A: 70°C e relação molar G:O de 9:1; Condição B: 70°C e relação molar G:O de 0,8:1; Condição C: 40°C e relação molar G:O de 9:1; Condição D: 40°C e relação molar G:O de 0,8:1.

Estes resultados foram associados também, com uma avaliação visual realizada no momento do preparo das enzimas para o teste de atividade. Para as enzimas que foram utilizadas nas reações com relação molar de glicerol:óleo de 9:1, a eliminação do glicerol aderido nestas tornava-se uma etapa crítica, pois a lavagem com hexano tinha que ser feita inúmeras vezes até conseguir a máxima remoção do glicerol aderido para que a análise pudesse ser realizada. Assim, percebe-se claramente que o excesso de glicerol tende a formar 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 desejáveis.

Comportamentos como este podem ser decisivos na escolha do modo de condução da reação. Sabe-se que o glicerol é hidrofílico e insolúvel em lipídeos, assim, ele é facilmente adsorvido na superfície da lipase imobilizada resultando em um efeito negativo para a atividade da lipase e estabilidade da reação. Frente a esta situação, vários métodos têm sido propostos para eliminar o efeito negativo causado pelo glicerol, entre eles, a adição de sílica gel no meio reacional para adsorver o glicerol e a lavagem das lipases com alguns solventes orgânicos

periodicamente para remoção da “camada” de glicerol. Porém, é visto que qualquer uma destas propostas irá aumentar a complexidade operacional da reação (Selmi e Thomas, 1998; Yang *et al.*, 2005; Su e Wei, 2008). Nas cinéticas em que as reações utilizaram relação molar glicerol:óleo de 9:1 (Figuras 4.9(c); 4.10(b) e 4.11) observou-se velocidades iniciais baixas e somente ao final das reações é que rendimentos maiores em MAGs começam a ser obtidos, comparado com as demais condições. Nestes casos, o efeito negativo do excesso de glicerol conduziu à diminuição nas velocidades das reações.

Em relação ao resultado que indica a maior perda de atividade a 70°C do que a 40°C, apesar de 70°C ser a temperatura ótima indicada pelo fabricante da Novozym 435, a temperatura da reação tem influência significativa na atividade e estabilidade das lipases. Temperaturas mais altas podem ativar as moléculas dos substratos, reduzir a viscosidade do meio reacional e aumentar a velocidade inicial da reação. Porém temperaturas acima de 65°C levam a uma maior velocidade de desativação das lipases, além de aumentar a perda do solvente do meio por evaporação (Cheong *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009).

Kaewthong e H-Kittikun (2004), em seu estudo sobre glicerólise enzimática (com lipase de *Pseudomonas* sp.) de óleo de palma utilizando como solvente uma mistura de acetona/isooctano (3:1), obtiveram após 24 horas de reação, nas temperaturas de 0 e 45°C, perda de atividade enzimática em torno de 10 e 20%, respectivamente.

4.3.2 *Efeito da concentração de solvente orgânico terc-butanol no meio reacional*

O efeito na atividade enzimática do aumento da concentração de solvente no meio reacional foi avaliado. A Figura 4.13 apresenta uma comparação entre a perda de atividade enzimática para uma cinética utilizando relações volumétricas de solvente:substratos de 1:1 e 5:1 (v/v). Nestas cinéticas utilizou-se 10% (m/m) de enzima, temperatura de 55°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e agitação magnética de 600 rpm.

Com os resultados obtidos, pode-se observar (Figura 4.13) que o aumento da concentração de solvente no meio (de 1:1 para 5:1 – v/v), afetou levemente a atividade enzimática ao longo da reação, não ultrapassando 3% de perda adicional ao final das 12 horas de acompanhamento.

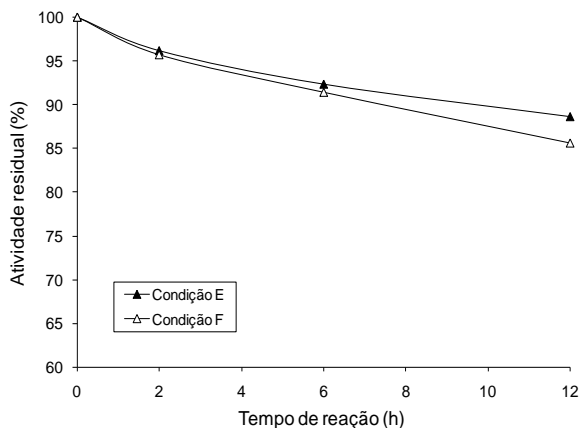


Figura 4.13 – Medida das atividades enzimáticas residuais ao longo da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva. Onde: Condição E: relação volumétrica solvente:mistura de 1:1 (v/v) e Condição F: relação volumétrica solvente:mistura de 5:1 (v/v).

Kumari *et al.* (2009) no estudo de transesterificação enzimática (utilizando lipase imobilizada) de óleo de *Jatropha curcas*, afirmam que a presença do terc-butanol retarda a inativação da enzima pelo glicerol, permitindo a sua estabilidade e reutilização por várias vezes. Estes autores não encontram perdas significativas na atividade da enzima pelo contato com o solvente, durante os sete primeiros ciclos testados (60 horas cada ciclo/reação), somente após 20 ciclos, chegou-se a 50% na perda da atividade, a qual foi atribuída principalmente aos danos causados à enzima durante as etapas de filtração e secagem em que eram submetidas entre cada ciclo e, em pequena parte, devido a longa interação com o solvente terc-butanol.

4.4 Determinação do teor de água

A estimativa do teor de água no meio reacional torna-se importante diante do fato de que dependendo da concentração de água presente, os substratos podem ser direcionados à reações de hidrólise. Isto poderá acarretar na competição entre as etapas da reação de glicerólise na formação dos produtos finais. Os resultados de teor de

água nos substratos são apresentados na Tabela 4.3. As determinações foram realizadas utilizando o método titulométrico *Karl Fischer* conforme descrito no item 3.8 (Capítulo 3).

Tabela 4.3 - Conteúdo inicial de água nos substratos da reação de glicerólise. Os resultados representam a média seguida pelo desvio padrão experimental entre parênteses.

	% Teor de água
Glicerol	2,3 ($\pm 0,3$)
Azeite de oliva	0,87 ($\pm 0,08$)

Assim, pelos resultados obtidos, optou-se por utilizar como informação de entrada para a modelagem matemática dos dados experimentais deste trabalho, o conteúdo inicial de água de 3% no glicerol.

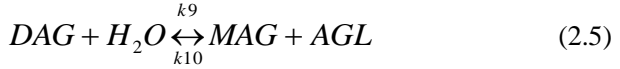
Como visto no Capítulo 2, estima-se que as etapas de hidrólise podem ocorrer paralelamente a de glicerólise tendo a partir de 4% de água no glicerol. Lembrando ainda que, às vezes, a água é inadequadamente incorporada ao meio, devido à natureza hidrofílica do glicerol, o qual pode absorvê-la durante a reação (Temelli *et al.*, 1996).

4.5 Modelagem matemática

4.5.1 Mecanismo cinético 1

Nesta primeira abordagem proposta utilizou-se as equações cinéticas apresentadas no item 2.5 (Capítulo 2, página 10), sendo para as etapas de glicerólise as Equações (2.1) a (2.3) e para as etapas de hidrólise as Equações (2.4) a (2.6) (que ocorrem paralelamente se houver presença de água suficiente no sistema), como segue:





Onde: *TAG*, *DAG*, *MAG*, *AGL*, *Gly* e *H₂O* são as frações molares em termos de triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicerol e água, respectivamente.

A partir destas equações de reações propostas e do balanço de massa realizado, em reator batelada para cada componente, obtêm-se as seguintes equações diferenciais que envolvem a produção de MAGs e DAGs (equações das velocidades das reações):

$$\begin{aligned} \frac{dTAG}{dt} = & -k_1(Gly)(TAG) + k_2(DAG)(MAG) - k_5(TAG)(MAG) + k_6(DAG)^2 \\ & - k_7(TAG)(H_2O) + k_8(DAG)(AGL) \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \frac{dDAG}{dt} = & k_1(Gly)(TAG) - k_2(DAG)(MAG) - k_3(Gly)(DAG) + k_4(MAG)^2 \\ & + 2k_5(TAG)(MAG) - 2k_6(DAG)^2 + k_7(TAG)(H_2O) - k_8(DAG)(AGL) \\ & - k_9(DAG)(H_2O) + k_{10}(MAG)(AGL) \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} \frac{dMAG}{dt} = & k_1(Gly)(TAG) - k_2(DAG)(MAG) + 2k_3(Gly)(DAG) - 2k_4(MAG)^2 \\ & - k_5(TAG)(MAG) + k_6(DAG)^2 + k_9(DAG)(H_2O) - k_{10}(MAG)(AGL) \\ & - k_{11}(H_2O)(MAG) + k_{12}(Gly)(AGL) \end{aligned} \quad (4.3)$$

$$\frac{dGly}{dt} = -k_1(Gly)(TAG) + k_2(DAG)(MAG) - k_3(Gly)(DAG) + k_4(MAG)^2 + k_{11}(MAG)(H_2O) - k_{12}(Gly)(AGL) \quad (4.4)$$

$$\frac{dAGL}{dt} = k_7(TAG)(H_2O) - k_8(DAG)(AGL) + k_9(DAG)(H_2O) - k_{10}(MAG)(AGL) + k_{11}(H_2O)(MAG) - k_{12}(Gly)(AGL) \quad (4.5)$$

$$\frac{dH_2O}{dt} = -k_7(TAG)(H_2O) + k_8(DAG)(AGL) - k_9(DAG)(H_2O) + k_{10}(MAG)(AGL) - k_{11}(MAG)(H_2O) - k_{12}(Gly)(AGL) \quad (4.6)$$

Onde:

$k_i = K_i * [E_i]$, sendo $i = 1, \dots, 12$

$[E_i]$ = Concentração de enzima no meio reacional (g enzima/g substratos)

4.5.1.1 Modelagem matemática de dados da literatura

Os parâmetros do modelo cinético (Equações (4.1) a (4.6)) foram ajustados a partir dos dados cinéticos obtidos do trabalho de Yang *et al.* (2005a) em que a seguinte função de mínimos quadrados foi minimizada:

$$f = \sum_j^{NOBS} \sum_k^{Nvar} (C_{jk}^{exp} - C_{jk}^{calc})^2 \quad (4.7)$$

Onde:

C_{jk}^{exp} e C_{jk}^{calc} representam as concentrações de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs experimentais e calculadas pelo modelo (Equações (4.1) a (4.6)), expressas em fração mássica percentual em base livre de solvente, água e glicerol. *NOBS* refere-se ao número de observações experimentais e *Nvar* o número de variáveis usadas na regressão (TAGs, DAGs, MAGs e AGLs).

São apresentados na Tabela 4.4 as constantes cinéticas do modelo correlacionado aos dados experimentais descritos por Yang *et al.* (2005a) para a cinética sem e com a adição de solvente.

Tabela 4.4 – Constantes cinéticas obtidas a partir da modelagem cinética utilizando os dados de Yang *et al.* (2005a)

Constantes cinéticas	Sem solvente (mol.g⁻¹.h⁻¹)	Com solvente (mol.g⁻¹.h⁻¹)
k ₁	63,19	1.364,78
k ₂	0,0	0,0
k ₃	26,11	8358,96
k ₄	71,65	2316,56
k ₅	0,23	3989,64
k ₆	0,0	0,0
k ₇	14,012	205,88
k ₈	0,0	0,0
k ₉	1,13	1159,41
k ₁₀	970,23	253,98
k ₁₁	1870,36	3844,98
k ₁₂	529,27	420,34
Valor da função <i>f</i> (Eq. (4.7))	1.114,3	132,5

Neste primeiro estudo, optou-se por usar o procedimento apresentado por Moquin *et al.* (2006), onde os parâmetros K₂, K₆ e K₈ foram fixados iguais a zero, uma vez que referem-se à formação de TAGs e considerando assim que as reações 1, 3 e 4 são irreversíveis ou com baixa probabilidade de ocorrer.

Nas Figuras 4.14(a), (b) e (c) são apresentados os dados experimentais, juntamente com o modelo ajustado, referentes à cinética de glicerólise sem solvente e sem adição de água, sem solvente e com adição de 2,6% (m/m) de água (no glicerol) e com solvente, respectivamente.

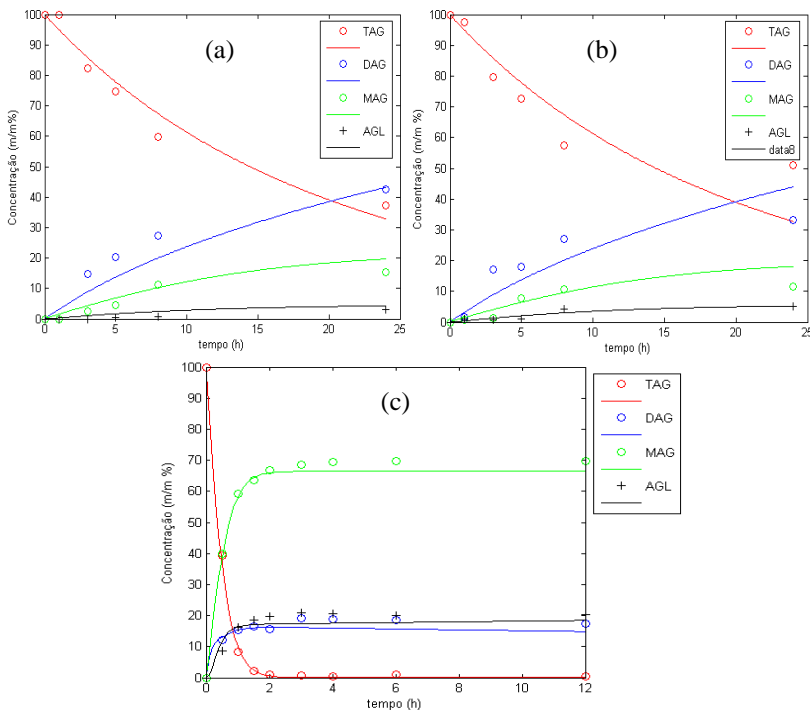


Figura 4.14 – Curvas cinéticas obtidas pelos dados experimentais e pelo modelo para a reação de glicerólise enzimática com relação molar glicerol:óleo de 4,5:1: (a) sem solvente e sem adição de água, 40°C e 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos, (b) sem solvente e com adição de 2,6% de água (no glicerol), 40°C e 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos e (c) com solvente (relação molar de solvente:óleo de 2:1), 45°C e 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 em relação aos substratos. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.4.

Analisando a Figura 4.14 pode-se observar que o modelo proposto apresentou boa capacidade de correlação com os dados experimentais da literatura, bem como, verifica-se que o uso do solvente orgânico *terc*-butanol em reações de glicerólise é altamente positivo em relação ao rendimento em MAGs. Observa-se também que a adição de 2,6% (m/m) de água não alterou significativamente o perfil

cinético nem aumentou significativamente a produção de ácidos graxos livres, indicando que esta concentração de água no meio tem pouca influência nas reações de hidrólise.

A partir do modelo obtido no presente trabalho, simulou-se uma reação com restrição de glicerol para verificar o comportamento desta em relação aos produtos finais formados. Para isso utilizou-se, na simulação, a seguinte condição reacional: relação molar glicerol:óleo de 0,8:1, temperatura de 45°C e 15% (m/m) de enzima. O resultado obtido encontra-se na Figura 4.15.

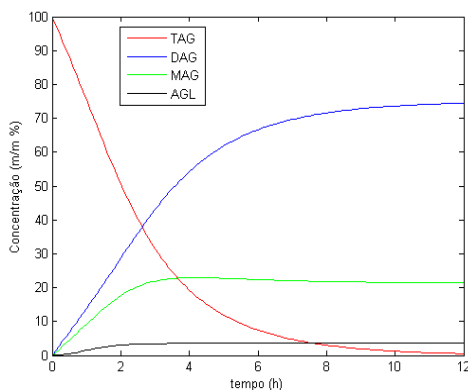


Figura 4.15 – Simulação da reação de glicerólise enzimática a 45°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, relação molar G:O de 0,8:1 e relação de solvente em óleo de 2:1 (v/v), utilizando o modelo empregado neste trabalho. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.4.

Frente ao resultado obtido com a simulação apresentada na Figura 4.15 nota-se que a restrição de glicerol no meio reacional está diretamente relacionada com a maximização do rendimento de DAGs. Tendo em vista que nos últimos anos vêm aumentando os estudos relacionados aos benefícios para a saúde da substituição total ou parcial dos triglicerídeos por diglicerídeos (Watanabe *et al.*, 2001; Nagao *et al.*, 2000; Kasamatsu *et al.*, 2005), este resultado torna-se de grande interesse.

Assim, com o intuito de verificar as tendências mostradas neste teste preliminar de modelagem cinética da glicerólise, realizou-se alguns experimentos para comprovar a possibilidade de priorizar o rendimento em DAGs, conforme indicado pelo modelo.

O primeiro teste realizado nesta etapa foi uma cinética da reação sem solvente (Figura 4.16). A partir da Figura 4.16 observa-se que sem o uso do solvente orgânico o rendimento em MAGs é prejudicado, não passando de 15% em 12 horas de reação. Isto pode ser atribuído à baixa miscibilidade da mistura reacional pela ausência do solvente. Por outro lado, o rendimento em DAGs é favorecido (maior que 47% ao final das 12 horas), assim como apresentado também por Yang *et al.* (2005a) e reforçado pela modelagem realizada na etapa anterior (Figura 4.13(a)). Isto pode ser justificado pelo fato de que, sem um agente promotor da homogeneidade, o meio reacional fica claramente dividido em três fases distintas, as quais mesmo sob agitação vigorosa, praticamente não se misturam. Ao cessar agitação, vê-se claramente a divisão de fases, onde a enzima tende a ir para o fundo, logo acima se deposita o óleo e acima deste o glicerol. Isso tudo ainda pode ser relacionado com as Equações (2.1) a (2.3) (Capítulo 2, página 10), onde a Equação (2.2) é prejudicada na ausência de homogeneidade, uma vez que, neste caso, a enzima acaba tendo mais contato com o óleo do que com o glicerol pela posição das fases.

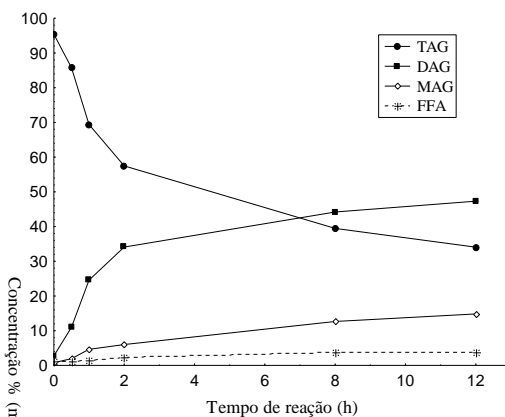


Figura 4.16 – Cinética da reação de glicerólise enzimática sem solvente no meio reacional. Condições: 55°C, relação molar G:O de 3:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e 600 rpm. Resultados em base livre de glicerol.

Buscando aprofundar o conhecimento nas reações que priorizam a produção de DAGs, foram realizados dois experimentos, na presença de solvente orgânico *tert*-butanol e com restrição de glicerol. Isto

porque o modelo preliminar confirmou que a maior produção de DAGs está intimamente ligada à baixa concentração de glicerol no meio reacional. Assim, na primeira reação foi utilizada uma relação molar de glicérol:óleo de 0,8:1, a qual foi escolhida por ter sido simulada a partir do modelo obtido na etapa anterior. E, na segunda reação, foi utilizada a relação molar de glicérol:óleo de 0,33:1, com o objetivo de verificar o comportamento da reação em uma condição de menor concentração inicial de glicérol. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.17.

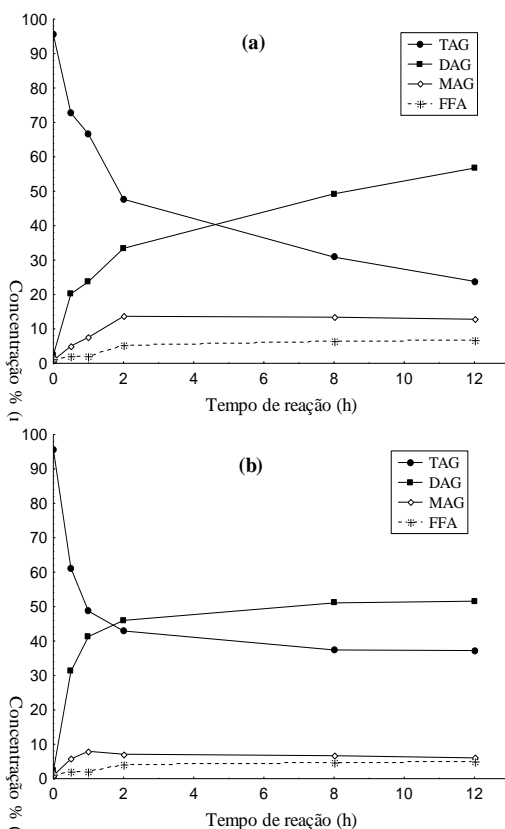


Figura 4.17 – Cinéticas da reação de glicérolise enzimática realizadas a 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm e relação solvente:mistura glicérol e óleo de 1:1 (v/v). Relação molar G:O: (a) 0,8:1 e (b) 0,33:1. Resultados em base livre de solvente e glicérol.

As cinéticas apresentadas na Figura 4.17 seguem a tendência indicada pelo modelo de que quando há restrição de glicerol no meio, prioriza-se a produção de DAGs. Para a condição utilizada na Figura 4.17(a) observa-se um rendimento em DAGs em torno de 57% (m/m) ao final da reação e na condição de maior restrição de glicerol (Figura 4.17(b)) obteve-se em torno de 51% (m/m) de DAGs em 8 horas de reação. É interessante observar na Figura 4.17(b) que ao final das 12 horas de reação, ainda há uma quantidade significativa de TAGs (em torno de 37% (m/m)), indicando, por exemplo, se para estas condições fosse adotado um sistema de batelada alimentada e alimentando de forma controlada o glicerol, pode-se conseguir altos rendimentos em DAGs.

4.5.1.2 Modelagem matemática da reação de glicerólise enzimática na presença de solvente *terc-butanol*

Nesta etapa, o tratamento dos dados obtidos no estudo cinético deste trabalho segue a abordagem do mecanismo cinético 1, descrita no item 4.5.1, com o diferencial de que foi adicionado ao modelo um termo de desativação enzimática pelo excesso de glicerol ao longo da reação. Para o cálculo desta desativação, definiu-se primeiramente, a atividade da enzima que é representada pelo termo “ a ”, e é definida como a relação entre a concentração de enzima ativa ($[E_{act}]$) e o total da concentração de enzima ($[ET]$), como segue:

$$a = [E_{act}] / [ET] \quad (4.8)$$

Para representar a sensibilidade da reação de glicerólise em relação a variação da temperatura (T), constantes da velocidade aparente (K_i) foram expressas em termos de temperatura por uma equação tipo Arrhenius:

$$k_i = k_{0i} \cdot \exp\left(\frac{-Ea_i}{RT}\right) \quad i = 1, \dots, 12 \quad (4.9)$$

Onde:

k_i ($i = 1, \dots, 12$) = constantes de velocidade aparente (mol/(g.min))

k_{0i} ($i = 1, \dots, 12$) = fatores pré-exponenciais (mol/(g.min))

E_{a_i}/R ($i = 1, \dots, 12$) = parâmetros de energia

Como já observado e discutido ao longo deste capítulo, tem-se que o desempenho inicial da reação de glicerólise tende a ser prejudicado com o aumento da concentração de glicerol no meio reacional, em termos de rendimento de MAGs. Este resultado tem sido atribuído à visível aderência do glicerol no suporte da enzima, causando limitações na transferência de massa. Por esta razão, um fator empírico de redução da atividade enzimática foi proposto nesta abordagem (bem como na abordagem do mecanismo cinético 2 – Anexo 1, a qual será discutida posteriormente) para descrever a desativação da enzima em função da concentração do glicerol no meio reacional, a qual segundo Fogler (1999), pode ser expressa como:

$$\frac{da}{dt} = -kd \cdot a^n \cdot [G]^q \quad n = 1 \text{ or } 2; \quad q = 1 \text{ or } 2 \quad (4.10)$$

Onde:

kd = constante de redução da atividade enzimática ($(\text{min} \cdot \text{mol}_{\text{glicerol}})^{-1}$)

a = termo relacionado à atividade residual da enzima

$[G]$ = concentração de glicerol ($\text{mol}/\text{g}_{\text{substrato}}$)

n = ordem relacionada com a redução da atividade da enzima

q = ordem da redução da atividade enzimática relacionada com a concentração de glicerol

No início da reação o valor de “ a ” é assumido ser unitário ($a = 1$). As ordens de redução de atividade enzimática, n e q , foram determinadas através de uma comparação simples entre os resultados plotados de atividade residual das enzimas em reações que utilizaram concentrações máximas de glicerol no meio reacional (relação molar glicerol:óleo de 9:1) versus tempo de reação. Para isso, utilizou-se as derivadas da Eq. (4.10) de acordo com as possíveis ordens de reação (1^o ou 2^o) para n e q , como observado na Figura 4.18.

Para avaliação das ordens dos coeficientes, n e q , pela curva da derivada da Eq. (4.10), foi observado qual destas combinações apresentou melhor coeficiente de correlação (R^2), ou seja, qual curva obteve menor dispersão dos dados em relação à linha de tendência. A mesma comparação foi realizada para a relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1, e resultados semelhantes aos da Figura 4.18 foram obtidos (dados não apresentados).

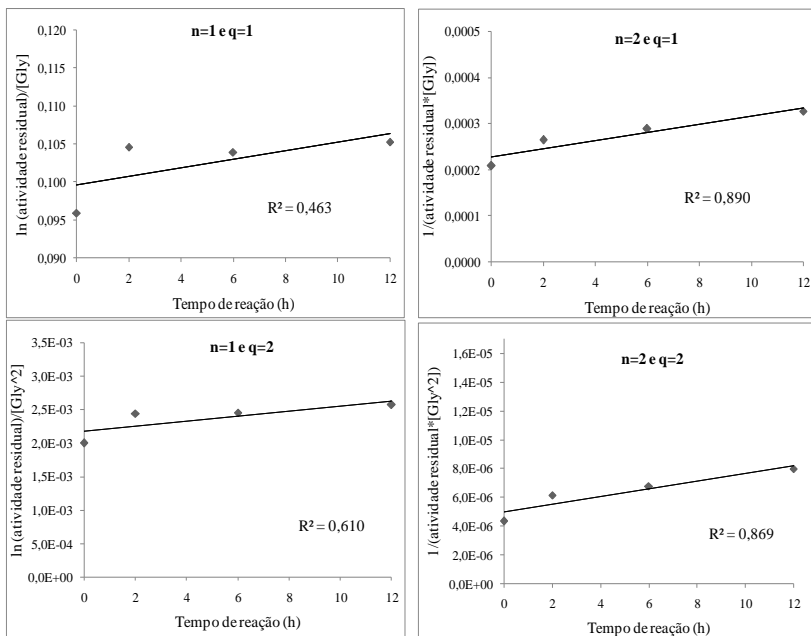


Figura 4.18 – Avaliação da ordem de reação dos coeficientes de redução da atividade enzimática (n e q). Condições enzimáticas: 55°C, relação molar G:O de 9:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435.

A partir da análise da Figura 4.18 pode-se afirmar que os valores para n e q que melhor representam os dados experimentais são $n = 2$ e $q = 1$, os quais foram assim fixados antes do procedimento de otimização e não foram alterados ao longo deste processo.

Os parâmetros do modelo (k_{0i} , Ea_i/R e k_d) foram estimados do ajuste dos dados experimentais através da minimização da função objetivo, conforme a Equação (4.7).

Um programa computacional foi desenvolvido e implementado para o procedimento de estimação dos parâmetros utilizando o software Matlab 7.0. A subrotina “ode23s” (ferramenta da biblioteca do Matlab 7.0) foi usada para a resolução das equações diferenciais. Para a estimação de parâmetros cinéticos da reação foi empregado o Método de estocástico Enxame de Partículas (Particle Swarm Optimization) (Ferrari,2008) e a subrotina de otimização “fmincon” (ferramenta da

biblioteca do Matlab 7.0) foi implementada para a minimização da função objetivo (Eq. (4.7)).

Os parâmetros estimados pelo modelo cinético proposto para esta abordagem encontram-se nas Tabelas 4.5 e 4.6. Para o ajuste dos parâmetros foram utilizados os dados obtidos no estudo da cinética da glicerólise enzimática deste trabalho, compreendendo 13 conjuntos de experimentos (cinéticas), com seis a nove pontos cada conjunto, totalizando 110 pontos experimentais do conteúdo de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs.

Tabela 4.5 – Constantes cinéticas obtidas na modelagem dos dados experimentais utilizando a abordagem do mecanismo cinético 1.

<i>i</i>	E_{a_i}/R (K)	K_i (mol.g ⁻¹ .min ⁻¹)
1	4.775,03	837,55
2	2.324,87	2.263,72
3	815,99	956,10
4	1.529,71	1.036,06
5	1.945,2	1.183,76
6	3.572,25	2.509,06
7	1.804,99	429,76
8	2.641,07	953,45
9	4.544,51	962,34
10	108,59	1.092,09
11	938,91	1.245,96
12	3.930,29	609,25
Valor da função <i>f</i> (Eq. 4.7)		630,43

Tabela 4.6 – Parâmetros estimados pelo modelo cinético (Equação da redução da atividade enzimática)

kd (min.mol _{glicerol}) ⁻¹	<i>n</i>	<i>q</i>
21,89	2	1

Para o cálculo dos valores dos desvios quadráticos médios (*rmsd*) utilizou-se a Eq. (4.11), como segue:

$$rmsd_k = \sqrt{\frac{\sum_j^{NOBS} (X_j^{exp} - X_j^{calc})^2}{NOBS}} \quad k \equiv TAG, DAG, MAG \text{ e } AGL \quad (4.11)$$

Assim, os valores obtidos foram: $rmsd_{TAG} = 18,39$; $rmsd_{DAG} = 7,87$; $rmsd_{MAG} = 5,50$ e $rmsd_{AGL} = 1,59$ para TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, respectivamente.

A Figura 4.19 apresenta o ajuste do modelo proposto aos dados experimentais das cinéticas sobre o estudo do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Nesta figura, observa-se claramente que para as reações que utilizam uma relação molar de glicerol:óleo de até 6:1 o modelo apresenta um bom ajuste. Porém, para a relação molar de glicerol:óleo de 9:1, o modelo não é capaz de correlacionar de forma adequada os dados e assim, o ajuste é visivelmente prejudicado. Isto se deve, muito provavelmente, aos fenômenos causados pela aderência do glicerol no suporte da enzima. Estes fenômenos envolvem as alterações na transferência de massa, a formação de aglomerados e a formação da “capa” de glicerol ao redor da enzima, entre outros. A consideração de todos estes fenômenos pelo modelo o tornaria altamente complexo.

A Figura 4.20 apresenta o ajuste do modelo aos dados experimentais de mais uma condição cinética, utilizando a relação molar de glicerol:óleo de 9:1, desta vez, utilizando temperatura de 40°C e concentração de enzima de 10% (m/m) em relação aos substratos e, neste caso, obteve-se um ajuste levemente satisfatório, melhor que nas condições da Figura 4.19 para esta mesma concentração de glicerol. Isto indica que o modelo consegue demonstrar uma “tendência” do comportamento deste tipo de reação.

Na Figura 4.21 observa-se o ajuste do modelo aos dados experimentais sobre o estudo do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol, em concentrações de glicerol muito baixas (relação molar glicerol:óleo de 0,8:1 e 0,33:1). Neste caso, não se obteve uma correlação satisfatória, principalmente para a menor concentração de glicerol, em parte justificada pelos poucos dados cinéticos disponíveis nestas condições de restrição de glicerol, comparado ao volume de dados em outras condições experimentais.

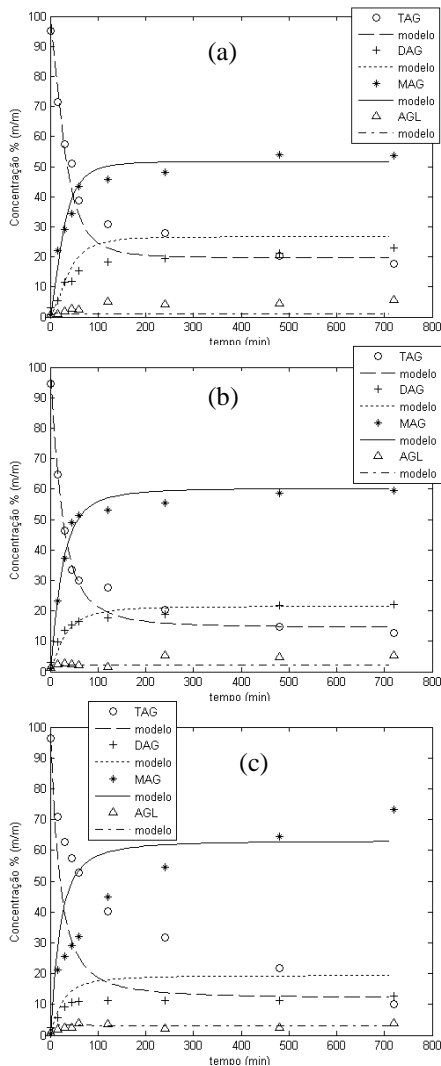


Figura 4.19 – Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Relação molar G:O: (a) 3:1; (b) 6:1; (c) 9:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.

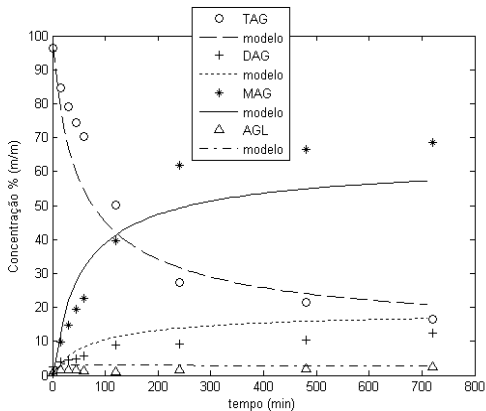


Figura 4.20 - Modelo e dados experimentais do efeito da concentração de glicerol na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 9:1, 40°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.

Na Figura 4.22 apresenta-se o ajuste do modelo aos dados experimentais sobre o estudo da influência da temperatura (40, 55 e 70°C) na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol, utilizando uma relação molar de glicerol:óleo de 6:1 e 10% (m/m) de enzima em relação aos substratos. Neste grupo de experimentos o ajuste do modelo foi excelente, representando fielmente os dados do estudo.

Na Figura 4.23 observa-se o resultado do ajuste do modelo aos dados experimentais sobre o estudo do efeito da concentração de enzima (2,5; 10 e 15% - m/m) na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol, utilizando relação molar glicerol:óleo de 6:1 e 70°C. Neste grupo de experimentos, obteve-se um ajuste satisfatório para as cinéticas utilizando 10 e 15% (m/m) de enzima e um ajuste mais pobre para a concentração de 2,5% (m/m).

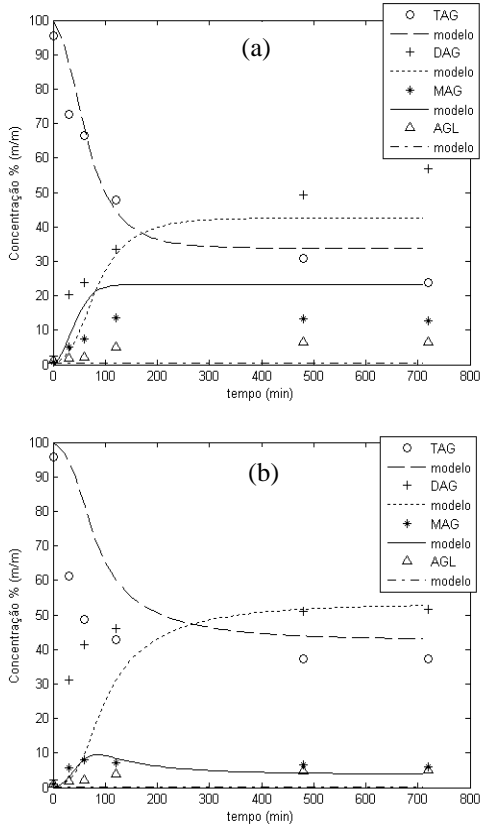


Figura 4.21 - Modelo e dados experimentais do efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. Relação molar G:O: (a) 0,8:1; (b) 0,33:1. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.

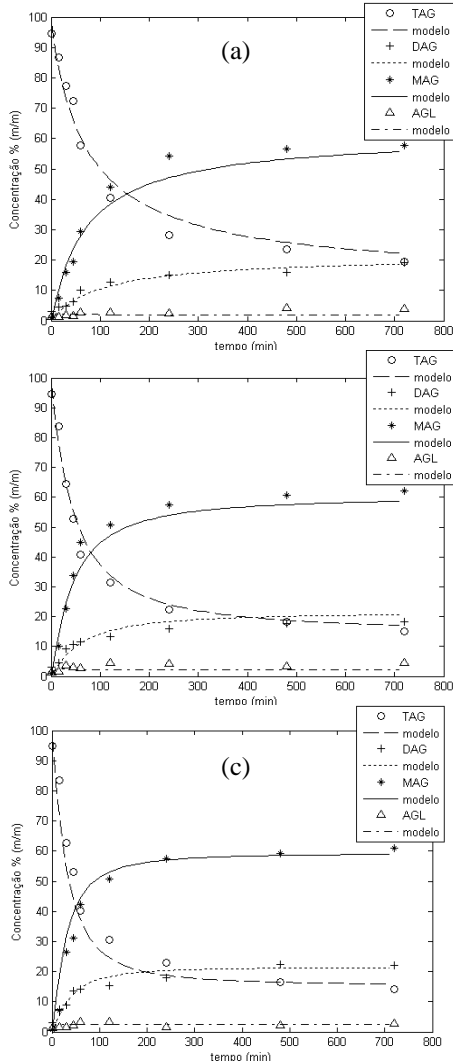


Figura 4.22 - Modelo e dados experimentais do efeito da temperatura na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 40°C; (b) 55°C; (c) 70°C. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.

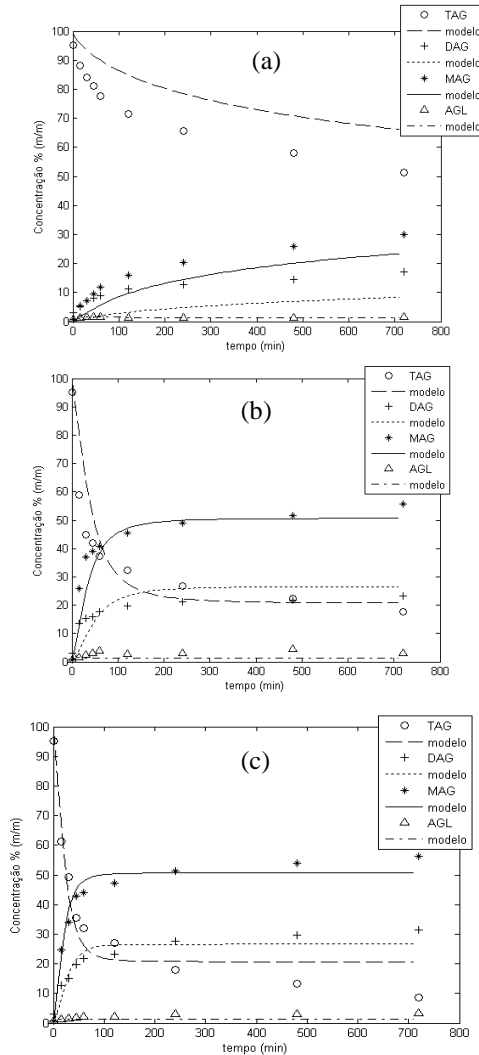


Figura 4.23 - Modelo e dados experimentais do efeito da concentração de enzima na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar G:O de 6:1, 70°C e agitação de 600 rpm. Concentração de enzima imobilizada Novozym 435 (m/m): (a) 2,5%; (b) 10%; (c) 15%. Resultados em base livre de solvente e glicerol. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela 4.5.

4.5.2 *Mecanismo cinético 2*

A segunda abordagem avaliada no presente trabalho é apresentada como Mecanismo Cinético 2, a qual foi desenvolvida por Voll (2010) e aplicada aos dados experimentais do presente trabalho. Cabe ressaltar que o detalhamento completo conforme desenvolvimento de Voll (2010) está apresentada no Anexo 1, aqui serão utilizados alguns resultados para efeito de comparação com os resultados obtidos pelo Mecanismo Cinético 1. A principal característica desta segunda abordagem está na inclusão dos parâmetros que envolvem a formação dos complexos enzimáticos no decorrer das reações, o que torna o modelo mais fenomenológico e por consequência mais complexo que o modelo utilizado no Mecanismo Cinético 1. Ressalta-se também que há aumento na complexidade computacional desta segunda abordagem, a qual está relacionada com o aumento significativo do número de parâmetros ajustáveis do modelo e nas manipulações algébricas requeridas.

Os resultados obtidos foram comparados aos resultados obtidos na abordagem do Mecanismo Cinético 1. Os ajustes com as cinéticas que utilizaram relação molar de glicerol:óleo de 9:1 não foram incluídas nesta abordagem por não terem apresentado boa correlação com os dados experimentais. Nas Figuras 4.24 a 4.27 estão apresentados os resultados das correlações do modelo obtido com o Mecanismo Cinético 2 e os dados experimentais.

Na Figura 4.24 são apresentados os dados experimentais e os resultados do modelo cinético para as diferentes relações molares de glicerol:óleo (3:1 e 6:1), para uma concentração de enzima de 15% (m/m em relação aos substratos glicerol mais óleo). A correlação do modelo cinético aos dados experimentais apresentou-se semelhante à correlação obtida no Mecanismo Cinético 1 (Figura 4.19(a) e (b), sendo que pode ser observado que ambas as abordagens utilizadas neste trabalho são capazes de descrever quantitativamente o comportamento da reação.

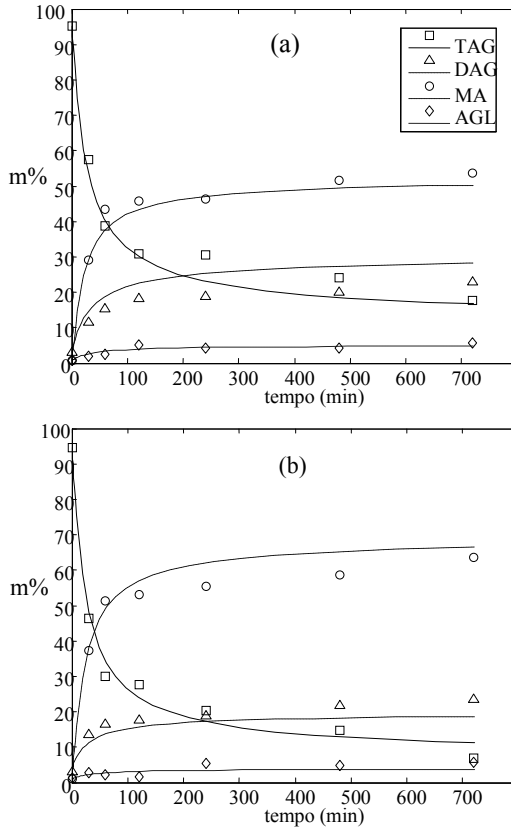


Figura 4.24 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da relação molar de glicerol:óleo na glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 15% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 3:1; (b) 6:1. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).

Na Figura 4.25 são apresentados os dados experimentais e modelo ajustado para outros valores de relação molar de glicerol:óleo e concentração de enzima fixa de 10 % (m/m). A partir desta figura pode ser verificado que o modelo apresentou uma capacidade de correlacionar os dados experimentais de uma maneira bastante eficiente para este

grupo de experimentos, diferentemente da correlação obtida para as relações molares de glicerol:óleo de 0,8:1 e 0,33:1 (Figura 4.21) com o Mecanismo Cinético 1. Isto implica que as considerações da formação dos complexos enzimáticos no balanço de massa da reação de glicerólise para o modelo é altamente representativo para estas condições de restrição de glicerol.

Na Figura 4.26 são apresentados os dados experimentais e os resultados do modelo para os experimentos em que é avaliado o efeito da temperatura (40, 55 e 70°C) na reação de glicerólise. Para tal, a relação molar de glicerol:óleo foi fixada em 6:1 e a concentração de enzima em 10% (m/m) (em relação à massa de substratos glicerol e óleo). Pode-se observar que os resultados obtidos nesta abordagem são praticamente equivalentes aos ajustes obtidos no Mecanismo Cinético 1 (Figura 4.22), sendo que ambos mostraram-se satisfatórios e representativos.

A Figura 4.27 apresenta os dados experimentais e o resultado do ajuste do modelo para cinéticas conduzidas a 70°C, com relação molar de glicerol:óleo de 6:1 e diferentes concentrações de enzimas (m/m): 2,5; 10 e 15% (em relação a massa de substratos glicerol e óleo). Observa-se que nas três concentrações de enzima, o modelo do Mecanismo Cinético 2 teve boas correlações com os dados experimentais. Estes resultados se assemelham com as correlações obtidas para as concentrações de 10 e 15% (m/m) utilizando o Mecanismo Cinético 1.

De uma maneira geral pode ser observado a partir dos resultados obtidos neste trabalho que ambas as abordagens investigadas (mecanismo estequiométrico simples – abordagem denominada Mecanismo Cinético 1; e abordagem mecanicista considerando um mecanismo cinético enzimático sequencial Bi Bi) mostraram-se capazes de correlacionar e modelar os dados experimentais referentes à cinética enzimática de glicerólise de óleo de oliva de maneira bastante eficiente.

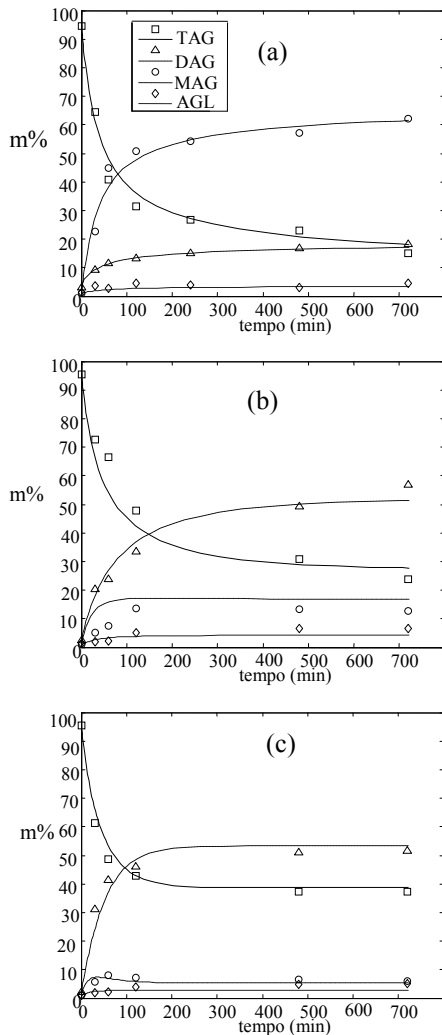


Figura 4.25 - Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da relação de glicerol:óleo na glicérolise enzimática de óleo de oliva na presença do solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: 55°C, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 6:1; (b) 0,8:1; (c) 033:1. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).

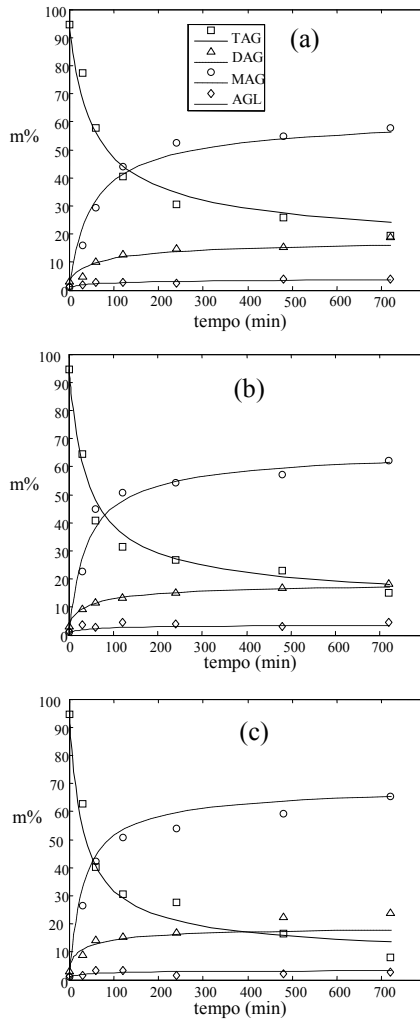


Figura 4.26 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da temperatura na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *tert*-butanol. Condições experimentais: relação molar glicerol:óleo de 6:1, 10% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435 e agitação de 600 rpm. (a) 40°C; (b) 55°C; (c) 70°C. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).

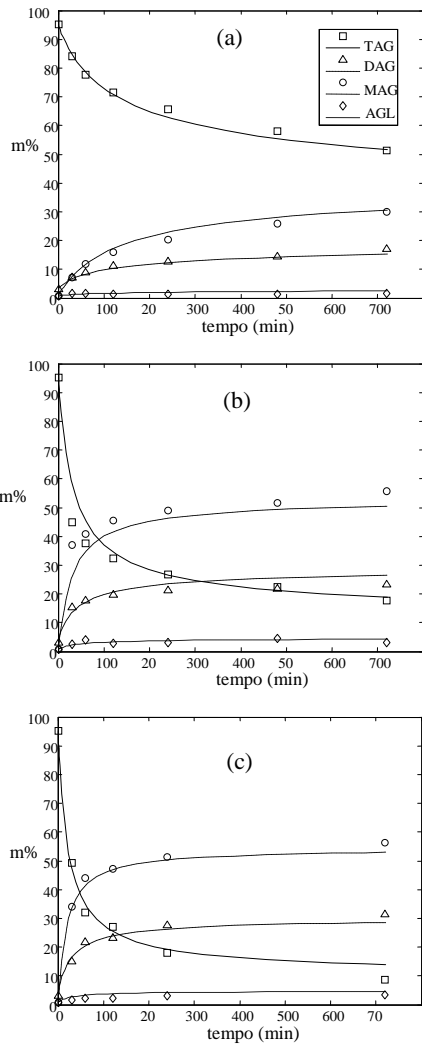


Figura 4.27 – Correlação do modelo relativo ao Mecanismo Cinético 2 com os dados experimentais. Efeito da concentração de enzima imobilizada Novozym 435 (m/m) na reação de glicerólise de óleo de oliva na presença de solvente *terc*-butanol. Condições experimentais: relação molar glicerol:óleo de 6:1, 70°C e agitação de 600 rpm. (a) 2,5%; (b) 10%; (c) 15%. Parâmetros cinéticos do modelo conforme apresentado na Tabela An.2 (Anexo).

4.6 Considerações Finais

Os resultados apresentados neste capítulo contribuem para o melhor entendimento da glicerólise enzimática para a produção dos emulsificantes MAG e DAG. Na etapa de desenvolvimento da metodologia de análise de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs mostrou-se que é possível quantificar quali e quantitativamente os compostos mencionados com confiabilidade através de análise por cromatografia gasosa. Os resultados positivos nesta etapa somente foram possíveis mediante ajustes realizados no método escolhido como referência - NR 14.105 (European Committee for Standardisation, 2001), principalmente em relação às faixas de calibração, que necessitaram ser ampliadas.

O estudo cinético indicou as condições experimentais para maximização dos produtos desejáveis, onde foram discutidos fatores ainda pouco explorados na literatura - a citar, a maximização da produção de DAGs pela restrição de glicerol no meio reacional. Um ponto interessante trata da concentração de enzima no meio reacional, onde foi observado que concentrações acima de 10% (m/m, em relação aos substratos glicerol e óleo) pouco influenciam na formação dos produtos de interesse da reação. Outro ponto que merece destaque é o aumento de cinco vezes na relação volumétrica do solvente *tert*-butanol no meio reacional (de 1:1 para 5:1, v/v, em relação aos substratos). Este aumento teve como resultado rendimentos levemente superiores em MAGs e DAGs, em quantidades que provavelmente não justificam a maior carga de solvente no meio reacional.

Em relação às velocidades iniciais observadas nas diferentes condições experimentais, o maior valor encontrado para a produção de MAGs foi utilizando as condições reacionais de 55°C, 15% (m/m) de enzima, relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 (v/v) e relação molar de glicerol:óleo de 6:1. Para a produção de DAGs, as condições em que obteve-se a maior velocidade inicial foram nas condições de 55°C, 10% (m/m) de enzima, relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 (v/v) e relação molar de glicerol:óleo de 0,5:1,5. As condições experimentais que resultaram nas maiores conversões de MAGs, ao final das 12 horas de reação, foram as que utilizaram relação molar de glicerol:óleo de 9:1 (> 73%, m/m). É interessante observar que, apesar disso, as reações que utilizaram a relação molar de glicerol:óleo de 9:1 foram as que apresentaram as menores velocidades iniciais para DAGs (para concentrações de enzima de 10 e 15%, m/m). Por outro lado, as

condições experimentais que resultaram nas maiores conversões de DAGs, ao final das 12 horas de reação, foram as que utilizaram a menor relação molar de glicerol:óleo - 0,8:1 (> 56%, m/m). Assim como, nestas condições, observou-se as menores velocidades iniciais para a formação de MAGs. O experimento que se obteve, ao final da reação, o maior rendimento de MAGs + DAGs (> 89%, m/m) foi o que utilizou as condições de 70°C, 10% (m/m) de enzima, relação volumétrica de solvente:substratos de 1:1 (v/v) e relação molar de glicerol:óleo de 6:1.

As distintas abordagens estudadas na etapa de modelagem dos dados cinéticos (Mecanismo Cinético 1 e Mecanismo Cinético 2) mostraram que há uma grande dificuldade de correlacionar as reações que utilizam relação molar glicerol:óleo de 9:1, provavelmente pelos fenômenos causados pela aderência do glicerol no suporte da enzima. Apesar de ambos os modelos considerarem um termo de desativação da enzima pelo excesso de glicerol, nenhuma correlação obtida foi satisfatória. O Mecanismo cinético 2 (Voll, 2010) resultou em um modelo mais complexo, com um número maior de parâmetros a serem ajustados. Por outro lado, em algumas situações este conseguiu uma melhor correlação com os dados experimentais, como no caso dos experimentos com restrição de glicerol e dos experimentos com baixa concentração de enzima imobilizada Novozym 435 (2,5%, m/m). Para todas as demais cinéticas, o modelo utilizando o Mecanismo cinético 1 foi satisfatório, apesar de não considerar os complexos enzimáticos formados ao longo das reações, e por consequência ser mais simples. Ambos os modelos apresentados trazem uma contribuição ímpar para o estudo das reações de glicerólise. Isto porque não foi encontrado, até o presente momento, outro estudo na literatura que explore a modelagem matemática da glicerólise enzimática de óleo de oliva na presença de *tert*-butanol para a produção de MAGs e DAGs.

- CAPÍTULO 5 -

5. CONCLUSÕES

Primeiramente, pode-se dizer que a técnica de cromatografia gasosa utilizada para análise de MAG, DAG, TAG e AGL, utilizando a Norma Européia de Padronização nº 14.105, com as devidas modificações, mostrou-se satisfatória quali e quantitativamente para os compostos citados.

Os experimentos realizados provaram o potencial do uso de enzimas lipases imobilizadas, no nosso caso, da *Novozym 435*, como catalisadores da reação de glicerólise. Mostrou-se, também, a contribuição da utilização de solvente orgânico como meio de diminuir a resistência à transferência de massa no sistema glicerol/óleo, para maximização da produção de MAGs.

As cinéticas das reações foram investigadas em diferentes temperaturas, concentração de enzima, relações molares de glicerol e óleo de oliva e concentração de solvente. Conteúdos apreciáveis de MAGs (>62%, m/m) e DAGs (>55%, m/m) foram obtidos em temperatura média (55°C), com concentração de enzima relativamente baixa (10%, m/m) em 720 minutos de reação. Nas condições de 55°C, 15% (m/m) de enzima e relação molar glicerol:óleo de 9:1 obteve-se, neste mesmo tempo, concentração de MAGs em torno de 73% (m/m), embora esta condição não esteja entre as que apresentaram as maiores velocidades iniciais para a produção de MAGs. Observou-se que as velocidades iniciais da produção de DAGs mostraram-se inversamente proporcionais a concentração de glicerol no meio reacional. Assim, a maior velocidade inicial para produção de DAGs foi obtida com relação molar de glicerol:óleo de 0,5:1,5.

As modelagens matemáticas utilizando a abordagem do mecanismo cinético 1 e do mecanismo cinético 2 (o qual considerou os complexos enzimáticos no balanço da reação de glicerólise e hidrólise) apresentaram, em geral, resultados satisfatórios em relação ao ajuste dos modelos aos dados experimentais. O mecanismo cinético 2 apresentou uma melhor correlação dos dados com o modelo para as reações que utilizaram a menor concentração de enzima (2,5% m/m) e nas reações

com condições de restrições de glicerol. Porém, ambos os modelos não apresentaram boas correlações para as reações que utilizaram a maior relação molar de glicerol:óleo (9:1). Para esta condição conseguiu-se apenas demonstrar a tendência do curso que a reação terá nestes casos, como apresentado nos resultados utilizando o mecanismo cinético 1. O excesso de glicerol no meio reacional levou a um comportamento diferenciado da cinética da reação, aparentemente, pelo aumento da viscosidade e aderência deste ao revestimento da enzima, com consequente diminuição da velocidade inicial da reação, entre outros fatores.

Uma conclusão importante é que a relação molar de glicerol e óleo é um fator seletivo, onde valores mais altos de glicerol favorecem a formação de MAGs, enquanto que valores mais baixos favorecem a formação de DAGs. Em relações molares médias de glicerol e óleo (6:1) pode-se obter a maximização da mistura de MAGs + DAGs.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

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

- Aprofundar o estudo em relação à redução de atividade causada pelo excesso de glicerol e como incrementar estes fenômenos nos modelos desenvolvidos;
- Realizar mais estudos com restrição de glicerol visando a maximização de DAGs.
- Acompanhar o teor de água no meio reacional ao longo da glicerólise enzimática;
- Verificar a influência de diferentes concentrações de água no meio reacional no rendimento dos produtos de interesse;
- Estudar a reação de glicerólise enzimática em sistema de batelada alimentada;
- Estudar aplicações de enzimas não comerciais na reação de glicerólise;
- Avaliar o pH do meio no decorrer da reação e correlacionar com a atividade da enzima;
- Avaliação do número de ciclos de utilização da lipase imobilizada em modo batelada, sem perda de eficiência;

- Realizar a separação e purificação de MAGs e DAGs ao final da glicerólise enzimática; e
- Estimar os custos envolvidos no processo.

- CAPÍTULO 6 -

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y.R.; GABALLA, A.A. **Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*.** Microbiol. Res., 163, n.1, p. 13-20, 2008.

ANGELIS, R. C., **Novos Conceitos em Nutrição. Reflexões a Respeito do Elo Dieta e Saúde.** Arquivos de Gastroenterologia, 38, n. 4, São Paulo, Oct/Dec. 2001.

ARCOS, J.A.; OTERO, C. **Enzyme, medium, and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoylglycerols.** J. Am. Oil Chem. Soc., 73, n. 6, p. 673-682, 1996.

AUED-PIMENTEL, S. Avaliação do grau discriminatório de parâmetros analíticos do azeite de oliva: 1. Aplicação da espectrofotometria derivada. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 223p., 1991.

BATISTELLA, C. B.; MACIEL, M. R. W. **Modeling, simulation and analysis of molecular distillators: centrifugal and falling film.** Comput. Chem. Eng., 20, 19 – 24, 1996.

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 Microb. Technol., 28, p. 362-369, 2001.

BERNARDES, O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G.; LAGNONE, M. A. P. **Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase.** Appl. Biochem. and Biotechnol., 137, 105 - 114, 2007.

BLASI, F.; COSSIGNAMI, L.; SIMONETTI, M. S.; DAMIANI, P. **Biocatalysed synthesis of *sn*-1,3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil.** *Enzyme Microb. Technol.*, 41, p. 727 – 732, 2007.

BORNSCHEUER, U.T. **Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols.** *Enzyme Microb. Technol.*, 17, p. 578-586, 1995.

BORZANI, W. Outros coordenadores: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial – Fundamentos*, v. 1, São Paulo/SP, Ed. Edgard Blücher Ltda, p. 197 – 215, 2001.

BOYLE, E; GERMAN, J.B. **Monoglycerides in Membrane Systems.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36, 785 – 805, 1996.

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

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.

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

CHEW, Y. H.; CHUA, L. S.; CHENG, K. K.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A.; LEE, C. T. **Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase.** *Biochem. Eng. J.*, 17, 57 – 63, 2004.

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

CHEONG, L.-Z.; TAN, C.-P.; LONG, K.; YUSOFF, M. S. A.; ARIFIN, N.; LO, S.-K.; LAI, O.-M. **Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalysed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology.** *Food Chem.*, 105, p. 1614 – 1622, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils.** *Codex Stan*, v. 33 – 1981. Revisado em fev. 2003.

CORMA, A.; IBORRA, S.; MIQUEL, S.; PRIMO, J. **Production of food emulsifiers, monoglycerides, by glycerolysis of fats with solid base catalysts.** *J. Catal.*, 173, 315 – 321, 1998.

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.** J. Am. Oil Chem. Soc., 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DAMSTRUP, M. L.; ABILDSKOV, J.; KIIL, S.; JENSEN, A. D.; SPARSO, F. V.; XU, X. **Evaluation of binary solvent mixtures for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis.** J. Agric. Food Chem., 54, p. 7113-7119, 2006a.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; JENSEN, A. D.; XU, X. **Production of Heat-Sensitive Monoacylglycerols by Enzymatic Glycerolysis in *tert*-Pentanol: Process Optimization by Response Surface Methodology.** J. Am. Oil Chem. Soc., 83, p.27 – 33, 2006b.

DAMSTRUP, M. L.; KIIL, S.; JENSEN, A. D.; SPARSO, F.V.; XU, X. **Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production.** J. Agric. Food Chem., 55, 7786 – 7792, 2007.

ESMELINDRO, A. F. A.; FIAMETTI, K. G.; CENI, G.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; de OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Lipase-catalysed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant.** J. Supercrit. Fluids, 47, 64 – 69, 2008.

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

FERRARI, J. C. Equilíbrio de fases líquido-líquido do sistema reacional do biodiesel metílico de soja: Dados experimentais e modelagem. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2008.

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.** J. Mol. Catal. B: Enzym., 11, p. 699-711, 2001.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A.C.; FONSECA, M. M. R. **Response surface modeling of glycerolysis catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the**

production of partial glycerides. J. Mol. Catal. B: Enzym., 21, p. 71-80, 2003.

FIAMETTI, K. G. Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de óleo de oliva na presença de surfactante. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2008.

FIAMETTI, K. G. ROVANI, S.; de 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.** Ind. Eng. Chem. Res., 48, 708 – 712, 2009.

FLACK, E. A.; KROG, N. **The Functions and Applications of Some Emulsifying Agents Commonly Used in Europe.** Food Trade Rev., 40, p. 27-33, 1970.

FOGLER, S. H. *Elements of Chemical Reaction Engineering.* 3° Ed., Ed. Prentice Hall International Editions. p.640, 1999.

FREGOLENTE, L. V. Obtenção de Monoglicerídeos de Alta Concentração através do Processo de Destilação Molecular. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2006.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELA, C. B. **Produção de Monoglicerídeos e Diglicerídeos via glicérolise enzimática e destilação molecular.** Quím. Nova, 32, n.6, 1539 – 1543, 2009.

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

GARCIA, H. S.; YANG, B.; PARKIN, K. L. **Continuous reactor for enzymic glycerolysis of butteroil in the absence of solvent.** Food Res. Int., 28, n. 6, 605 – 609, 1996.

GUO, Z.; XU, X.; **Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system.** Green Chem., 8, 54 – 60, 2006.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. *Lipid Biochemistry: An Introduction;* 4th ed.; Chapman & Hall: London, p. 162-243, 1996.

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.

H-KITTIKUN A.; PRASERTSAN, P.; SUNGPUD, C. **Continuous production of fatty acids from palm olein by immobilized lipase in a two-phase system.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 599 – 603, 2000.

H-KITTIKUN A.; KAEWTHONG, W.; CHEIRSILP, B. **Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS.** *Biochem. Eng. J.*, 40, 116 – 120, 2008.

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

JESUS, P. C. de; JOÃO, J. J.; SILVA, P. L. F. da; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M. da G. **Organo-gel: um novo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica.** *Quím. Nova*, 20, 664 – 672, 1997.

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

KAHVECI, D.; GUO, Z.; ÖZÇELİK, B.; XU, X. **Optimization of enzymatic synthesis of diacylglycerols in binary medium systems containing ionic liquids.** *Food Chem.*, 119, 880 – 885, 2010.

KARLESKIND, A.; *Oils and Fats: Manual*, Lavoisier Publishing: Paris, vol. 2, p. 1432-1572, 1996.

KASAMATSU, T.; OGURA, R.; IKEDA, N.; MORITA, O.; SAIGO, K.; WATABE, H.; SAITO, Y.; SUZUKI, H. **Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil.** *Food Chem. Toxicol.*, 43, p. 253 – 260, 2005.

- KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P., **Olive Oil: A Review**. Adv. Food Res., 31, p. 453 - 483, 1987.
- KOBLITZ, M. G. B., Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus* sp. e sua Aplicação na Síntese de Monoacilgliceróis. Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 2003.
- KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. **Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis**. J. Agric. Food Chem., 53, 7059 – 7066, 2005.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. **Enzymatic transesterification of Jatropha oil**. *Biotechnol. Biofuels*, 2:1, Open Access, 2009.
- LANGONE, M. A. P.; SANT'ANNA Jr., G. L. **Enzymatic Synthesis of Medium-Chain Triglycerides in a Solvent-Free System**. Appl. Biochem. Biotechnol., 77-79, 759, 1999.
- MAKI, C. K.; DAVIDSON, M.; TSUSHIMA, R.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; UMPOROWICZ, D. N.; DICKLIN, M. R.; FOSTER, G. S.; INGRAM, K. A.; ANDERSON, B. D.; FROST, S. D.; BELL M., **Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil**. Am. J. Clin. Nutr., 76 – 6, 1230 – 1236, 2002.
- MARANGONI, A. G. *Enzyme Kinetics – A modern approach*. A John Wiley & Sons, INC., publication, New Jersey. p. 90 – 101, 2003.
- McNEIL, G. P.; YAMANE, T. **Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils**. J. Am. Oil Chem. Soc., 68, n. 1, p. 6-10, 1991.
- McNEIL, G. P.; BOROWITZ, D. BERGER, R. G. **Selective distribution of saturated fatty acids into the monoglyceride fraction during enzymatic glycerolysis**. J. Am. Oil Chem. Soc., 69, n. 11, p. 1098-1103, 1992.
- MICOV, M.; LUTISAN, J.; CVENGROS, J. **Balance equations for molecular distillation**. Sep. Sci. Technol., 32, 3051 – 3066, 1997.

- MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G. e NINOW, J. L. **Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system.** *Biotechnol. Lett.*, v. 25, p. 641 – 644, 2003.
- 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.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 82, nº 8, p. 613 – 617, 2005.
- MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F.; SOVOVÁ, H.; SALDAÑA, M. D. A. **Kinetic modeling of glycerolysis-hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data.** *J. Supercrit. Fluids*, 37, p. 417-424, 2006.
- MORETTO, E.; FETT, R., *Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos.* Ed. Varela, São Paulo, 1998.
- 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.** *Quím. Nova*, 32, p. 639 – 648, 2009.
- NAGAO, T.; WATANABE, H.; GOTO, N.; ONIZAWA, K., TAGUCHI, H.; MATSUO, N. **Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial.** *J. Nutr.*, 130, p. 729 – 797, 2000.
- NEGI, D. S.; SOBOTKA, F.; KIMMEL, T.; WOZNY, G.; SCHOMÄCKER, R. **Glycerolysis of fatty acid methyl esters: 1. Investigations in a batch reactor.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 84, 83 – 90, 2007.
- NOUREDDINI, H.; HARKEY, D. W.; GUTSMAN, M. R. **A continuous process for the glycerolysis of soybean oil.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 203 – 207, 2004.
- NR 14.105 (European Committee for Standardisation) – Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride content (Reference method), Belgium, 2001.
- PAWONGRAT, R.; XU, X.; H-KITTIKUN, A., **Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK.** *Food Chem.*, 104, n. 1, p. 251-258, 2007.

- REIS, P.; HOLMBERG, K.; DEBECHE, T.; FOLMER, B.; FAUCONNOT, L.; WATZKE, H. **Lipase catalyzed reactions at different surfaces.** *Langmuir*, 22, p. 8169-8177, 2006.
- RENDÓN, X.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; CASTILLO, E., **Solvent Engineering Applied to Lipase-Catalyzed Glycerolysis of Triolein.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, n. 10, p. 1061 - 1066, 2001.
- RUÍZ-GUTIÉRREZ, V.; PÉREZ-CAMINO, M. C. **Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds (Review).** *J. Chromatogr. A.*, 885, p. 321 – 341, 2000.
- SCHMID, R.D. **Biotechnology: application to oleochemistry.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, n.4, p.563-570, 1987.
- SELMİ, B.; THOMAS, D. **Immobilized lipase-catalysed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, n.6, p. 691 - 695, 1998.
- SONI, M. G.; KIMURA, H.; BURDDOCK, G. A. **Chronic study of diacylglycerol oil in rats.** *Food Chem. Toxicol.*, 39, 317 – 329, 2001.
- SU, E.; WEI, D. **Improvement in lipase-catalysed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent engineering method.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 55, 118 – 125, 2008.
- TAGUCHI, H.; NAGAO, T.; WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; ITAKURA, H. **Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3-diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol.** *Lipids*, 36, 379 – 382, 2001.
- TAN, T.; YIN, C. **The mechanism and kinetic model for glycerolysis by 1,3 position specific lipase from *Rhizopus arrhizus*.** *Biochem. Eng. J.*, 25, p. 39 – 45, 2005.
- TEMELLI, F.; KING, J. W.; LIST, G. R. **Conversion of oils to monoglycerides by glycerolysis in supercritical carbon dioxide media.** *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 699 – 706, 1996.
- TÜTER, M.; AKSOY, A. A. **Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalysed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of glycerolysis products.** *Biotechnol. Lett.*, 22, p. 31 – 34, 2000.

ULLMANN. **Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Glycerol, v. A12, p. 477- 489, 1992.

WATANABE, H.; NAGAO, T.; YASUKAWA, T.; SHIMASAKI, H. **Studies on the role of dietary diacylglycerols in human nutrition**. World Rev. Nutr. Diet., 88, p. 155 – 162, 2001.

WATANABE, H.; YAMAUCHI-SATO, Y.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUMI, K.; SUGIHARA, A; SHIMADA, Y. **Production of MAG of CLA in a solvent-free system at low temperature with *Candida rugosa* lipase**. J. Am. Oil Chem. Soc., 80, 909 – 914, 2003.

WEBER, N.; MUKHERJEE, K. D. **Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols**. J. Agric. Food Chem., 52, 5347 - 5353, 2004.

VALÉRIO, A.; KRUGER, R. L.; NINOW, J. L.; CORAZZA, F. C.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J. V.; CORAZZA, M. L. **Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis olive oil in surfactant system**. J. Agric. Food Chem., 57, 8350 - 8356, 2009a.

VALÉRIO, A.; FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic production of mono and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant**. J. Supercrit. Fluids, 49, 216 – 220, 2009b.

VALÉRIO, A.; FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. de; OLIVEIRA, J. V. **Low-pressure lipase-catalysed production of mono- and diglycerides with and without n-butane and AOT surfactant**. Appl. Biochem. Biotechnol., 160, 1789 – 1796, 2010.

VOLL, F. A. P. **Produção e separação de diacilglicerol a partir do triacilglicerol do óleo de palma**. Exame de Qualificação – Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – Campus de Maringá, 2010.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. **Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida antarctica***. Biochem. Eng. J., 17, 57 – 63, 2004.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X., **Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system.** J. Food Lipids, 12, p. 299-312, 2005a.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X., **Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system.** J. Agric. Food Chem., 53, p. 1475-1481, 2005b.

YASUNAGA, K.; GLINSMANN, W. H.; SEO, Y.; KATSURAGI, Y.; KOBAYASHI, S.; FLICKINGER, B.; KENNEPOHL, E.; YASUKAWA, T.; BORZELLECA, J. **Safety aspects regarding the consumption of high-dose dietary diacylglycerol oil in men and women in a double-blind controlled trial in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil,** Food Chem. Toxicol., 42, 1419 – 1429, 2004.

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 J. Microbiol. Biotechnol., 25, 41 – 46, 2009.

- CAPÍTULO 7 -

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7.1 *Artigo completo publicado em periódico*

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.

7.2 *Artigo aceito para publicação*

Krüger, R. L.; Valério, A.; Balen, M.; Ninow, J. L.; de Oliveira, J. V.; de Oliveira, D. ; Corazza, M. L. . **Improvement of mono and diacylglycerol production via enzymatic glycerolysis in tert-butanol system.** European Journal of Lipid Science and Technology, 2010. DOI: 10.1002/ejlt.200900253.

7.3 *Artigo submetido*

Voll, F. A. P.; Krüger, R. L.; de Castilhos, F.; Cardozo Filho, L.; Cabral, V.; Ninow, J. L.; Corazza, M. L. **Kinetic modeling of lipase-catalysed glycerolysis of olive oil.** Submetido à Biochemical Engineering Journal, em Março de 2010.

7.4 *Trabalhos apresentados em eventos*

Voll, F. A. P.; Krüger, R. L.; Castilhos, F.; Cardozo Filho, L.; Cabral, V.; Ninow, J. L.; Corazza, M. L., *et al.* Modelagem cinética da glicerólise enzimática do óleo de oliva. *In:* Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. 2010, Foz do Iguaçu/PR.

Krüger, R. L.; Ninow, J. L.; Corazza, F. C.; Corazza, M. L. Desenvolvimento de um modelo matemático para a reação de

glicerólise. *In:* 8º Simpósio Latino Americano em Ciências de Alimentos – SLACA, 2009, Campinas/SP.

Krüger, R. L.; Balen, M.; Ninow, J. L.; Corazza, M. L. Estudo cinético de glicerólise enzimática de óleo de oliva. *In:* 8º Simpósio Latino Americano em Ciências de Alimentos – SLACA, 2009, Campinas/SP.

Balen, M.; Krüger, R. L.; Valério, A.; Corazza, M. L.; de Oliveira, D. Estudo cinético da produção de mono e diglicerídeos através da glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactante *Food Grade*. *In:* 8º Semana Acadêmica de Engenharia Química e de Alimentos - UFSC, 2008, Florianópolis/SC.

APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS

Neste capítulo são apresentados, para exemplificação, alguns cromatogramas obtidos no decorrer do estudo. A Figura 1A corresponde aos cromatogramas da cinética com as seguintes condições: 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e relação volumétrica de solvente:mistura de 1:1 (v/v), ao longo das 12h de reação. Ao final deste experimento obteve-se em torno de 55% (m/m) de MAG e 25% (m/m) de DAG (resultados em base livre de solvente e glicerol).

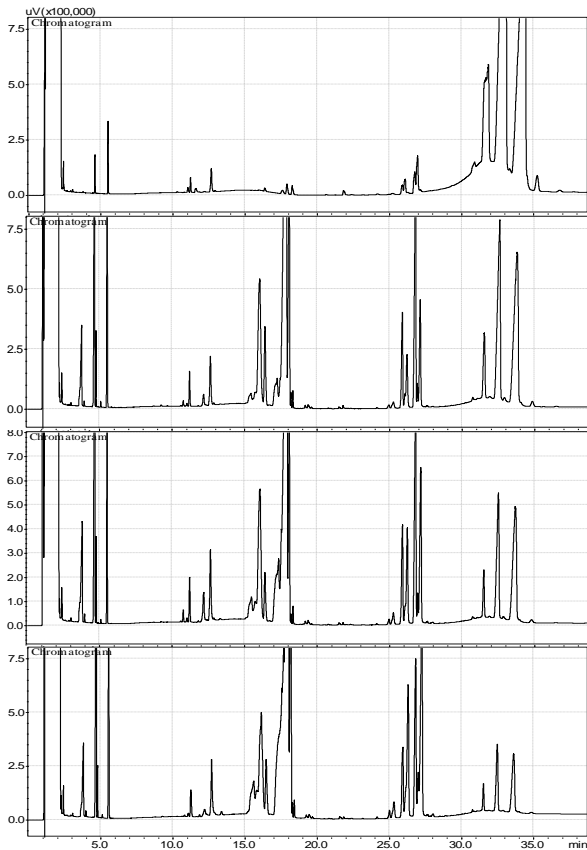


Figura 1A – Continua...

Figura 1A – Continuação...

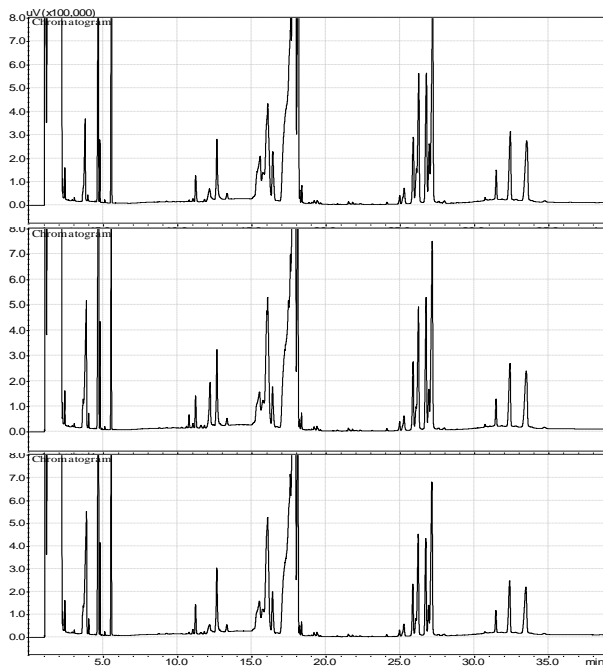


Figura 1A – Cromatogramas da cinética da reação de glicerólise enzimática utilizando solvente *tert*-butanol, 10% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 3:1 e relação volumétrica de solvente:mistura de 1:1 (v/v). Tempo de reação: (a) zero; (b) 30 min; (c) 1h; (d) 2h; (e) 4h; (f) 8h e (g) 12h. Onde: as áreas entre 4,5 a 5,5 min. correspondem a região de glicerol, de 10,5 a 12,5 min. correspondem a região de ácidos graxos livres, de 15 a 19 min. correspondem a região de MAGs, de 23 a 28 min. correspondem a região de DAGs e de 30 a 35 min. correspondem a região de TAGs.

APÊNDICE B – DETALHAMENTO DOS RESULTADOS DO ESTUDO CINÉTICO

Neste capítulo são apresentados nas Tabelas B.1 a B.19 os resultados experimentais obtidos nas cinéticas estudadas, em relação à concentração de MAGs, DAGs, TAGs e AGLs (m/m). Todos os experimentos utilizaram agitação magnética de 600 rpm e todos os resultados estão expressos em base livre de solvente e glicerol.

Tabela B.1 – Resultados da cinética sem enzima. Condições: 70°C, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.6).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,22	2,57	1,27	0,95
0,5	94,52	2,95	1,54	0,99
1	93,83	3,52	1,64	1,01
2	93,35	3,86	1,81	0,98
8	92,36	3,91	2,62	1,11
12	91,69	3,97	3,12	1,22

Tabela B.2 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 2,5% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura G/O de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7a).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,20	3,15	0,79	0,86
0,25	88,23	4,99	5,31	1,46
0,5	84,11	7,13	7,26	1,51
0,75	81,08	7,89	9,39	1,63
1	77,70	8,93	11,78	1,59
2	71,45	11,30	15,85	1,40
4	65,68	12,73	20,27	1,33
8	58,13	14,53	25,89	1,46
12	51,33	17,08	30,06	1,54

Tabela B.3 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 10% (m/m) de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura G/O de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7b).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,20	3,15	0,79	0,86
0,25	58,87	13,59	25,81	1,73
0,5	44,86	15,42	37,11	2,60
0,75	41,86	15,93	39,13	3,08
1	37,41	17,82	40,84	3,93
2	32,31	19,59	45,44	2,66
4	26,88	21,18	48,96	2,97
8	22,26	21,73	51,60	4,40
12	17,83	23,38	55,62	3,17

Tabela B.4 - Resultados da cinética nas condições: 70°C, 15% de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.7c).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,20	3,16	0,79	0,86
0,25	61,32	12,75	24,76	1,17
0,5	49,32	15,14	33,94	1,61
0,75	35,56	19,79	42,80	1,85
1	32,04	21,83	44,03	2,10
2	27,13	23,37	47,22	2,29
4	18,07	27,66	51,33	2,93
12	8,64	31,51	56,36	3,48

Tabela B.5 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8a).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	94,82	3,13	0,84	1,21
0,25	83,59	7,47	7,23	1,71
0,5	62,71	8,99	26,57	1,74
0,75	53,08	13,59	31,08	2,26
1	40,12	14,06	42,34	3,49
2	30,51	15,30	50,83	3,35
4	27,58	16,86	54,07	1,50
8	16,44	22,25	59,22	2,09
12	7,91	23,77	65,42	2,90

Tabela B.6 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8b).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	94,63	3,13	1,03	1,21
0,25	83,72	4,53	10,08	1,67
0,5	64,37	9,33	22,57	3,73
0,75	52,73	10,57	33,67	3,03
1	40,81	11,63	44,82	2,74
2	31,42	13,34	50,64	4,60
4	26,79	15,03	54,15	4,02
8	23,02	16,70	57,24	3,04
12	15,05	18,37	62,02	4,56

Tabela B.7 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.8c).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	94,63	3,13	1,03	1,21
0,25	86,59	4,64	7,44	1,33
0,5	77,30	4,94	15,85	1,90
0,75	72,42	6,41	19,44	1,74
1	57,84	10,09	29,35	2,72
2	40,46	12,62	44,07	2,85
4	30,41	14,71	52,49	2,38
8	25,81	15,39	54,77	4,03
12	19,41	19,00	57,74	3,85

Tabela B.8 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9a).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,20	3,16	0,79	0,86
0,25	71,57	5,48	21,97	0,98
0,5	57,54	11,61	28,97	1,88
0,75	51,03	11,97	34,33	2,66
1	38,77	15,35	43,44	2,44
2	30,90	18,35	45,71	5,04
4	30,59	18,77	46,47	4,18
8	24,06	20,17	51,49	4,27
12	17,72	22,86	53,59	5,83

Tabela B.9 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% de enzima, relação molar G:O de 6:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9b).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	94,63	3,13	1,03	1,21
0,25	64,78	9,69	23,12	2,41
0,5	46,35	13,60	37,32	2,74
0,75	33,40	15,31	48,90	2,39
1	29,90	16,55	51,31	2,23
2	27,55	17,57	53,19	1,69
4	20,33	18,89	55,28	5,50
8	14,84	21,77	58,49	4,90
12	6,88	23,58	63,70	5,83

Tabela B.10 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 15% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.9c).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
0,25	71,04	5,83	21,09	2,03
0,5	62,73	9,30	25,61	2,35
0,75	57,50	10,77	29,15	2,58
1	52,90	11,08	32,11	3,90
2	40,31	11,14	44,94	3,61
4	31,95	11,30	54,48	2,27
8	21,74	11,25	64,45	2,57
12	10,18	12,75	73,24	3,84

Tabela B.11 – Resultados da cinética nas condições: 70°C, 2,5% de enzima, relação molar G:O de 3:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 5:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10a).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,20	3,15	0,79	0,86
0,5	82,19	7,80	8,34	1,67
2	63,51	15,77	18,99	1,72
4	45,77	20,01	31,17	3,06
12	37,60	22,20	36,47	3,73

Tabela B.12 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 2,5% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10b).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
0,25	93,04	3,16	2,49	1,31
0,5	88,60	3,48	5,62	2,29
0,75	84,07	3,80	10,06	2,06
1	80,87	4,95	12,32	1,86
2	72,19	7,43	18,61	1,76
4	59,01	9,62	30,03	1,34
8	44,70	12,44	41,10	1,76
12	35,78	13,63	46,69	3,90

Tabela B.13 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 2,5% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 5:1 (v/v) (Referente a Figura 4.10b).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
0,5	86,12	5,37	7,03	1,48
2	57,57	10,09	29,74	2,60
4	48,45	11,37	38,07	2,11
12	24,87	17,09	54,67	3,36

Tabela B.14 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 1).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
0,25	84,67	3,96	9,71	1,65
0,5	79,15	4,63	14,76	1,46
0,75	74,27	4,78	19,34	1,61
1	70,17	5,79	22,68	1,36
2	50,29	9,04	39,61	1,06
4	27,31	9,20	61,91	1,58
8	21,39	10,33	66,40	1,87
12	16,66	12,40	68,46	2,48

Tabela B.15 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 2).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
1	66,83	5,61	26,11	1,45
2	41,15	9,64	46,96	2,25
4	25,53	12,57	58,44	3,45
8	18,99	12,25	65,03	3,73
12	7,64	14,00	73,11	5,25

Tabela B.16 – Resultados da cinética nas condições: 40°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 9:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.11 – Amostra 3).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	96,35	2,40	0,58	0,67
1	72,74	7,86	18,15	1,25
2	42,82	11,19	43,61	2,38
4	24,41	11,62	61,27	2,71
8	20,83	16,02	60,45	2,70
12	13,67	16,49	65,05	4,78

Tabela B.17 – Resultados da cinética sem solvente. Condições: 55°C, 15% de enzima e relação molar G:O de 3:1 (Referente a Figura 4.17).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,41	2,75	0,79	1,05
0,5	85,79	10,98	1,93	1,30
1	69,40	24,56	4,62	1,42
2	57,49	34,10	6,01	2,40
8	39,47	44,19	12,67	3,67
12	34,07	47,32	14,83	3,78

Tabela B.18 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 0,8:1 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.18a).

Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,54	2,40	0,83	1,22
0,5	72,72	20,20	5,04	2,03
1	66,64	23,73	7,55	2,07
2	47,67	33,42	13,67	5,25
8	30,88	49,26	13,41	6,45
12	23,81	56,74	12,80	6,65

Tabela B.19 – Resultados da cinética nas condições: 55°C, 10% de enzima, relação molar G:O de 0,5:1,5 e relação solvente:mistura glicerol/óleo de 1:1 (v/v) (Referente a Figura 4.18b).

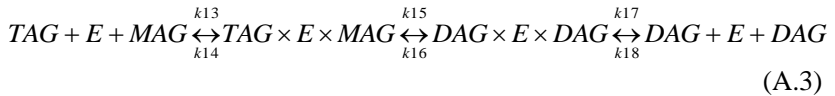
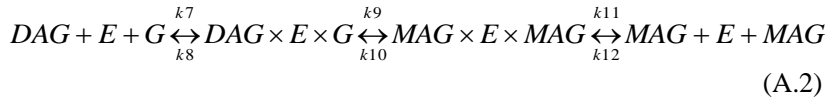
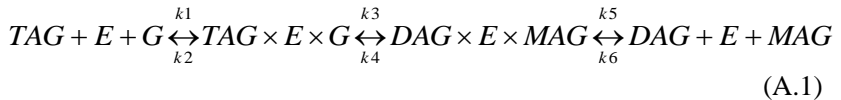
Tempo (h)	TAGs (%)	DAGs (%)	MAGs (%)	AGLs (%)
0	95,75	2,21	0,91	1,13
0,5	61,18	31,17	5,74	1,91
1	48,69	41,29	7,95	2,07
2	42,93	45,99	7,12	3,96
8	37,41	51,08	6,68	4,83
12	37,24	51,59	6,05	5,13

- ANEXO 1 – Modelagem matemática utilizando a abordagem do mecanismo cinético 2

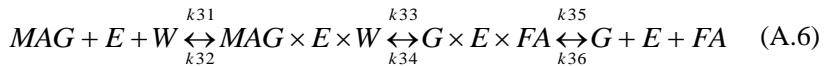
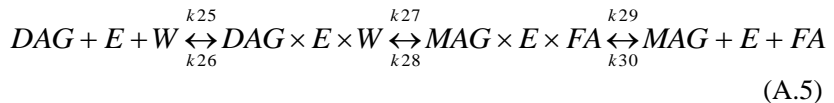
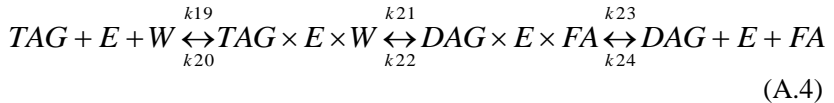
Esta abordagem teve como objetivo avaliar o modelo matemático obtido através de uma proposta diferenciada daquela utilizada no mecanismo cinético 1, o qual desprezou, na formulação do balanço de massa, a formação dos complexos enzimáticos e outras variáveis relacionadas com a presença da enzima no meio reacional, os quais estão aqui considerados. Esta fase do trabalho teve parceria com o doutorando em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – Fernando Voll, como referência, Voll, 2010.

Para o mecanismo cinético 2, as seguintes equações para as reações de glicerólise e hidrólise foram propostas:

Glicerólise:



Hidrólise/esterificação:



Onde: G, W, FA e E correspondem as concentrações de glicerol, água, ácidos graxos livres e enzima, respectivamente.

A velocidade de reação para cada componente do sistema pode ser descrita pelas seguintes equações diferenciais:

$$\begin{aligned} \frac{d[TAG]}{dt} = & -k_1 \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [G] + k_2 \cdot [TAG \times E \times G] - k_{13} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [MAG] \\ & + k_{14} \cdot [TAG \times E \times MAG] - k_{19} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [W] + k_{20} \cdot [TAG \times E \times W] \end{aligned} \quad (A.7)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG]}{dt} = & k_5 \cdot [DAG \times E \times MAG] - k_6 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [MAG] - k_7 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [G] \\ & + k_8 \cdot [DAG \times E \times G] + 2 \cdot k_{17} \cdot [DAG \times E \times DAG] - 2 \cdot k_{18} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [DAG] \\ & + k_{23} \cdot [DAG \times E \times FA] - k_{24} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [FA] - k_{25} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [W] \\ & + k_{26} \cdot [DAG \times E \times W] \end{aligned} \quad (A.8)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAG]}{dt} = & k_5 \cdot [DAG \times E \times MAG] - k_6 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [MAG] + 2 \cdot k_{11} \cdot [MAG \times E \times MAG] \\ & - 2 \cdot k_{12} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [MAG] - k_{13} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [MAG] + k_{14} \cdot [TAG \times E \times MAG] \\ & + k_{29} \cdot [MAG \times E \times MAG] - k_{30} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [FA] - k_{31} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [W] \\ & + k_{32} \cdot [MAG \times E \times W] \end{aligned} \quad (A.9)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[FA]}{dt} = & k_{23} \cdot [DAG \times E \times FA] - k_{24} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [FA] + k_{29} \cdot [MAG \times E \times FA] \\ & - k_{30} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [FA] + k_{35} \cdot [G \times E \times FA] - k_{36} \cdot [G] \cdot [E] \cdot [FA] \end{aligned} \quad (A.10)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[G]}{dt} = & -k_1 \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [G] + k_2 \cdot [TAG \times E \times G] - k_7 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [G] \\ & + k_8 \cdot [DAG \times E \times G] + k_{35} \cdot [G \times E \times FA] - k_{36} \cdot [G] \cdot [E] \cdot [FA] \end{aligned} \quad (A.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[W]}{dt} = & -k_{19} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [W] + k_{20} \cdot [TAG \times E \times W] - k_{25} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [W] \\ & + k_{26} \cdot [DAG \times E \times W] - k_{31} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [W] + k_{32} \cdot [MAG \times E \times W] \end{aligned} \quad (A.12)$$

As velocidades de reação dos diferentes complexos enzimáticos podem ser descritas como relações de pseudo-equilíbrio, como segue:

$$\begin{aligned} \frac{d[TAG \times E \times G]}{dt} = 0 = & k_1 \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [G] - k_2 \cdot [TAG \times E \times G] \\ & - k_3 \cdot [TAG \times E \times G] + k_4 \cdot [DAG \times E \times MAG] \end{aligned} \quad (A.13)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG \times E \times MAG]}{dt} = 0 = & k_3 \cdot [TAG \times E \times G] - k_4 \cdot [DAG \times E \times MAG] \\ & - k_5 \cdot [DAG \times E \times MAG] + k_6 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [MAG] \end{aligned} \quad (A.14)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG \times E \times G]}{dt} = 0 = & k_7 \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [G] - k_8 \cdot [DAG \times E \times G] \\ & - k_9 \cdot [DAG \times E \times G] + k_{10} \cdot [MAG \times E \times MAG] \end{aligned} \quad (A.15)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAG \times E \times MAG]}{dt} = 0 = & k_9 \cdot [DAG \times E \times G] - k_{10} \cdot [MAG \times E \times MAG] \\ & - k_{11} \cdot [MAG \times E \times MAG] + k_{12} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [MAG] \end{aligned} \quad (A.16)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[TAG \times E \times MAG]}{dt} = 0 = & k_{13} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [MAG] - k_{14} \cdot [TAG \times E \times MAG] \\ & - k_{15} \cdot [TAG \times E \times MAG] + k_{16} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [DAG] \end{aligned} \quad (A.17)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG \times E \times DAG]}{dt} = 0 &= k_{15} \cdot [TAG \times E \times MAG] - k_{16} \cdot [DAG \times E \times DAG] \\ &\quad - k_{17} \cdot [DAG \times E \times DAG] + k_{18} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [DAG] \end{aligned} \quad (A.18)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[TAG \times E \times W]}{dt} = 0 &= k_{19} \cdot [TAG] \cdot [E] \cdot [W] - k_{20} \cdot [TAG \times E \times W] \\ &\quad - k_{21} \cdot [TAG \times E \times W] + k_{22} \cdot [DAG \times E \times FA] \end{aligned} \quad (A.19)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG \times E \times FA]}{dt} = 0 &= k_{21} \cdot [TAG \times E \times W] - k_{22} \cdot [DAG \times E \times FA] \\ &\quad - k_{23} \cdot [DAG \times E \times FA] + k_{24} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [FA] \end{aligned} \quad (A.20)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[DAG \times E \times W]}{dt} = 0 &= k_{25} \cdot [DAG] \cdot [E] \cdot [W] - k_{26} \cdot [DAG \times E \times W] \\ &\quad - k_{27} \cdot [DAG \times E \times W] + k_{28} \cdot [MAG][E][FA] \end{aligned} \quad (A.21)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAG \times E \times FA]}{dt} = 0 &= k_{27} \cdot [DAG \times E \times W] - k_{28} \cdot [MAG \times E \times FA] \\ &\quad - k_{29} \cdot [MAG \times E \times FA] + k_{30} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [FA] \end{aligned} \quad (A.22)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[MAG \times E \times W]}{dt} = 0 &= k_{31} \cdot [MAG] \cdot [E] \cdot [W] - k_{32} \cdot [MAG \times E \times W] \\ &\quad - k_{33} \cdot [MAG \times E \times W] + k_{34} \cdot [G \times E \times FA] \end{aligned} \quad (A.23)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[G \times E \times FA]}{dt} = 0 &= k_{33} \cdot [MAG \times E \times W] - k_{34} \cdot [G \times E \times FA] \\ &\quad - k_{35} \cdot [G \times E \times FA] + k_{36} \cdot [G] \cdot [E] \cdot [FA] \end{aligned} \quad (A.24)$$

A concentração total de enzima ($[E_T]$) é expressa como a soma das concentrações dos complexos e de enzima livre:

$$\begin{aligned}
 [E_T] = & [E] + [TAG \times E \times G] + [DAG \times E \times MAG] + [DAG \times E \times G] + [MAG \times E \times MAG] \\
 & + [TAG \times E \times MAG] + [DAG \times E \times DAG] + [TAG \times E \times W] + [DAG \times E \times FA] \\
 & + [DAG \times E \times W] + [MAG \times E \times FA] + [MAG \times E \times W] + [G \times E \times FA]
 \end{aligned}
 \tag{A.25}$$

As Eq.s (A.13)-(A.25), após algumas manipulações algébricas, podem ser reescritas para expressar as concentrações dos complexos e da enzima livre, em função das concentrações de TAG , DAG , MAG , FA , G , W e E_T . As funções resultantes podem ser substituídas nas Eq.s (A.7)-(A.12), e após mais algumas manipulações algébricas as seguintes velocidades de reação são obtidas:

$$\frac{d[TAG]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(\begin{aligned} & -V_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + V_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] - V_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] \\ & + V_6 \cdot [DAG]^2 - V_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + V_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] \end{aligned} \right)}{\left(\begin{aligned} & 1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ & + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \\ & + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ & + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{aligned} \right)}
 \tag{A.26}$$

$$\frac{d[DAG]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(\begin{aligned} & V_1 \cdot [TAG] \cdot [G] - V_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] - V_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ & + V_4 \cdot [MAG]^2 + 2 \cdot V_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] - 2 \cdot V_6 \cdot [DAG]^2 \\ & + V_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] - V_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] \\ & - V_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] + V_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] \end{aligned} \right)}{\left(\begin{aligned} & 1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ & + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \\ & + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ & + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{aligned} \right)}
 \tag{A.27}$$

$$\frac{d[MAG]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(\begin{array}{c} V_1 \cdot [TAG] \cdot [G] - V_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + 2 \cdot V_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ - 2 \cdot V_4 \cdot [MAG]^2 - V_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + V_6 \cdot [DAG]^2 \\ + V_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] - V_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] \\ - V_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + V_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} 1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \\ + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)} \quad (\text{A.28})$$

$$\frac{d[FA]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(\begin{array}{c} V_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] - V_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + V_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ - V_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + V_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] - V_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} 1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \\ + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)} \quad (\text{A.29})$$

$$\frac{d[G]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(\begin{array}{c} -V_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + V_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] - V_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ + V_4 \cdot [MAG]^2 + V_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] - V_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)}{\left(\begin{array}{c} 1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \\ + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \\ + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \\ + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \end{array} \right)} \quad (\text{A.30})$$

$$\frac{d[W]}{dt} = \frac{a \cdot [ET] \cdot \left(-V_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + V_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] - V_9 [DAG] \cdot [H_2O] \right.}{\left. + V_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] - V_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + V_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \right)}{\left(1 + K_1 \cdot [TAG] \cdot [G] + K_2 \cdot [MAG] \cdot [DAG] + K_3 \cdot [DAG] \cdot [G] \right.}$$

$$\left. + K_4 \cdot [MAG]^2 + K_5 \cdot [TAG] \cdot [MAG] + K_6 \cdot [DAG]^2 \right.}$$

$$\left. + K_7 \cdot [TAG] \cdot [H_2O] + K_8 \cdot [DAG] \cdot [FA] + K_9 \cdot [DAG] \cdot [H_2O] \right.}$$

$$\left. + K_{10} \cdot [MAG] \cdot [FA] + K_{11} \cdot [MAG] \cdot [H_2O] + K_{12} \cdot [G] \cdot [FA] \right) \quad (\text{A.31})$$

Um ponto importante para a formulação do modelo é a conveniente expressão da concentração de enzima em termos de massa da enzima e massa de substrato, os quais são valores conhecidos no início da reação.

As constantes V_i e K_i ($i = 1, \dots, 12$) são funções das constantes k_i ($i = 1, \dots, 36$). Os valores das velocidades inicial máximas de reação (V^{\max}_i) podem ser encontradas pela seguinte expressão:

$$V^{\max}_i = \frac{[ET] \cdot V_i}{K_i} \quad i = 1, \dots, 12 \quad (\text{A.32})$$

Por exemplo: a velocidade inicial máxima da reação para a hidrólise de MAGs pode ser expressa como $[ET] \cdot V_7 / K_7$, e a velocidade inicial máxima da reação de glicerólise de DAGs pode ser expressa como $[ET] \cdot V_3 / K_3$.

Outras considerações, como o cálculo da atividade da enzima (termo “a”), a estimação de desativação da enzima por perda de atividade e pelo glicerol (da/dt) e a relação da reação de glicerólise com a temperatura (V_i), seguem como apresentado para a abordagem do mecanismo cinético 1 (Capítulo 4, item 4.5.1.2).

Porém, para o ajuste dos parâmetros, 10 conjuntos de experimentos (cinéticas), com seis a nove pontos cada conjunto, totalizando 67 pontos experimentais do conteúdo de TAGs, DAGs, MAGs e AGLs, foram utilizados para o ajuste do modelo cinético. A concentração de água no meio considerada foi a mesma que a utilizada no mecanismo cinético 1, 3% no glicerol. Na Tabela An.1 encontram-se os conteúdos iniciais utilizados no ajuste do modelo desta abordagem.

Tabela An.1 – Conteúdo inicial dos substratos (%m/m).

G:O (mol/mol)	[TAG]	[DAG]	[MAG]	[FA]	[G]	[W]
6:1	57,74	1,91	$6,3 \times 10^{-1}$	$7,4 \times 10^{-1}$	37,81	1,17
3:1	72,34	2,40	$6,0 \times 10^{-1}$	$6,5 \times 10^{-1}$	23,28	$7,2 \times 10^{-1}$
0.8:1	87,92	2,21	$9,5 \times 10^{-1}$	1,13	7,56	$2,3 \times 10^{-1}$
0.33:1	91,79	2,12	1,08	1,08	3,78	$1,2 \times 10^{-1}$

Os parâmetros do modelo (A_i , Ea_i and kd) foram estimados do ajuste dos dados experimentais através da minimização da seguinte função objetivo:

$$f = \sum_j^{NOBS} \sum_k^{NCOM} (X_{jk}^{exp} - X_{jk}^{calc})^2 \quad (33)$$

O programa computacional desenvolvido para implementação e estimação dos parâmetros utilizou o mesmo software e as mesmas subrotinas que o item 4.5.1.2, Capítulo 4, bem como os cálculos dos desvios médios quadráticos (*rmsd*).

Os parâmetros ajustados pelo modelo cinético proposto para esta abordagem encontram-se nas Tabelas An.2 e An.3. Os valores dos desvios médios quadráticos foram de $rmsd_{TAG} = 4.19$, $rmsd_{DAG} = 2.73$, $rmsd_{MAG} = 3.58$ and $rmsd_{FA} = 1.04$ para TAG, DAG, MAG e FA, respectivamente.

Tabela An.2 – Parâmetros estimados pelo modelo cinético (equações das velocidades de reação).

i	K_i ($\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}^2$)	A_i ($\text{g}_{\text{substrato}}^2/$ ($\text{g}_{\text{enzima}} \cdot \text{min} \cdot \text{mmol}$))	Ea_i (K)
1	$2,28 \times 10^{-1}$	5953,71	2201,07
2	$1,94 \times 10^{-3}$	16,42	$6,45 \times 10^{-3}$
3	-	-	-
4	$1,77 \times 10^{-4}$	50,85	$1,32 \times 10^{-2}$
5	$9,93 \times 10^{-4}$	47,46	$1,01 \times 10^{-1}$
6	$1,63 \times 10^{-4}$	2,02	41,97
7	757,72	10615	1869,91
8	-	-	-
9	$4,41 \times 10^{-5}$	1796,63	280,37
10	5236,95	-	-
11	$8,90 \times 10^{-3}$	282449000	5468,07
12	$2,96 \times 10^{-3}$	117844	1897,15

Tabela An.3 - Parâmetros estimados pelo modelo cinético (equação de desativação)

kd ($\text{min} \cdot \text{mmol}_{\text{glicérol}}^{-1}$)	n	q
$1,11 \times 10^{-2}$	2	1