



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE  
FLUIDOS PRESSURIZADOS E ULTRASSOM PARA  
PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A  
PARTIR DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE  
ÓLEO DE OLIVA**

**KARINA GRAZIELLA FIAMETTI**

**FLORIANÓPOLIS/SC  
2012**



**Karina Graziella Fiametti**

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE  
FLUIDOS PRESSURIZADOS E ULTRASSOM PARA  
PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A  
PARTIR DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE  
ÓLEO DE OLIVA**

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

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.  
Co-orientador: Prof. Dr. José Vladimir  
de Oliveira

**Florianópolis/SC  
2012**



**Desenvolvimento de técnicas alternativas para produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva**

Por

**Karina Graziella Fiametti**

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.  
**orientador**

---

Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira  
**co-orientador**

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
**coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

---

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

---

Prof. Dr. Marcelo Lanza

---

Prof. Dr. Marco Antonio Zachia Ayub

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nadia Krieger

**Florianópolis, 13 de abril de 2012**



Dedico esta tese aos meus pais,  
por serem meus maiores incentivadores.  
Dedico também ao meu amor, Thiago,  
por me ajudar nesta conquista.





## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por me orientar a escolher o melhor caminho.

A minha família, em especial aos meus pais Olivio e Iluciene, e meu irmão Regis, pelo incentivo e apoio dedicados à mim.

Ao meu orientador, Agenor Furigo Jr., pela confiança e suporte fornecidos ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador José Vladimir de Oliveira, pela sua ajuda, disposição e motivação durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, por oferecer toda a estrutura e apoio para a realização deste trabalho.

À professora Débora de Oliveira, pelo apoio, aprendizado e principalmente pela amizade ao longo da minha formação.

Ao meu “namorido” Thiago, pela sua imensa paciência comigo, pelo seu amor incondicional, e por fazer meus dias sempre mais alegres.

À querida família Picoli Ghisleni: Cilda, Joel e Julia. Agradeço a vocês pela amizade, companheirismo, ajuda e alegria que me proporcionaram nos anos que passei em Erechim. Vocês não imaginam o quanto são importantes para mim!

À amiga Roberta Kruger, pela sua contribuição, amizade e coração imenso. Te admiro muito!

Aos grandes amigos que fiz em Florianópolis: Luis, Luis Carlos (Caco) e Marieli, obrigada pela amizade e companhia da sinuca!

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Graciele, Marcell, Josamaique, Stéphanie, Clarissa, Renata, Jéssica, Patricia, Manuela, Mara Ustra, pelas risadas e companheirismo.

Em especial a Eline Rosset, Aline De Cesaro e Melânia Sychoski pela ajuda proporcionada para a realização dos experimentos desta tese e pela companhia.

À URI – Campus de Erechim e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.



*“O que for a profundidade do teu ser, assim será teu desejo.  
O que for o teu desejo, assim será tua vontade.  
O que for tua vontade, assim serão teus atos.  
O que forem teus atos, assim será teu destino.”*

**Chopra**



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

## **DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICAS ALTERNATIVAS EM FLUIDOS PRESSURIZADOS E ULTRASSOM PARA PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEO DE OLIVA**

Este trabalho teve como objetivo a otimização dos parâmetros de reação para a produção de mono e diacilgliceróis catalisada pela lipase Novozym 435 em fluido pressurizado e ultrassom, na presença ou não de agentes surfactantes. A estratégia sequencial de planejamentos de experimentos mostrou-se útil na maximização das condições para a conversão do produto no sistema com fluido pressurizado utilizando Novozym 435 como catalisador, onde delineou-se as melhores condições para a realização de experimentos avaliando a cinética da reação. A condição ótima para conversão do produto em n-butano foi razão mássica de solventes (n-butano) para substratos de 4:1, pressão de 10 bar, razão molar de glicerol:óleo de 2:1, agitação de 600 rpm, 70 °C, concentração de AOT em 7,5 %, concentração de enzima de 7,5 % (para ambos em massa em relação aos substratos) em 2 horas, resultando em uma concentração de MAG e DAG de cerca de 71 % e 9 %, respectivamente. O estudo cinético de reação para a produção de MAG e DAG mostrou conversão satisfatória (~65 % MAG e 10 % DAG) em 6 horas de reação. Em sistema de ultrassom, os experimentos foram desenvolvidos em sistema batelada para o estudo das cinéticas das reações e avaliação dos efeitos da temperatura (50 a 70 °C), concentração de enzima imobilizada (2,5 a 10 %, m/m, em relação aos substratos), relação molar de glicerol:óleo (0,8:1; 1:1; 2:1 e 3:1), com potência de ultrassom em 132 W. Os resultados mostraram que a glicerólise de óleo de oliva catalisada por lipase em meio ultrassônico pode ser uma potencial rota para a produção de MAG e DAG sem a utilização de surfactantes. Os resultados também mostraram que é possível maximizar a produção de MAG e/ou DAG, dependendo da relação molar de glicerol:óleo utilizada no sistema reacional. Elevados conteúdos de MAG (~39 %, m/m) e DAG (~45 %, m/m) foram obtidos usando relação molar de glicerol:óleo de 2:1 e 0,8:1, e concentrações de enzima de 7,5 % (m/m), ambos em 6 horas de reação a 70 °C, 600 rpm e potência de 132 W. Os maiores conteúdos da mistura de MAG + DAG

(~64 %, m/m) foram obtidos utilizando relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1, a 70 °C, 600 rpm, concentração de enzima de 7,5 % (m/m) e potência de 132 W.

***Palavras-chave:*** lipase, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, óleo de oliva, n-butano, ultrassom.

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

**DEVELOPMENT OF ALTERNATIVE TECHNIQUES OF  
PRESSURIZED FLUIDS AND ULTRASSOUND FOR  
PRODUCTION OF MONOGLYCERIDES AND DIGLYCERIDES  
FROM ENZYMATIC GLYCEROLYSIS REACTION OF OLIVE  
OIL**

This study aimed at optimizing the reaction parameters for the production of monoacylglycerols and diacylglycerols catalyzed by lipase Novozym 435 in pressurized fluid and ultrasound in the presence or absence of surfactants. The strategy of sequential planning of experiments proved to be useful in maximizing the conditions for the conversion of the product in the system with pressurized fluid using Novozym 435 as catalyst, which delimited the best conditions for the realization of experiments evaluating the reaction kinetics. The optimum condition for conversion of the product using n-butane as pressurized fluid was weight ratio of solvent (n-butane) to substrates of 4:1, pressure of 10 bar, glycerol:oil molar ratio 2:1, 600 rpm agitation, 70 °C, AOT concentration of 7.5% and enzyme concentration of 7.5% (both by substrates weight) in two hours of reaction, resulting in a concentration of MAG and DAG about 71% and 9%, respectively. The reaction kinetics study for the production of MAG and DAG showed satisfactory concentration (~ 65% MAG and 10% DAG) in 6 hours of reaction. In ultrasound system, the experiments were conducted in batch system for studying the reactions kinetic and evaluation of the effects of temperature (50 - 70 °C), concentration of immobilized enzyme (2.5 to 10% w/w, in relation to substrates), glycerol:oil molar ratio (0.8:1, 1:1, 2:1 and 3:1), with ultrasound power of 132 W. The results showed that the lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in ultrasonic system may be a potential route for the production of MAG and DAG without the use of surfactants. The results also showed that it is possible to maximize the production of MAG and/or DAG, depending on the molar ratio glycerol:oil used in the reaction system. High contents of MAG (~ 39%) and DAG (~ 45%) were obtained using a molar ratio glycerol: oil ratio of 2:1 and 0.8:1, and enzyme concentrations of 7.5% (w/w), both in 6 hours of reaction at 70 °C, 600 rpm and power of 132W. The highest content of the mixture MAG + DAG (~ 64%) were obtained using molar

ratio glycerol:oil 0.8:1, at 70 °C, 600 rpm, enzyme concentration of 7.5% (w/w) and power of 132 W.

**Keywords.** Lipase, monoacylglycerols, diacylglycerols, olive oil, n-butane, ultrasound



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1. Objetivo geral do trabalho.....	29
1.2. Objetivos específicos.....	30
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
2.1. Limitações atuais da tecnologia de modificação de óleos e gorduras .....	31
2.2. Azeite de oliva.....	32
2.3. Glicerol.....	34
2.4. Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis.....	35
2.5. Glicerólise de óleos vegetais .....	38
2.6. Lipases como catalisadores .....	40
2.7. Glicerólise enzimática .....	44
2.8. Surfactantes .....	46
2.9. Microemulsões .....	47
2.9.1. Aspectos aplicados a microemulsões contendo enzimas.....	48
2.10. Produção enzimática de MAG e DAG em fluidos pressurizados.....	49
2.11. Catálise enzimática em ultrassom .....	52
2.12. Considerações sobre o estado da arte .....	56
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
3.1. Materiais.....	59
3.2. Técnicas analíticas.....	60
3.2.1. Análise de Monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos.....	60
3.3. Descrição dos aparatos e procedimentos experimentais utilizados nas reações de glicerólise enzimática .....	60
3.3.1 Preparação e análise das amostras.....	65
3.4 Planejamento experimental .....	65
3.4.1. Estudo da produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado.....	65
3.4.2. Estudo da cinética enzimática com fluido pressurizado e na presença de surfactante.....	66
3.5. Estudo da produção enzimática de MAG e DAG em sistemas de ultrassom .....	66
3.6 Determinação da atividade enzimática de esterificação .....	67
3.7. Determinação das velocidades iniciais de reação.....	69

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
4.1 Produção enzimática de mono e diglicerídeos em n-butano pressurizado na presença de surfactante AOT .....	71
4.1.1 Efeito da pressão, temperatura e concentração de surfactante AOT no sistema .....	71
4.1.2 Estudo cinético da glicerólise enzimática em n-butano pressurizado na presença de surfactante AOT .....	79
4.1.2.1 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado na presença do surfactante AOT.....	80
4.1.2.2 Efeito da razão molar de glicerol para óleo de oliva na cinética de produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado na presença do surfactante AOT.....	82
4.2 Estudo da produção de MAG e DAG em sistema de ultrassom .....	85
4.3 Estudo cinético da glicerólise enzimática em meio ultrassônico ....	89
4.3.1 Efeito da razão molar glicerol:óleo .....	92
4.3.2 Influência da temperatura de reação .....	100
4.3.3 Influência da concentração de enzima no meio reacional.....	102
4.4 Medida da atividade enzimática.....	103
4.5. Considerações finais .....	106
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>109</b>
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	110
5.2 Produção científica decorrente da consecução desta tese .....	111
5.2.1 Artigos completos publicados em periódicos científicos.....	111
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>113</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>129</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Estrutura genérica de um triglicerídeo .....	33
<b>Figura 2.2</b> – Estrutura de uma molécula de glicerol.....	34
<b>Figura 2.3</b> - Representação da reação de formação de monoglicerídeo..	36
<b>Figura 2.4</b> - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6). Onde: Gly = glicerol, AGL = ácidos graxos livres, e $k_1$ - $k_{12}$ = constantes de reação.....	39
<b>Figura 2.5</b> - Tipos de microemulsões: 1) micela reversa, 2) micela normal. ....	48
<b>Figura 2.6</b> - Efeito do solvente no equilíbrio de fases do sistema AOT/solvente(1) + glicerol/óleo de oliva(2) para fração mássica da razão glicerol/óleo de oliva no solvente de aproximadamente 0,100. Razão molar glicerol para óleo de oliva de 2:1 e 5% (m/m) de AOT em solvente (glicerol/óleo de oliva em base livre). (Reproduzido do trabalho de Bender <i>et al.</i> , 2008). ....	51
<b>Figura 3.1</b> – Diagrama esquemático do aparato experimental para produção de MAG e DAG em fluidos pressurizados: cilindro de n- butano, (CV) “ <i>check valve</i> ”, (BS) bomba de alta pressão, (BT) banho termostático, (V1) válvula de segurança, (V2) válvula de alimentação, (V3) válvula de amostragem, (V4) válvula de alívio, (CR) unidade controladora de pressão, temperatura e agitação, (R) reator. ....	61
<b>Figura 3.2</b> – Vistas da unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em fluido pressurizado. ....	62
<b>Figura 3.3</b> – Esquema da segunda unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom.....	63
<b>Figura 3.4</b> – Terceira unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom. ....	64
<b>Figura 3.5</b> – Equipamento utilizado para medida de atividade enzimática. Onde: a) reator encamisado; b) banho termostático e c) agitador magnético. ....	68
<b>Figura 4.1</b> - Gráfico de Pareto dos efeitos de temperatura, pressão e concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0,05$ ). ....	73
<b>Figura 4.2</b> – Gráfico de Pareto dos efeitos de Temperatura, Pressão e Concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0,05$ ) baseado nos dados experimentais do segundo planejamento experimental. ....	77
<b>Figura 4.3</b> - Gráfico de Pareto dos efeitos de pressão e concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0,05$ ) baseado nos dados experimentais do terceiro planejamento experimental. ....	79

**Figura 4.4** - Efeito da adição de enzima sobre a concentração de MAG e DAG à temperatura de 70 °C, 10 bar, agitação em 600 rpm, razão molar glicerol:óleo de 2:1, razão mássica solvente para substratos de 4:1 e 7,5% (m/m) de AOT em relação à massa dos substratos. (a) 5% (m/m), (b) 7,5% (m/m) e (c) 10% (m/m) de enzima imobilizada. .... 81

**Figura 4.5** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, 10 bar, concentração de enzima de 7,5% (m/m), razão mássica de n-butano para substratos de 4:1, agitação de 600 rpm e concentração de AOT de 7,5% (em relação à massa dos substratos). (a) 2:1, (b) 6:1 e (c) razão molar glicerol:óleo de 10:1. .... 83

**Figura 4.6** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 2,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1. .... 93

**Figura 4.7** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 7,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) cinética de razão molar glicerol:óleo de 3:1. .... 94

**Figura 4.8** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 10% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1. .... 96

**Figura 4.9** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 50 °C, agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1 com concentração de enzima de 7,5% e, (c) razão molar glicerol:óleo de 2:1, com concentração de enzima de 10% (m/m). .... 98

**Figura 4.10** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 60 °C, concentração de enzima de 10% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1, (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1. .... 99

**Figura 4.11** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a temperatura. Condições experimentais: razão molar glicerol:óleo 2:1, concentração de enzima de 7,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência

do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 50 °C, (b) 60 °C, (c) 70 °C..... 101

**Figura 4.12** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a concentração de enzima no meio reacional. Condições experimentais: razão molar glicerol:óleo 2:1, temperatura de 60 °C, agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 2,5%, (b) 7,5% e (c) 10% de enzima em relação à massa dos substratos. .... 102

**Figura 1A** – Cromatogramas da cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva, 7,5% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 1:1. Tempo de reação: (a) zero; (b) 30 min; (c) 1h; (d) 2h; (e) 4h e (f) 6h. Onde: as áreas entre 4,5 a 6,5 min. correspondem a região de glicerol, de 11 a 14 min. correspondem a região de ácidos graxos livres, de 16 a 20 min. correspondem a região de MAG, de 23 a 28 min. correspondem a região de DAG e de 30 a 36 min. correspondem a região de TAG. .... 129

**Figura 1A** – Continuação... ..... 130



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1-</b> Composição química do azeite de oliva .....	34
<b>Tabela 2.2</b> - Alguns dos principais estudos sobre glicerólise encontrados na literatura.....	42
<b>Tabela 4.1</b> - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG + DAG. Condições reacionais: razão molar glicerol óleo de oliva de 2:1, 7,5% (m/m) de Novozym 435, 600 rpm, razão mássica de solvente (n-butano) para substratos mantida constante em 4:1 e 2 horas de reação.....	72
<b>Tabela 4.2</b> - Matriz do segundo planejamento experimental, mostrando os valores reais e codificados, com resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG. Efeito da temperatura, pressão e concentração de AOT na glicerólise enzimática do óleo de oliva com (10 e 20 bar) e sem (1 bar, pressão ambiente) butano pressurizado. Condições reacionais: razão molar de glicerol:óleo, 2:1, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, razão mássica solvente:substratos constante em 4:1 (experimentos com n-butano) e 2 horas de reação.....	74
<b>Tabela 4.3</b> – Coeficientes de regressão para a produção de MAG – Primeiro planejamento experimental.....	75
<b>Tabela 4.4</b> – Análise de variância para a produção de MAG no primeiro planejamento experimental.....	76
<b>Tabela 4.5</b> - Matriz do terceiro planejamento experimental, com os valores reais e codificados, e resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG. Efeito da pressão e concentração de AOT na glicerólise enzimática do óleo de oliva com (10 e 20 bar) e sem butano pressurizado (1 bar, pressão ambiente). Condições reacionais: 30 °C, razão molar de glicerol:óleo, 2:1, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, razão mássica solvente:substratos constante em 4:1 (para os experimentos utilizando n-butano) e 2 horas de reação.....	78
<b>Tabela 4.6</b> - Velocidades iniciais das cinéticas estudadas em relação à formação de monoglicerídeos e diglicerídeos e ao consumo de	

triglicerídeos. Valores para uma base de cálculo de 100 g de substratos. .....	80
<b>Tabela 4.7</b> - Resultados de glicerólise do óleo de oliva sob irradiação ultrassônica, utilizando o Aparato 1, sem agitação e temperatura constante de 65°C e razão molar glicerol para óleo de 2:1. ....	86
<b>Tabela 4.8</b> - Resultados de glicerólise enzimática em banho de ultrassom a 600 rpm, 65 °C, razão molar glicerol para óleo de 2:1, potência do ultrassom de 132 W e 2 h de reação. ....	87
<b>Tabela 4.9</b> - Resultados de velocidades iniciais de formação de MAG e DAG em reações de glicerólise enzimática em meio ultrassônico, com 6 horas de reação, potência do ultrassom de 132W e agitação de 600 rpm. .....	91
<b>Tabela 4.10</b> – Valores de atividade enzimática e atividade enzimática residual para os experimentos de glicerólise enzimática em meio ultrassônico. ....	104



## **LISTA DE ABREVIACES**

ANP – Agência Nacional de Petróleo  
AGL – cido graxo livre  
CNPE – Conselho Nacional de Política Energética  
DAG – Diacilglicerol  
E – Enzima  
FA – cido graxo livre  
Gly – Glicerol  
G:O – Glicerol:leo  
GRAS – Generally Recognized As Safe  
MAG – Monoacilglicerol  
MSTFA - N-methy-N-trimethyltrifluoroacetamide  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
TAG – Triacilglicerol



# 1. INTRODUÇÃO

A atual situação mundial vem provocando o rápido avanço em pesquisas que visam ao desenvolvimento de tecnologias limpas, assim como a busca por combustíveis alternativos provindos de fontes renováveis, como o biodiesel. Entretanto, a rápida expansão da produção de biodiesel é acompanhada de um excesso de produção de glicerina e, conseqüentemente, há a necessidade de se encontrar um destino para este produto.

Apesar deste produto dispor de aplicações no mercado de cosméticos, o aumento de sua oferta precisa ser precedido de análise sobre aplicação em outros segmentos, o que pode configurar uma área específica de pesquisa, a gliceroquímica (Oliveira e Costa, 2002). Neste sentido, existem estudos buscando encontrar novas aplicações e novos mercados para a glicerina, que tornariam ainda mais interessante a produção de biodiesel (Felizardo, 2003).

Segundo Kirk-Othmer (2007) a demanda pela glicerina vem crescendo mais nos mercados de uso pessoal, higiene dental e alimentos, onde o produto tem maior pureza e valor agregado, correspondendo a 64% do total da glicerina utilizada em diferentes áreas. Uma outra aplicação interessante a se considerar é a síntese de monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG) a partir do glicerol, utilizando diferentes técnicas.

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, 2001). É neste contexto que surge o uso de monoglicerídeos e diglicerídeos na indústria alimentícia e farmacêutica, por representarem uma importante classe de produtos nestas indústrias. No setor alimentício, são amplamente utilizados como emulsificantes, principalmente em produtos de panificação, margarinas e produtos da indústria leiteira. Na linha de cosméticos, os MAG são usados como agentes de textura em cremes, pastas e loções (Bornscheuer, 1995). Na área da saúde, os DAG são classificados como alimentos funcionais que auxiliam principalmente no combate às altas taxas de colesterol e triglicérides (Seong-Koon *et al.*, 2007). Com base na ampla utilização em diferentes áreas, a produção de MAG e DAG vem recebendo grande atenção nas últimas duas décadas.

Atualmente, a produção de MAG e DAG em escala industrial é realizada pela reação de glicerólise a partir de glicerol e triglicerídeos (TAG) (óleos vegetais) empregando-se altas temperaturas (acima de 210

°C) e catalisadores químicos homogêneos (notadamente bases, como NaOH). Os rendimentos obtidos são relativamente baixos (aproximadamente 25 %, m/m) e os produtos são geralmente de baixa qualidade (Sonntag, 1982; Boyle, 1997). Em geral, o produto final torna-se de cor escura e de odor desagradável decorrente da formação de produtos indesejáveis devido às reações de polimerização. Para minimizar estes problemas, os fabricantes utilizam gorduras hidrogenadas, que geram produtos que contêm ácidos graxos na configuração *trans*. Sabe-se que o consumo de produtos industrializados que contêm ácidos graxos *trans* está associado com maior incidência de doenças cardíacas, problemas de obesidade, dentre outros malefícios (Fregolente *et al.*, 2007).

Por outro lado, embora ainda com custo elevado, os processos enzimáticos destacam-se pelos benefícios propiciados, pois empregam baixas temperaturas de operação (entre 40 e 70 °C). São empregadas como catalisadores lipases que irão catalisar maior quantidade dos produtos que se deseja (no caso, MAG e DAG) e o emprego de gorduras hidrogenadas não é necessário por não haver subprodutos de polimerização (Fregolente *et al.*, 2007).

A glicerólise consiste na reação de TAG com glicerol produzindo MAG e DAG, que por sua vez pode reagir com glicerol formando apenas MAG (Fregolente, 2006). TAG e MAG também reagem formando DAG. Assim, o conhecimento da cinética e das características destas reações possibilita direcionar o processo para a maximização de um determinado produto (MAG ou DAG).

Um dos fatores primordiais para viabilidade da reação de produção de MAG e DAG está 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 ou um surfactante (agente tensoativo). O surfactante, por sua característica molecular, tem a capacidade de dispersar substratos polares em apolares em microemulsões ou micelas reversas. Com as microemulsões de glicerol em óleo, obtém-se um meio reacional alternativo para a produção de MAG e DAG. Fiametti *et al.* (2008 e 2009) relataram que a utilização do agente tensoativo AOT (bis(2-etil-hexil) sulfossuccinato de sódio) promoveu a formação de microemulsões no sistema reacional. Os autores constataram ainda que o aumento da quantidade de surfactante

no meio reacional contribui para a formação das microemulsões, aumentando a área interfacial e dessa forma a reação é catalisada.

A utilização de solventes pressurizados e surfactante em uma mesma reação de glicerólise pode se mostrar interessante, uma vez que estes desempenham diferentes papéis. Sendo a lipase um catalisador que necessita da maior superfície de contato possível, o surfactante pode favorecer este contato através da formação de micelas reversas, e a baixa miscibilidade do glicerol no óleo pode ser reduzida com a utilização do solventes pressurizados, além de contribuir para o incremento da transferência de massa.

Além disso, com o avanço de novas tecnologias, surgem novas e eficientes formas de transferência de energia. Uma delas é o uso do ultrassom, onde os efeitos físicos como o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória devem ser considerados para a utilização em processos biotecnológicos. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (Martinez *et al.*, 2000).

Considerando o exposto acima, este trabalho propõe a avaliação de diferentes sistemas reacionais para a síntese enzimática de MAG e DAG, a partir do óleo de oliva e glicerol, propondo técnicas alternativas, como o emprego de ultrassom e o uso de fluidos pressurizados. A investigação da síntese utilizando fluido pressurizado, surfactante e com o auxílio de ultrassom pode indicar o melhor meio reacional em relação à conversão e à estabilidade da enzima. Cada um dos sistemas reacionais citados possui vantagens biotecnológicas próprias e, devido a estes aspectos, configurou-se a presente tese.

## **1.1. Objetivo geral do trabalho**

A partir do contexto acima, vislumbra-se como objetivo geral deste trabalho o estudo da produção de monoglicerídeos e diglicerídeos através da reação de glicerólise catalisada por uma lipase imobilizada, comercial, utilizando como substrato óleo de oliva, surfactantes aniônicos e de grau alimentício, n-butano como solvente pressurizado, além do emprego do ultrassom.

## 1.2. Objetivos específicos

O alcance do objetivo geral deste trabalho ocorreu através da execução dos seguintes objetivos específicos:

- i) Utilizar n-butano como solvente e surfactante na reação de produção enzimática de MAG e DAG, avaliando o efeito das variáveis de processo (temperatura, pressão, razão molar glicerol:óleo, concentração de enzima e surfactante) sobre a conversão da reação;
- ii) Obter a cinética de produção de MAG e DAG em meio pressurizado;
- iii) Estudar o efeito das variáveis do processo (temperatura, concentração de enzima, razão molar glicerol:óleo) em sistema de ultrassom sobre a reação de glicerólise;
- iv) Estudar a cinética enzimática de produção de MAG e DAG em ultrassom;
- v) Estudar a influência do ultrassom na estabilidade das enzimas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Este capítulo tem por finalidade reunir e discutir as informações disponíveis na literatura sobre a reação de glicerólise para obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis por via enzimática, com fluidos pressurizados, em sistema de ultrassom e presença de surfactante. Posteriormente, serão ressaltados os principais aspectos da glicerólise, assim como as características do catalisador enzimático, as vantagens da utilização do surfactante, do emprego de fluidos pressurizados e do ultrassom, além do relato de alguns trabalhos relacionados à glicerólise enzimática.

### **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 (TAG) ou triacilgliceróis, substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada a 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 TAG são os principais componentes de qualquer gordura animal ou vegetal. Dependendo da origem do óleo, o conteúdo em TAG e ácidos graxos pode variar significativamente (Moretto e Fett, 1998).

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorías, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K1. 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 1980 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 (Castro *et al.*, 2004).

Os óleos e gorduras naturais podem ser os únicos constituintes 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 (Clauss, 1996, Grampone, 1993, apud Castro *et al.*, 2004).

Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de TAG. A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada, 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, 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 (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”. (Kiritsakis e Markakis, 1987).

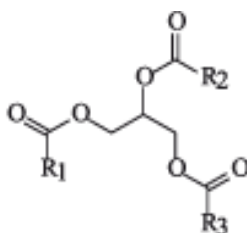
O azeite de oliva contém aproximadamente 90% de ácidos graxos insaturados, sendo o principal componente o monoinsaturado ácido oléico. Seu conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados é de nível baixo, aproximadamente 10%. Tanto a polpa como a semente contêm óleo e é interessante notar que o óleo da semente 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 são perdidos. 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 TAG, DAG, MAG 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 TAG 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 TAG 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 triglicerídeo

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), como pode ser observado na Tabela 2.1. Já os compostos não glicerídicos incluem os hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, ceras, ésteres etílicos e metílicos de ácidos graxos, esteróis, álcoois e diálcoois triterpênicos e outros constituintes e

contaminantes, tais como fenóis e metais (Ruiz-Gutierrez e Pérez-Camino, 2000).

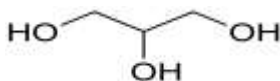
**Tabela 2.1** - Composição química do azeite de oliva

Ácidos Graxos	Quantidade (%)
Ác. palmítico (C16:0)	8,78 ± 0,04
Ác. palmitoléico (C16:1)	0,5 ± 0,01
Ác. esteárico (C18:0)	2,86 ± 0,05
Ác. oléico (C18:1)	75,07 ± 0,09
Ác. linoléico (C18:2)	11,72 ± 0,01
Ac. linolênico (C18:3)	0,38 ± 0,01
Ác. araquídico (C20:0)	0,32 ± 0,01
Ác. gadoléico (C20:1)	0,25 ± 0,01
Ác. behênico (C22:0)	0,12 ± 0,01

Fonte: Ndiaye (2004).

### 2.3. Glicerol

O glicerol (1,2,3-propanotriol) pode ser encontrado em todas as gorduras e óleos vegetais, 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% ou mais de glicerol na sua composição. A estrutura genérica de uma molécula de glicerol encontra-se apresentada na Figura 2.2.



**Figura 2.2** – Estrutura de uma molécula de glicerol.

Todo o glicerol produzido no mundo, até 1949, era proveniente da indústria de sabão. Atualmente, 70% da produção de glicerol nos Estados Unidos ainda provém dos glicerídeos (óleos e gorduras naturais) e o restante, da produção do glicerol sintético (subproduto da fabricação de propileno), da produção de ácidos graxos e também de ésteres de ácidos graxos (biodiesel) (Vallyiappan *et al.*, 2008).

No Brasil, a Lei 11.097/2005 introduziu o biodiesel na matriz energética, estabelecendo metas para a adição deste biocombustível ao diesel de petróleo (ANP, 2005). Resoluções posteriores determinaram a obrigatoriedade do uso de misturas com quantidade crescente de biodiesel ao diesel. Em janeiro de 2010, a mistura B5 (5 % de biodiesel e 95 % de diesel) passou a ser obrigatória, conforme estipulado pela Resolução CNPE 6/2009 (CNPE, 2009). Com a implementação da mistura B5, prevê-se que a produção anual brasileira atinja 2,5 bilhões de litros de biodiesel, paralelamente à geração de uma quantidade expressiva de glicerina, de cerca de 250 mil toneladas por ano (ANP, 2010).

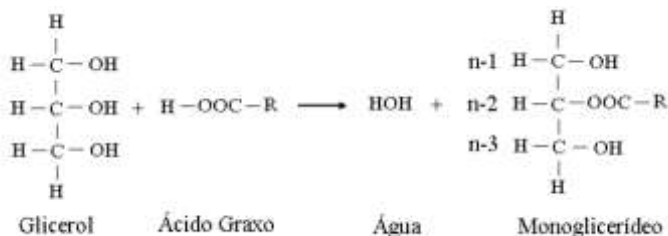
No momento, o mercado não é capaz de absorver a quantidade excedente de glicerina bruta para as aplicações industriais tradicionalmente existentes (Johnson e Taconi, 2007), que atualmente consomem, no Brasil, cerca de 30 mil toneladas por ano (Mota, Silva *et al.*, 2009). Desta forma, torna-se imperativa a busca por alternativas para o aproveitamento desta glicerina excedente.

No que diz respeito à conversão do glicerol através de processos catalíticos, cabe mencionar a possibilidade de sua utilização como substrato para a produção de mono- e diacilgliceróis, biomoléculas de alto valor agregado, amplamente utilizadas como emulsificantes em diversas indústrias, especialmente alimentícia (Noureddini e Medikonduru, 1997; Langone e Sant'anna, 2002; Monteiro *et al.*, 2003; Esmelindro *et al.*, 2008; Moquin e Temelli, 2008).

## **2.4. Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis**

Os monoglicerídeos ou monoacilgliceróis (MAG) e os diglicerídeos ou diacilgliceróis (DAG) são os produtos mais valiosos que se obtém em reações de glicerólise (Moquin *et al.*, 2006). Monoglicerídeos são moléculas constituídas por uma molécula de glicerol ligada a uma molécula de ácido graxo, como pode ser observado na Figura 2.3. DAG, 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 MAG ou misturas deste com DAG possuem importantes aplicações industriais, representando cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (Ferreira-Dias *et al.*, 2001; Damstrup *et al.*, 2005; Cheirsilp *et al.*, 2007).

O campo de aplicações de MAG é variado: emulsificantes, estabilizantes e moléculas condicionadoras, potencialmente benéficos à saúde na indústria alimentícia, como produtos de padaria, margarinas, produtos de leites e confeitaria devido às suas propriedades emulsificantes, estabilizantes e condicionantes, ésteres de ácidos graxos de polióis como constituintes de drogas na indústria farmacêutica, nova geração de surfactantes na indústria de detergentes (Boyle, 1997; Jackson e King, 1997; Nouredini *et al.*, 2004; Moquin *et al.*, 2005; Damstrup *et al.*, 2005). Todas essas aplicações são atribuídas principalmente aos MAG 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 MAG são também utilizados em processos têxteis e produção de plásticos.



**Figura 2.3** - Representação da reação de formação de monoglicerídeo.

Mono e diacilgliceróis constituem a maior parte dos emulsificantes alimentícios. São consumidos em um nível anual de 85 mil toneladas nos Estados Unidos, o que representa aproximadamente 70% dos emulsificantes totais utilizados em produtos alimentícios. As diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) requerem misturas de mono e diacilgliceróis (EEC, código 471) tenham pelo menos 70% de mono + diglicerídeo, e um mínimo de 30% monoacilglicerol, e que os conteúdos de ambos, glicerol (G) e triglicerídeo, estejam abaixo de 10%. Monoglicerídeos são emulsificantes com estado GRAS (Generally Recognized as Safe - Geralmente Reconhecido como Seguro) (Arcos e Otero, 1996).

Devido à importância mundial dos MAG e os seus derivados como aditivos ativos na superfície em uma gama extensiva de alimentos,

considerável atenção foi dada recentemente para melhorar sua síntese (Pawongrat *et al.*, 2007), principalmente pelo fato de alguns estudos relatarem que MAG inibem um aumento dos níveis de triacilglicerol e insulina no sangue após as refeições (Takeno *et al.*, 2009), além de monoésteres que contêm ácido oleico, especialmente quando este ácido graxo é atacado na posição sn2, possuem potentes efeitos antioxidante, antidiabético e antiaterogênico *in vitro* e em células (Cho *et al.*, 2010).

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

O interesse na produção industrial de diacilgliceróis é mais recente do que no caso dos monoacilgliceróis (Xu, 2004). Ao contrário dos triacilgliceróis, os diacilgliceróis, em especial os 1,3- diacilgliceróis (Matsuo e Tokimitsu, 2001), atuam no combate a altas taxas de colesterol e triacilgliceróis, na prevenção da obesidade (Eom *et al.*, 2010), e na prevenção e redução do acúmulo de gordura no corpo (Matsuo e Tokimitsu, 2001; Taguchi *et al.*, 2001; Yasukawa & Yasunaga, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Takei *et al.*, 2001; Maki *et al.*, 2002, Kasamatsu *et al.*, 2005, Meng *et al.*, 2004). Os diacilgliceróis são, portanto, benéficos para a redução das doenças relacionadas a estes fatores de risco, como doenças coronarianas, diabetes *mellitus*, hipertensão e alguns tipos de câncer (Matsuo e Tokimitsu, 2001).

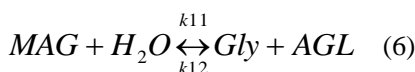
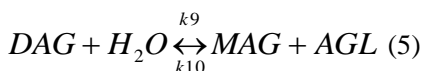
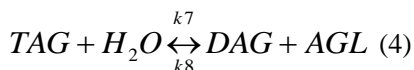
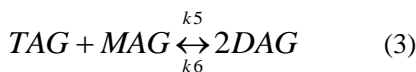
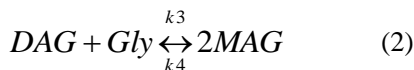
O sabor e as propriedades físico-químicas dos DAG são comparáveis àqueles óleos vegetais disponíveis tradicionalmente, uma vez que são estruturalmente muito similares (Fregolente *et al.*, 2009). Taguchi *et al.* (2001) mediram o valor energético de DAG e TAG através de uma bomba calorimétrica, onde obtiveram valores de 9,30 e 9,46 kcal/g, respectivamente, entretanto, não se observou diferença significativa na taxa de absorção pelo organismo, que para ambos (DAG e TAG) foi de 96,3%. Assim, justificam que a característica dos DAG 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 TAG e DAG. Pesquisas realizadas com ratos relatam que, ao contrário dos TAG, que em excesso no organismo são estocados em forma de gordura localizada, os DAG são facilmente

utilizados pelo organismo como fonte de energia (Maki *et al.*, 2002). Kasamatsu *et al.* (2005) afirmam que sucessivos aquecimentos e resfriamentos de DAG não apresentam efeitos genotóxicos, como ocorre tradicionalmente com óleos vegetais convencionais.

Os diacilgliceróis podem ser comercializados como óleo rico em diacilgliceróis, apresentando um benefício fisiológico específico (Lo *et al.*, 2008). No Japão, óleos para cozinha contendo no mínimo 80% (m/m) de diacilgliceróis são classificados desde 1999 como “Alimentos específicos para a saúde” (Matsuo, 2004; Blasi *et al.*, 2007; Morita *et al.*, 2008). É o caso do *Econa Healthy Cooking Oil*, comercializado pela ADM/Kao Group do Japão. Os diacilgliceróis encontram aplicação em emulsões óleo/água (O/A), como maioneses e molhos para saladas, em emulsões água/óleo (A/O), como margarina, *spreads*, recheios cremosos e produtos de confeitaria, em *shortenings*, em produtos fritos (batatas fritas, bolos fritos, *doughnuts*) e em coberturas para sorvetes (Lo *et al.*, 2008). Também foram desenvolvidos óleos ricos em diacilgliceróis com alto teor de ácidos graxos insaturados, acrescidos de fitoesteróis. Esta mistura, capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo e do triacilglicerol sérico, foi patenteada por Platt *et al.* (2006).

## 2.5. Glicerólise de óleos vegetais

Glicerólise é a produção de MAG e DAG a partir de moléculas de glicerol ligadas à moléculas de TAG. Esta reação pode ser representada pelas seis etapas da Figura 2.4, sendo que as etapas 4 a 6 somente ocorrerão se houver presença de água no meio reacional (hidrólise), o que nem sempre é desejável uma vez que neste caso, MAG e DAG formados podem ser transformados em ácidos graxos livres. Cabe salientar que as etapas de hidrólise podem ocorrer paralelamente a de glicerólise e que a partir de 4% de água no sistema, ácidos graxos livres já começam a ser formados (Moquin *et al.*, 2006).



**Figura 2.4** - Etapas da reação de glicerólise (1 – 3) e hidrólise (4 – 6). Onde: Gly = glicerol, AGL = ácidos graxos livres, e  $k_1$ - $k_{12}$  = constantes de reação.

Como mostrado na Figura 2.4, 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 mols de MAG (Fregolente, 2006). Se o interesse for a produção de DAG, manipula-se o excesso de TAG no meio reacional e, assim, um mol de TAG reage com um mol de MAG e forma dois novos mols de DAG.

Os processos comerciais para a produção de MAG utilizam glicerólise contínua de gorduras e óleos vegetais usando catálise inorgânica alcalina, tais como NaOH ou  $Ca(OH)_2$ , conduzida a altas temperaturas (210 – 280 °C), produzindo de 30 a 60% de mistura de MAG e DAG (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 (Bellot *et al.*, 2001; Damstrup *et al.*, 2005). Ao final deste processo é necessária a purificação por destilação molecular, não somente para remoção de impurezas, como também para concentrar os MAG a uma concentração maior que 90% (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 TAG. 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; Míčov *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).

## 2.6. Lipases como catalisadores

Recentemente, tem se destacado na literatura o interesse pelo desenvolvimento de processos enzimáticos que possam substituir as tradicionais rotas químicas para a produção de MAG e DAG. 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).

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 inúmeros os processos implementados em escala comercial (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 enantiosseletividade. 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 (Castro *et al.*, 2004).

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e catalisam a hidrólise total ou parcial das ligações éster de triacilgliceróis, liberando mono-, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Carvalho *et al.*, 2003). São comumente



encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Freitas *et al.*, 2008).

As áreas nas quais a aplicação das lipases vem tendo maior destaque são (Xu, 2000; Sharma *et al.*, 2001; Leal *et al.*, 2002; Baron, 2003; Bevilaqua, 2005):

- Farmacêutica: Síntese de intermediários de fármacos (ex. ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória); resolução de misturas racêmicas (ex. síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo).
- Alimentos: Síntese de aromas (ex. maturação de queijos); síntese de edulcorantes (ex. aspartame).
- Detergentes: Remoção de manchas de gorduras dos tecidos.
- Agroquímica: Síntese de inseticidas e pesticidas.
- Tratamento de efluentes: Redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios.
- Oleoquímica: Hidrólise e interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras.

A Tabela 2.2 apresenta um sumário de algumas das principais publicações em glicerólise, com o objetivo de propiciar uma visão geral dos estudos já realizados para a produção de emulsificantes a partir da reação de glicerol com óleos vegetais.

**Tabela 2.2** - Alguns dos principais estudos sobre glicerólise encontrados na literatura.

Referência	Óleo (relação G:O)	Condições	Catalisador	Solvente orgânico	Surfactante	Tempo de reação (h)	Rendimento
Tüter e Aksoy (2000)	Óleo de palma (1:2)	40 °C, 1300 rpm (agitação)	Lipase ( <i>Humicola lanuginosa</i> ) (500 U/g óleo)	-	-	24	18% MAG 38% DAG
Kaewthong e H-Kititikun (2004)	Oleína de Palma (8:1)	45 °C, 300 rpm, 10% de água	Lipase PS ( <i>Pseudomonas sp.</i> ) (50% em relação a oleína)	acetona+isooctano (3:1) (solvente:mistura, 9:1)	-	16	55,7% MAG 21,2% DAG
Yang <i>et al.</i> (2005a)	Óleo de girassol (4,5:1)	40 °C, 500 rpm, 2,6% de água	Novozym 435 (15% na mistura G:O)	-	-	8	10% MAG 32% DAG
Moquin <i>et al.</i> (2005)	Óleo de soja (25:1)	250 °C, 4% de água, 20,7 MPa	CO <sub>2</sub> supercrítico	-	-	4	0,13 mols MAG/100g
Damstrup <i>et al.</i> (2005)	Óleo de girassol (4:1)	50 °C	Novozym 435 (30% em relação ao óleo)	<i>tert</i> -pentanol (solvente:mistura, 4:1)	-	1	74% MAG 23% DAG
Moquin <i>et al.</i> (2006)	Óleo de canola (5:1)	250 °C, 8% de água (m/m), 10 MPa	CO <sub>2</sub> supercrítico	-	-	10	70% MAG 14% DAG
Esmelindro <i>et al.</i> , (2008)	Óleo de oliva (2:1)	30 °C, 30 bar, 600 rpm	Novozym 435 (10% na mistura G:O)	propano supercrítico (solvente:mistura, 4:1, m/m)	AOT (10% na mistura G:O)	1	60% MAG

**Continuação - Tabela 2.2 - Alguns dos principais estudos sobre glicerólise encontrados na literatura.**

Fiamenti <i>et al.</i> (2009)	Óleo de oliva (2:1)	70 °C	Novozym 435 (7,5% na mistura G:O)	-	AOT (16% na mistura G:O)	2	61,1% MAG
Valério <i>et al.</i> (2009a)	Óleo de oliva (2:1)	70 °C	Novozym 435 (7,5% na mistura G:O)	n-butano	AOT (7,5% na mistura G:O)	2	58,3% MAG 16,1% DAG
Valério <i>et al.</i> (2009b)	Óleo de oliva (6:1)	70 °C	Novozym 435 (9% na mistura G:O)	-	Triton-X 100 (15% na mistura G:O)	6	31,1% MAG 16,4% DAG
Kruger <i>et al.</i> (2009)	Óleo de oliva (6:1)	55 °C	Novozym 435 (15% na mistura G:O)	<i>tert</i> -butanol (solvente:mistura, 1:1)	-	12	60% MAG 15% DAG
Feltes <i>et al.</i> , (2012)	Óleo de peixe (1:1)	70 °C	Novozym 435 (5% na mistura G:O)	-	-	24	25% MAG 15% DAG

## 2.7. Glicerólise enzimática

A glicerólise de óleos e gorduras catalisada por lipases tem atraído interesse na academia e na indústria, acreditando-se que possa ser um método alternativo prático aos métodos químicos na produção de MAG e DAG comerciais. 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  $\alpha$ ) em relação à segunda (posição  $\beta$ ) (Bornscheuer, 1995; Fregolente, 2006).

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

O sistema de glicerólise com lipase imobilizada como catalisador é um sistema de três fases: uma fase hidrofóbica de óleo, uma fase hidrofílica 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 também é limitada. Devido a esta razão, a eficiência da reação é normalmente baixa, embora a eficiência possa ser melhorada por uma otimização em uma quantidade menor de glicerol no meio ou ainda a utilização de um solvente para melhorar a homogeneidade do meio (Yang *et al.*, 2005b).

Acredita-se que reações de glicerólise catalisadas por enzimas são uma alternativa potencial ao processo químico devida à baixa temperatura requerida (abaixo de 80 °C). Muitos trabalhos presentes na literatura, utilizando diferentes condições experimentais em diferentes sistemas, na presença ou não de solvente orgânico, catalisador enzimático, entre outras condições vêm relatando a obtenção de MAG através da glicerólise enzimática. Um exemplo desses estudos é o trabalho de Ghamgui *et al.* (2006), que estudaram a produção de MAG pela esterificação direta de ácido oléico com glicerol usando lipase imobilizada de *Staphylococcus simulans*. A reação foi conduzida na ausência de solvente. O máximo rendimento obtido nas condições

otimizadas no referido trabalho foi de 71,68% em termos de MAG, em 24 horas de reação a 37 °C. O sistema era constituído por uma razão molar ácido oléico/glicerol de 0,2 e adição inicial de água de 5%.

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

Em estudo realizado por Pawongrat *et al.* (2007), para a produção enzimática de MAG a partir de óleo de atum, em sistema utilizando solvente orgânico MTBE (terc-butil metil éster), os autores obtiveram 15% de MAG em 24 horas de reação sob as condições reacionais de 45 °C, 300 rpm, com adição de 4% de água ao glicerol. Feltes *et al.* (2010), utilizando óleo de peixe como substrato e o solvente orgânico tert-butanol, alcançaram 20,27% de DAG após 2 horas de reação em agitação de 600 rpm, 55 °C e utilizando 10% de enzima Novozym 435 em relação aos substratos.

O processo de glicerólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface óleo/glicerol e a adsorção da enzima nesta interface. Assim, quanto maior a interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando velocidades de reação mais elevadas (Balcão *et al.*, 1998). Diferentes parâmetros podem influenciar o desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a velocidade de reação de gorduras usando lipases como catalisadores. Alguns aspectos estudados são a relação entre a fase aquosa/fase oleosa, eventual ação inibitória dos produtos formados, efeito dos íons cálcio e sódio na velocidade de reação, influência do tipo de agente emulsificante na cinética do processo e efeito da agitação na velocidade de reação (Oliveira *et al.*, 1999).

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

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

MAG e DAG, desde novas 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. Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfifílicas, formadas por uma parte (denominada “cabeça”) polar (hidrofílica) e uma cadeia por vezes denominada cauda carbônica apolar (hidrofóbica), sendo que a cabeça pode ser carregada positiva ou negativamente (catiônica ou aniônica), pode ser dipolar (anfotéricas) ou não carregada. Por definição, surfactante significa um agente que atua na superfície. Isto mostra uma importante propriedade dos surfactantes: a formação de um filme molecular, ordenado na interface, que reduz a tensão interfacial e superficial (Rosen, 2004).

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

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

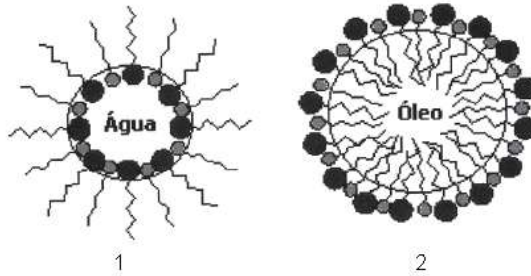
## 2.9. Microemulsões

Microemulsões são misturas altamente interdispersas de dois líquidos, de água em óleo, ou óleo em água. A extensa e convoluta fronteira entre os domínios de óleo e água é estabilizada por um terceiro componente, o surfactante. As moléculas de surfactantes adsorvem-se espontaneamente nas interfaces e separam as fases não-polar e aquosa, diminuindo assim a tensão superficial (Stamatis *et al.*, 1999).

O termo microemulsão foi introduzido por Schulmann, em 1943, e é definido como sendo uma dispersão transparente, fluida, opticamente isotrópica e termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, contendo quantidades apropriadas de surfactante e, algumas vezes, também um co-surfactante. São opticamente transparentes em decorrência do diminuto tamanho dos microdomínios de água e óleo que não espalham luz visível (Bagwe *et al.*, 2001).

Acima de uma determinada temperatura e concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), as moléculas de tensoativos iônicos se agregam formando micelas que, dependendo da natureza dos componentes, condições termodinâmicas (concentração, temperatura e pressão) e presença de um campo de força, podem assumir diferentes formas estruturais (Beltrame, 2006).

Do ponto de vista estrutural, as microemulsões podem ser vistas como agregados de surfactantes (micelas) de água disperso em óleo (A/O) ou micelas reversas, microemulsões de óleo disperso em água (O/A) ou micelas normais (Figura 2.5). Em uma micela, as moléculas de surfactante estão organizadas em monocamadas com seus grupos polares (cabeça) orientadas na direção da água e suas caudas na direção do óleo. Geralmente, os sistemas do tipo O/A são formados na presença de baixa concentração de fase oleosa; os do tipo A/O são formados quando a concentração de fase aquosa é baixa e os do tipo bicontínuo se formam quando as concentrações de fase aquosa e fase oleosa são similares e tanto o óleo quanto a água existem como uma fase contínua (Tenjarla, 1999; Lawrence e Rees, 2000; Jian, 2001).



**Figura 2.5** - Tipos de microemulsões: 1) micela reversa, 2) micela normal.

A estrutura da micela normal formada indica que o grupo hidrofílico (cabeça) está direcionado para o contato com a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia linear hidrofóbica (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central apolar (Carvalho e Cabral, 2000; Maniasso, 2001).

De importância considerável é o fato que micelas reversas são caracterizadas pelo diâmetro definido e massa molecular (número de agregação) e exibem uma estrutura relativamente ordenada. Os diâmetros das micelas reversas dependem fortemente da relação molar de água/surfactante (Stamatis *et al.*, 1999).

As microemulsões são consideradas interessantes nas áreas alimentícias e podem ser utilizadas em processos de separação e purificação. O interesse na aplicação das microemulsões se deve à capacidade desses sistemas de solubilizar substâncias hidrofílicas e lipofílicas ao mesmo tempo, e, também, de melhorar a solubilidade e estabilidade dos fármacos (Bagwe *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2004).

### 2.9.1. Aspectos aplicados a microemulsões contendo enzimas

Extensos estudos tem sido realizados com micelas reversas contendo enzimas e seu potencial em biocatálise e especialmente para a conversão de substratos hidrofóbicos (Martinek *et al.*, 1987; Holmberg, 1994, Stamatis *et al.*, 1999). Catálise enzimática em sistemas bifásicos que consistem em uma fase apolar (contendo o substrato hidrofóbico a ser convertido), e uma fase aquosa (contendo a enzima), é normalmente afetado pelas severas limitações de difusão entre água e a área interfacial orgânica em tais sistemas que é bem pequena. Em princípio, esta desvantagem pode ser eliminada dispersando a fase aquosa



mecanicamente no solvente orgânico adequado, que não conduza à desnaturação e desativação da enzima. Por outro lado, em sistemas que contêm uma porcentagem muito baixa de água, a enzima é geralmente muito estável, mas sua atividade é substancialmente baixa (Zaks e Klibanov, 1988).

Sistemas de microemulsão proveem uma grande área interfacial pela qual a conversão de substratos hidrofóbicos pode ser catalisada. Aumentar a área interfacial é de grande interesse tecnológico porque isto resulta no aumento do número de moléculas de substrato disponível para reagir. Sistemas de microemulsão oferecem várias vantagens como meio de reação para síntese de bio-orgânicos: primeiro, podem ser dissolvidos substratos hidrófilos e hidrofóbicos em concentrações altas (Martinek *et al.*, 1986; Martinek *et al.*, 1987); segundo, os substratos podem ser enzimaticamente convertidos com rendimentos altos porque o equilíbrio termodinâmico de reações de condensação e hidrólise podem ser alternadas facilmente ajustando o conteúdo de água. O uso de micelas reversas pode alterar as constantes de equilíbrio de várias reações enzimáticas prosperamente por um fator de  $10^6$ ; terceiro, o conteúdo de água pode ser variado dentro de uma gama bastante ampla e isto provê um método de manipular a atividade da enzima; quarto, reações multi-enzimáticas são possíveis em micelas reversas (Stamatis *et al.*, 1999).

Segundo Freitas *et al.* (2006), em geral, as lipases requerem uma ativação interfacial para sua total atividade catalítica. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ativação das lipases nas interfaces, como por exemplo, a mudança conformacional induzida interfacialmente gerando uma enzima mais ativa, uma maior concentração do substrato local e um menor grau de hidratação do substrato, tendo em vista que a hidratação das moléculas de lipídeos representa uma proteção às ligações ésteres.

## **2.10. Produção enzimática de MAG e DAG em fluidos pressurizados**

A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHugh e Krukonis, 1994).

O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações de catálise enzimática, investigados primeiramente por Randolph *et al.* (1985), Hammond *et al.* (1985) e Nakamura *et al.* (1985), é uma área de

pesquisa muito fértil que teve grande destaque na década de 80. A facilidade de alteração das propriedades físicas e de transporte do solvente pela mudança da pressão e/ou temperatura é peculiar na proximidade do seu ponto crítico (Rosa, 2006).

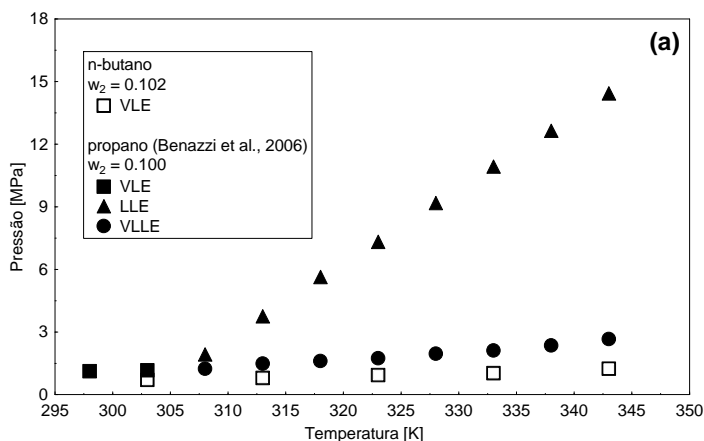
Segundo Dordick (1989) e Klibanov (1997), os fluidos supercríticos são meios atrativos para executar e para controlar reações de biocatálise. O que motivou a realização destes trabalhos foi o fato de que uma enzima em um solvente não aquoso pode possuir interações solvente/enzima similares àquelas de seu meio nativo, e, então, mostrar atividade maior quando comparada à da água pura. Os substratos podem também ser mais solúveis em um solvente não aquoso, fazendo com que as taxas de reação sejam maiores neste tipo de solvente (Rosa, 2006).

Desta forma, a substituição de um solvente orgânico, tal como o n-hexano, por um fluido pressurizado em reações enzimáticas, poderá resultar em maiores velocidades de transferência de massa devido às propriedades de transporte favoráveis. Além das vantagens já citadas, é possível um controle mais apurado das variáveis que conduzem a reação. Um benefício adicional do emprego de fluidos pressurizados na catálise enzimática é a presença de um meio adequado à recuperação dos produtos e reagentes (Oliveira e Oliveira, 2000, 2001).

Acerca das reações de biocatálise em fluidos pressurizados, alguns estudos prévios vêm a corroborar o desenvolvimento destas reações e, quando antecedem as reações, conduzem a uma visão das variáveis que envolvem tais reações e quais as faixas que merecem ser investigadas. há relatos na literatura de que outros gases pressurizados, como o propano, também podem ser adequados como meio reacional para catálise enzimática (Esmelindro *et al.*, 2008; Dalla Rosa *et al.*, 2008). Os fluidos pressurizados (gases em condições ambientes) possuem diversas vantagens sobre os solventes líquidos, dentre elas a alta difusividade, que pode acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas.

Em se tratando de glicerólise, o comportamento de fases a alta pressão de óleos vegetais em solventes pressurizados é um aspecto importante. Benazzi *et al.* (2006) investigaram o comportamento de fases a alta pressão do sistema óleo de oliva, glicerol e surfactante AOT em propano pressurizado. Os resultados obtidos mostraram que o tipo de equilíbrio observado depende do sistema e que para o sistema óleo de oliva – propano - AOT foi identificada uma ampla região em composição contendo uma única fase para uma determinada concentração de surfactante em relação ao solvente. Outro estudo relevante nesta área foi o estudo de Bender *et al.* (2008), que

investigaram o comportamento de fases a alta pressão do óleo de oliva, glicerol e surfactante AOT em n-butano pressurizado. A pressão crítica do butano é de 38 bar (Reid *et al.*, 1987). Os pesquisadores encontraram sistemas com menores pressões de transição, inferiores a 20 bar, consideravelmente menores que as pressões observadas pelo sistema com n-propano estudado por Benazzi *et al.* (2006), sugerindo que o n-butano é um meio mais desejável para a condução deste tipo de reação enzimática, pois podem ser utilizadas pressões baixas. Estes dados podem ser visualizados na Figura 2.6, onde o sistema de razão mássica glicerol/óleo de oliva no solvente (2, butano) de aproximadamente 0,102, representado pelo quadrado aberto na figura, demonstra que uma fase líquida é alcançada em pressões abaixo de 20 bar até a temperatura de 70 °C.



**Figura 2.6** - Efeito do solvente no equilíbrio de fases do sistema AOT/solvente(1) + glicerol/óleo de oliva(2) para fração mássica da razão glicerol/óleo de oliva no solvente de aproximadamente 0,100. Razão molar glicerol para óleo de oliva de 2:1 e 5% (m/m) de AOT em solvente (glicerol/óleo de oliva em base livre). (Reproduzido do trabalho de Bender *et al.*, 2008).

## 2.11. Catálise enzimática em ultrassom

As ondas sonoras são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como o ar, os metais, os isolantes, a água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo (Maia *et al.*, 2000).

A utilização do ultrassom tem se tornado cada vez mais comum em laboratórios químicos de pesquisa e de produção para limpeza de materiais, homogeneização de emulsões e suspensões e reações químicas entre outras. Quando esses materiais ou substâncias são submetidos ao banho de ultrassom, possíveis reações químicas podem ser iniciadas acarretando em transformações do sistema. Em reações enzimáticas, o ultrassom é uma boa ferramenta a ser utilizada, podendo perturbar ligações fracas e induzir a mudanças conformacionais na estrutura das proteínas (Babicz, 2009).

O ultrassom foi descoberto em 1880 por Curie enquanto estudava o efeito piezoelétrico e 14 anos depois Thornycroft e Barnaby observaram que, na propulsão de mísseis, uma fonte de vibração era gerada causando implosão de bolhas e cavidades na água, fenômeno que ficou conhecido como cavitação. Entretanto, somente em 1912, quando Langevin desenvolveu o SONAR (Sound Navigation And Ranging), um aparelho capaz de medir a profundidade do mar, que as ondas na frequência de ultrassom foram aplicadas comercialmente. Em 1927, os efeitos destas ondas foram observados em sistemas químicos e biológicos e em 1950 os primeiros aparelhos geradores de ultrassom foram comercializados (Martinez *et al.*, 2000).

A partir de então, diversas pesquisas começaram a ser desenvolvidas e o estudo da influência das ondas ultrassônicas sobre sistemas químicos passou a ser chamado de sonoquímica e a aplicação de sonicação passou a ser diversificada.

O banho e a sonda de ultrassom são, basicamente, os dois tipos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas. A fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas, este sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam estes sinais; o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional (Barbosa e Serra, 1992).

No banho, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, normalmente água. Neste caso, há muita dispersão de energia ultrassônica, e conseqüentemente, menor influência nos sistemas reacionais. Na sonda, o transdutor é acoplado na extremidade do equipamento e entra em contato direto com o sistema reacional, por isso geralmente é mais eficiente (Barbosa e Serra, 1992).

Segundo Mason (2007), o ultrassom pode ser classificado de acordo com o nível de frequência em:

- Alta frequência e baixa potência (2-10 MHz), utilizado em diagnóstico de imagem e análises químicas;
- Baixa frequência e alta potência (20-100 kHz), utilizado para a sonoquímica.

Nos últimos anos, têm sido relatados estudos com a utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência. Ultrassom é considerado uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável (Mason, 2007).

A aplicação das ondas sonoras de alta potência se dá nas áreas da Biologia (homogeneização, rompimento de células), engenharia (limpeza de metal, soldagem, refinamento de metal, perfuração), industrial (filtração, degaseificação, cristalização, dispersão de sólidos, emulsificação, etc), física (cavitação, fenômeno de ondas acústicas, velocidade do som), polímeros (polimerização, despolimerização, degradação da massa molecular), entre outros (Martinez *et al.*, 2000).

As ondas sonoras de baixa potência, com frequência maior que 20 kHz são usadas em campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos. Estas ondas ultrassônicas são empregadas em exames de feto, inspeções de solda, medidas de espessuras. Também são usadas por morcegos, pássaros noturnos e animais marinhos, para sua localização através do eco. Cabe destacar que a sensibilidade do ouvido humano encontra-se na faixa de 16 Hz a 16 kHz (Barbosa e Serra, 1992).

Nas reações químicas o ultrassom de alta potência é o mais usado, pois pode produzir cavitação e/ou formação de microfluxos em líquidos, aquecimento e ruptura de sólidos, além de conferir instabilidade nas interfaces líquido-vapor, líquido-líquido e líquido-sólido (Boldyrev, 1995).

A cavitação, fenômeno de formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido, é a principal responsável pelos efeitos sonoquímicos (Mizukoshi *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 1999). Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode liberando calor e pressão muito elevados em intervalos curtos de tempo e em locais específicos do líquido (Korn *et al.*, 2003).

Na cavitação, dois tipos de bolhas são formados: as estáveis e as transitórias. As primeiras oscilam no meio e seu volume cresce com a penetração de gás dissolvido no líquido, na fase de descompressão. Elas precisam de vários ciclos de expansão e compressão para atingir o volume crítico e podem tornar-se transitórias, que são as bolhas com tempo de vida curto, de poucos ciclos, que implodem na fase de compressão, sendo, então, responsáveis pela cavitação (Sinisterra, 1992). Existem muitos fatores que afetam a cavitação: presença de gás dissolvido, frequência de irradiação, temperatura, viscosidade, tensão superficial, pressão externa e presença de partículas em solução (Raso *et al.*, 1999).

Estudos em sistemas homogêneos indicam que existem duas regiões de reatividade. A primeira corresponde à fase gasosa dentro da bolha, denominada “ponto quente”, onde se inicia a implosão cuja eficiência depende da volatilidade do solvente. Já a segunda, trata-se de uma fina camada líquida em volta da bolha (Liu *et al.*, 2008).

Em sistemas heterogêneos, a destruição da bolha ocorre assimetricamente originando um jato de líquido em direção à superfície sólida, podendo causar erosão localizada. Mas existem também microfluxos de líquidos que acabam por favorecer o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, acelerando algumas reações químicas (Liu *et al.*, 2008).

Quando em sistemas com líquidos imiscíveis, este colapso das microbolhas pode promover uma eficiente agitação. Com o aumento na velocidade de formação de gotículas microscópicas, com aumento da superfície de contato e das forças coesivas podem ser formadas ainda microemulsões. Espécies reativas e a indução de mudanças conformacionais na estrutura de proteínas também podem ocorrer (Liu *et al.*, 2008).

Diversos estudos tem sido conduzidos em ultrassom para a produção de biodiesel. Santos *et al.* (2010) avaliaram a produção de éster metílico a partir de óleo de *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e metanol, utilizando ultrassom. Os autores relataram 98% de conversão após 90 minutos com frequência de 40 kHz e temperatura de 30 °C. Hanh *et al.* (2009) estudaram a produção de ésteres etílicos de ácidos

graxos. A condição ótima do processo de esterificação foi com razão molar de álcool e ácido oléico de 3:1, 5% de ácido sulfúrico a 60 °C de temperatura por 2 h de reação. Foram obtidas conversões de cerca de 80% utilizando n-propanol, cerca de 70% utilizando n-butanol e cerca de 60% utilizando 2-propanol como solvente.

Em um estudo de Chen *et al.*, de 2001 (apud Zhao *et al.*, 2005) a reação de hidrólise do 4,4-disubstituído-2-fenil-2-oxazolin-5-ina em uma solução alcalina sob sonicação mostrou que a reação pode ser concluída em 15 minutos, enquanto que sem ultrassom, para uma hidrólise similar, são necessárias 24 h de reação. Lerin *et al.* (2011) otimizaram a síntese de ascorbil palmitato utilizando a enzima Novozym 435 em 68,13% do produto com 70 °C, 150 rpm, razão molar ácido ascórbico e ácido palmítico de 1:9, 5% (m/m) de enzima em 17 h de reação sob sonicação.

A irradiação por ultrassom também pode ser um método alternativo para reduzir as limitações da transferência de massa substrato-enzima, assim como pode proporcionar mudanças conformacionais na estrutura de proteínas. O efeito físico do ultrassom em processos biotecnológicos consiste principalmente na alteração da temperatura e pressão do micro-ambiente em função do efeito cavitacional (Babicz, 2009).

O fator limitante mais comum para o uso de ultrassom nas reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente. Contudo, este não é de todo um fator negativo já que a inativação térmica de enzimas é de muita importância em alguns processos biotecnológicos, sendo a pasteurização ultrassônica um deles (Babicz, 2009). Shah e Gupta (2008) demonstraram que a irradiação com frequência de 40 kHz não alterou a estrutura secundária da lipase, mas promoveu uma perturbação em regiões com resíduos tirosina e triptofano e na estrutura terciária da enzima. Estas mudanças estruturais promoveram a ativação da lipase.

Nas reações em ultrassom também é importante considerar o solvente que será utilizado. A presença de muitas moléculas de água pode aumentar a inativação, pois ocorre aumento da energia cinética do meio, induzido pelas ondas ultrassônicas, ocasionando mudanças conformacionais. O uso de solventes orgânicos ou sistemas bifásicos funciona como um mecanismo de proteção porque as moléculas de água encontram-se em torno da enzima, desta forma não são facilmente movidas pelo ultrassom (Martinez *et al.*, 2000).

A adição de solvente ao meio reacional conduzido em ultrassom também influencia a transferência de massa. Sabendo-se que o ultrassom em baixas intensidades aumenta o movimento do meio, favorecendo o fluxo de reagentes para o sítio ativo da enzima, um solvente mais volátil aumenta o efeito cavitacional, podendo favorecer a reação. Entretanto, a intensidade e/ou o tempo de irradiação pode levar à inativação da enzima via colapso cavitacional.

Liu *et al.* (2008) estudaram o efeito do ultrassom na hidrólise de óleo de soja em sistema livre de solvente, utilizando lipase de *C. lipolytica*. Os autores relataram que, comparando com a reação conduzida em *shaker*, as taxas de reação aumentaram em 94% para a reação realizada em 1 hora, 64% na reação de 2 horas, 58% na reação de 3 horas, 41% na reação em 4 horas e de 34% na reação de 5 horas. A taxa de reação em 5 horas em banho ultrassônico foi 2,3 vezes maior que a obtida em 12 horas de reação em *shaker*.

Babicz *et al.* (2010) avaliaram a glicerólise enzimática em ultrassom utilizando diferentes lipases. Os autores relataram que, com frequência de 47 kHz e potência de 125 W, utilizando 1% de enzima, a produção de diacilgliceróis foi de 40% com Lipozyme TL IM, 41% com Lipozyme RM IM e de 32% utilizando Novozym 435. Os experimentos foram conduzidos em pressão atmosférica, temperatura de 55 °C e taxa de agitação de 700 rpm, por 1 hora e 30 minutos.

No entanto, até o presente momento não se conhece o verdadeiro potencial do ultrassom, devido à falta de conhecimento sobre os exatos efeitos moleculares do ultrassom em enzimas e células vivas. Nas aplicações em enzimas, o ultrassom tem mostrado um aumento na estabilidade e atividade catalítica da enzima, bem como a longevidade de biocatalisadores enzimáticos. No entanto, uma melhor compreensão do efeito do ultrassom nas propriedades das enzimas torna-se necessária para desenvolver biocatalisadores mais eficientes com aumento da atividade e estabilidade a longo prazo (Rokhina *et al.*, 2009).

## 2.12. Considerações sobre o estado da arte

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 ao pH. Por outro lado, o tempo da reação da glicerólise enzimática é muito superior em relação à reação convencional, o que pode inviabilizar sua aplicação industrial. Por isso, os esforços são



dirigidos para encontrar as concentrações iniciais dos substratos e variáveis de operação ideais para a minimização do tempo de reação, ao mesmo tempo em que a maximização dos produtos é almejada.

Neste sentido, direciona-se esforço visando facilitar a condução da reação, como a utilização de solvente pressurizado e surfactante como promotores de um meio mais homogêneo e com menor resistência à transferência de massa, uma vez que glicerol e óleo possuem miscibilidade mútua bastante limitada em condições normais. O uso de surfactante, por sua vez, é menos explorado na literatura, mas é muito útil para formação de micelas reversas, o que aumenta o contato superficial dos substratos com a enzima, como demonstrado por Fiametti *et al.* (2008 e 2009) e Valério *et al.* (2009a e 2009b).

Como solvente e surfactante desempenham diferentes contribuições na reação de glicerólise, surge a expectativa do estudo de um sistema misto de solvente mais surfactante para a produção de MAG e DAG. Nesta etapa, um planejamento experimental torna-se de fundamental importância para o entendimento do comportamento da reação e um estudo cinético para a verificação da influência das diferentes variáveis ao longo do tempo.

Com o avanço de novas tecnologias, surgem novas e eficientes formas de transferência de energia. Uma delas é o uso do ultrassom, onde os efeitos físicos como o aumento da temperatura, a transferência de massa, a cavitação estável e a transitória devem ser considerados para a utilização em processos biotecnológicos. A influência das ondas ultrassônicas na atividade e estabilidade de enzimas tem demonstrado ser específica para cada enzima e dependente dos parâmetros de sonicação (Martinez *et al.*, 2000).

Neste contexto, justifica-se a presente tese de doutorado, que versa sobre a produção de MAG e DAG a partir do óleo de oliva, utilizando o n-butano como fluido pressurizado, surfactantes, inclusive de grau alimentício, e lipases como catalisadores, além da utilização de sonicação para a produção de MAG e DAG, visto que na literatura há flagrante escassez de informações experimentais relacionadas aos sistemas sob investigação.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é apresentada a descrição dos materiais, aparatos experimentais e os procedimentos adotados durante o trabalho. Além disso, é apresentada a metodologia utilizada para a determinação qualitativa e quantitativa dos produtos gerados pela glicerólise enzimática e para o tratamento dos dados experimentais.

#### 3.1. Materiais

Como substratos para a reação de glicerólise foram utilizados azeite de oliva comercial da marca Arisco (extra virgem), teor de acidez de 0,52%, glicerol (Merck, 99,5% de pureza) e surfactantes: AOT (bis(2-etil-hexil) sulfossucinato de sódio) (Sigma-Aldrich, 99% de pureza), polioxietileno sorbitol trioleato (Tween 85, Fluka), polioxietileno glicol monoestearato de sorbitan (Tween 65, Fluka), Éter mono[p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenílico] de polietilenglicol (Triton X-100, Sigma-Aldrich, 98% de pureza, conteúdo de água menor que 2%). O solvente pressurizado foi o n-butano de procedência White Martins S. A. (99,5% de pureza).

O catalisador empregado neste trabalho foi a lipase comercial Novozym 435 (*Candida antarctica*) (Novozymes A/S), imobilizada em resina acrílica macroporosa (atua randomicamente nas 3 posições do triglicerídeo). O solvente n-hexano (Quimex, 99,5% de pureza) foi utilizado na etapa de remoção e lavagem das enzimas do meio reacional ao final da reação.

Nas análises cromatográficas da primeira etapa deste trabalho, foram utilizados acetona (Merck, grau HPLC, 99,8%), acetonitrila (Merck, grau HPLC, 99,9%) e padrões de mono, di e triglicerídeos dos ácidos graxos majoritários do óleo de oliva: monooleína, monolinolenina, monolinoleína, monoestearina, monopalmitina, dioleína, dilinolenina, dilinoleína, diestearina, dipalmitina, trioleína, trilinolenina, trilinoleína, triestearina e tripalmitina, todos de procedência Sigma-Aldrich.

Já na segunda etapa, foram utilizados n-heptano, piridina, derivatizante MSTFA (N-metil-N-trimetilsiltrifluoroacetamida), padrões externos: monooleína, dioleína, trioleína e ácido oléico (ácido graxo livre), todos de grau cromatográfico e de procedência da Sigma-Aldrich.

### **3.2. Técnicas analíticas**

#### **3.2.1. Análise de Monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos**

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

As análises das amostras dos experimentos realizados com n-butano foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), – Agilent 1100 series, com bomba quaternária e injetor automático, forno de coluna e detector de índice de refração, temperatura do forno da coluna de 35 °C e temperatura do detector de 40 °C, com coluna modelo C18 (Zorbax SB-C18), volume de injeção de 20µL e fluxo de 1mL/minuto e fase móvel em acetonitrila/acetona (50:50 v/v) (AOAC, 1996).

As amostras das reações foram diluídas em 30000 µg/mL em fase móvel (acetona:acetonitrila, 1:1 (v/v)) e então injetadas (20 µL) em duplicata no cromatógrafo líquido de alta eficiência nas condições cromatográficas descritas acima, possibilitando a determinação do percentual de mono, di e triglicerídeos nas amostras.

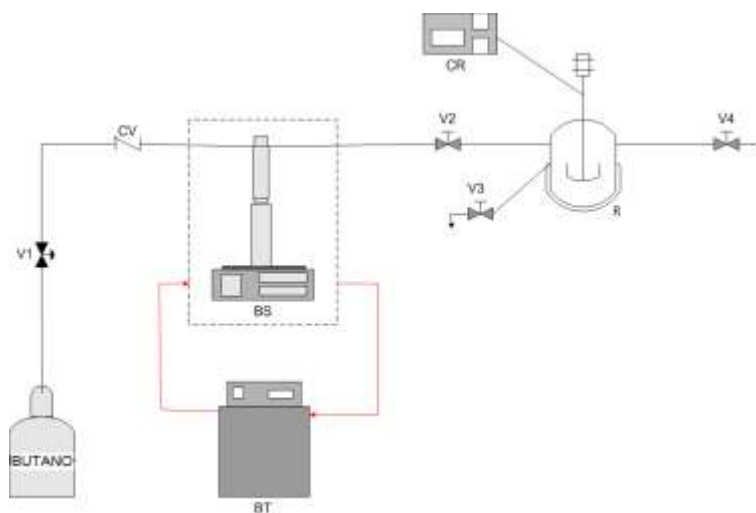
As análises das amostras recorrentes das reações de glicerólise enzimática em ultrassom foram realizadas em cromatógrafo gasoso (GC), – Shimadzu 2010, com injetor automático on-column e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se a coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm (J e W Scientific, nº de série: US7162944H). As condições de operação foram segundo a Norma nº 14105, do Comitê Europeu para Padronizações, sendo a programação de temperatura da coluna: 50 °C por 1 min, 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 (NR 14.105, 2001). A temperatura do detector era 380 °C, pressão do gás de arraste (hélio) de 80 kPa e o volume injetado foi de 1µL.

#### **3.3. Descrição dos aparatos e procedimentos experimentais utilizados nas reações de glicerólise enzimática**

Foram utilizados três aparatos experimentais no desenvolvimento da tese: o primeiro consistiu na realização das reações

a altas pressões; o segundo, equipamento de ultrassom com sonda, e o terceiro aparato experimental, consistiu na utilização de um banho ultrassônico para a reação de glicerólise enzimática, sendo o segundo e o terceiro aparatos em pressão ambiente.

A primeira unidade experimental, para as reações de glicerólise em n-butano pressurizado como solvente, consiste de um reator de aço inox de 50 mL com agitação mecânica e manta de aquecimento (reator Parr, modelo 4843), um cilindro de n-butano e uma bomba de alta pressão (ISCO, modelo 260D) conectada a um banho termostático para manter constante a temperatura de alimentação do n-butano, permitindo assim computar a massa de solvente adicionada ao reator. O aparato consiste ainda de um sistema de válvulas, indicadores de pressão e de temperatura. Na Figura 3.1 é apresentado um diagrama esquemático do aparato experimental, enquanto na Figura 3.2 são apresentadas vistas do reator, controlador e da bomba de alta pressão.



**Figura 3.1** – Diagrama esquemático do aparato experimental para produção de MAG e DAG em fluidos pressurizados: cilindro de n-butano, (CV) “check valve”, (BS) bomba de alta pressão, (BT) banho termostático, (V1) válvula de segurança, (V2) válvula de alimentação, (V3) válvula de amostragem, (V4) válvula de alívio, (CR) unidade controladora de pressão, temperatura e agitação, (R) reator.



**Figura 3.2** – Vistas da unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em fluido pressurizado.

O procedimento experimental adotado na etapa de produção de MAG e DAG utilizando fluido pressurizado como solvente consistiu nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C por 1 hora e o banho termostático (BT), conectado à bomba de alta pressão (BS), era acionado à temperatura de 5 °C para se operar com n-butano liquefeito. Após o banho atingir a temperatura determinada, com as válvulas V2, V3 e V4 fechadas, impedindo o retorno do gás para linha, a válvula de segurança (V1) e o cilindro de n-butano eram abertos e adicionava-se uma carga deste solvente à bomba (BS).

As quantidades de óleo de oliva, glicerol, surfactante AOT e enzima, determinadas previamente, eram medidas e adicionadas ao reator. Em seguida, o sistema era fechado e conectava-se o reator ao sistema de agitação e ao controlador de pressão e temperatura, ajustando a temperatura pré-determinada no planejamento. Fechava-se a válvula do cilindro de n-butano e a válvula de segurança (V1) e pressurizava-se a linha até a válvula V2; após atingir a pressão determinada pelo planejamento, anotava-se o volume de n-butano na bomba a fim de controlar o volume que era adicionado ao reator. Então, a válvula V2 era

aberta com uma vazão contínua (aproximadamente 20 mL/min) para alimentação do reator. Após atingir a pressão desejada, o volume de n-butano era computado. Em todos os casos houve um controle constante sobre a vazão da bomba (BS), a pressão e a temperatura do sistema.

Ao final do tempo de reação, a válvula V2 era fechada e o reator era despressurizado manualmente através da válvula de alívio V4. O sistema demorava em média 20 minutos para sua total despressurização, enquanto se despressurizava a bomba (BS), o sistema era aberto e o vaso do reator desconectado. A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada de forma não-destrutiva, ou seja, a amostra era retirada do reator a cada tempo pré-determinado e ao final da reação era retirada amostra do reator.

O segundo aparato experimental consiste em um reator encamisado de vidro de 40 mL, conectado a um banho termostático, o qual controla a temperatura do meio reacional. Neste reator foi inserida uma sonda ultrassônica (Vibra Cell, 500 W, Sonics) com o objetivo de promover a sonicação do meio reacional. Na Figura 3.3 é apresentado um esquema da segunda unidade experimental utilizada neste trabalho.

A obtenção das amostras do meio reacional foi realizada de forma não-destrutiva, ou seja, a amostra era retirada do reator com o auxílio de uma pipeta de Pasteur a cada tempo pré-determinado e ao final da reação era retirado todo meio reacional do reator.



**Figura 3.3** – Esquema da segunda unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom.

A terceira unidade experimental delineada e montada para a condução das reações consiste em um Erlenmeyer, e um banho ultrassônico, (UNIQUE), com frequência de 37 kHz e potência de 132 W, o qual também controla a temperatura do meio reacional e o tempo de sonicação. O aparato consiste ainda de um agitador mecânico (IKA, modelo RW 20), com controlador digital. Na Figura 3.4 é apresentada a unidade experimental. A obtenção das amostras do meio reacional também foi realizada de forma não-destrutiva, ou seja, a amostra era retirada do reator a cada tempo pré-determinado e ao final da reação era retirado todo meio reacional do reator.



**Figura 3.4** – Terceira unidade experimental para produção enzimática de MAG e DAG em ultrassom.

O procedimento experimental adotado na etapa de produção de MAG e DAG para os aparatos experimentais 2 e 3 consistiu nos seguintes passos: primeiramente a enzima era colocada em estufa a 40 °C por 1 hora para acondicionamento e ativação da enzima. Após, eram adicionados ao reator, o azeite de oliva e o glicerol (em quantidades nas quais o volume total era de 30 mL), o surfactante (quando utilizado) e a enzima. A relação mássica (azeite, glicerol e enzima) utilizada em cada



reação foi pré-determinada anteriormente. Para a medida das massas dos substratos e da enzima foi utilizado uma balança analítica com precisão de 0,0001 g. Em seguida, era acoplado a sonda ultrassônica ao reator (aparato 2, Figura 3.3) ou o agitador mecânico ao reator (aparato 3, Figura 3.4) 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 enzima da amostra. As amostras eram transferidas para frascos de amostragem e acondicionadas em estufa a vácuo (65 °C; 0,5 bar) por 18 h a fim de eliminar o excesso de n-hexano.

### **3.3.1 Preparação e análise das amostras**

Na preparação das amostras para a análise cromatográfica foram medidas 150 mg de cada amostra em balão volumétrico de 5 mL, após foram adicionados 150 µL do derivatizante MSTFA, seguido por vigorosa agitação da solução preparada e esta foi deixada em temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, o volume foi completado (5 mL) com n-heptano. Uma alíquota de 0,833 mL desta solução foi transferida para um outro 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.

## **3.4 Planejamento experimental**

### **3.4.1. Estudo da produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado**

Com base em estudos prévios (Esmelindro *et al*, 2008; Fiametti, 2008), foi realizado um planejamento experimental completo variando a temperatura de 30 a 70 °C, pressão de 10 bar a 160 bar, e concentração de AOT variando de 2,5 a 7,5% (m/m).

No segundo planejamento experimental executado, a pressão de trabalho foi diminuída, a fim de verificar a resposta do sistema nestas condições. Assim, variou-se a temperatura de 30 a 70 °C, pressão de 1 bar (sem solvente pressurizado) a 20 bar e concentração de AOT de 2,5 a 7,5% (m/m) (baseado na quantidade de solvente), mantendo-se fixa a

razão molar glicerol:óleo em 2:1, a agitação em 600 rpm e a concentração de enzima em 7,5% (m/m), com 2 horas de reação.

Em seguida, outro planejamento experimental completo foi realizado a fim de investigar uma possível compatibilidade técnica mantendo-se fixa a temperatura em 30 °C, variando a pressão de ambiente (aproximadamente 1 bar) até 20 bar e concentração de AOT de 0,1 a 2,5% (m/m). A razão molar de glicerol para óleo foi mantida em 2:1, concentração de enzima imobilizada Novozym 435, 7,5% (m/m), 600 rpm (de acordo com estudo de Fiametti, 2008), razão mássica de solvente para substratos de 4:1 e duas horas de reação. Os resultados foram analisados com o auxílio do software Statistica® 6.0 Statsoft Inc.

### **3.4.2. Estudo da cinética enzimática com fluido pressurizado e na presença de surfactante**

Depois da análise do planejamento experimental, as cinéticas foram determinadas para 6 horas de reação, as faixas de temperatura utilizadas nos testes cinéticos foram baseadas na temperatura considerada ótima da enzima (Novozym 435), 70 °C, e levando-se em consideração estudos disponíveis na literatura que sugerem outras temperaturas ótimas, entre 35 e 65 °C, para a reação de glicerólise utilizando lipases (Kaewthong e H-Kittikun, 2004; Yang *et al.*, 2005b; entre outros), a pressão em 10 bar e a concentração de AOT em 7,5% (m/m) e agitação mecânica em 600 rpm. As faixas da razão molar glicerol:óleo de oliva variaram de 2:1 a 10:1, a concentração de enzima de 5 a 10% (em relação à mistura glicerol e óleo).

### **3.5. Estudo da produção enzimática de MAG e DAG em sistemas de ultrassom**

Os resultados que são apresentados no Capítulo 4, referentes aos experimentos realizados em meio ultrassônico, foram analisados quantitativamente utilizando o Cromatógrafo Gasoso, segundo a NR 14.105 (2001).

No primeiro momento, foram realizados testes com os Aparatos Experimentais 2 e 3, a fim de comparação dos diferentes métodos de reação. Em seguida, foram realizados testes cinéticos utilizando o aparato experimental 3. As faixas de temperatura utilizadas nos testes cinéticos foram baseadas na temperatura ótima de atuação da enzima

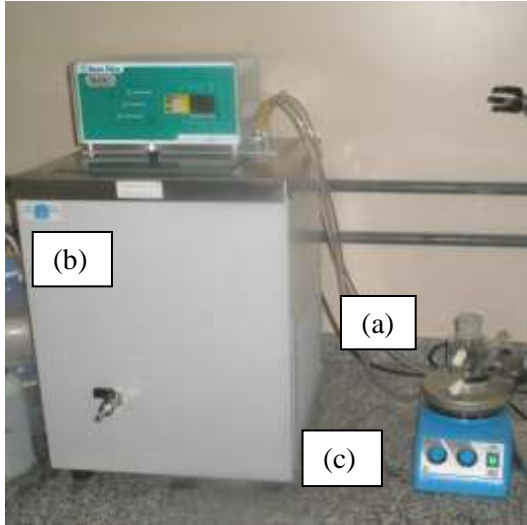
(Novozym 435) fornecida pelo fabricante (Novozymes A/S), que é de 70 °C. Estudos encontrados na literatura sugerem outras temperaturas ótimas para a reação de glicérolise utilizando lipases, entre 35 e 65 °C (Kaewthong e H-Kittikun, 2004; Kaewthong *et al.*, 2005; Tan e Yin, 2005; Yang *et al.*, 2005b).

Definidas as faixas de estudo das variáveis, realizou-se um conjunto de experimentos englobando grande parte das combinações possíveis, variando a temperatura em 50, 60 e 70 °C, concentração de enzima em 2,5, 7,5 e 10% (em relação à massa dos substratos) e a relação molar glicerol:óleo variando de 0,8:1, 1:1, 2:1 e 3:1.

Todos os experimentos foram realizados no tempo total de 6h. As amostras eram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos, sendo assim, se tratavam de experimentos cinéticos não-destrutivos.

### **3.6 Determinação da atividade enzimática de esterificação**

O procedimento adotado para determinação da atividade enzimática das lipases foi descrito por Lagnone e Sant'Anna (1999) e Bernardes *et al.* (2007), adaptado por Kruger (2010). 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 3.5). 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 mol/L. 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 3.5** – 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:

$$A_E = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_f}{t \times M_{IME} \times V_e} \quad (3.1)$$

Onde:

$A_E$  = atividade de esterificação ( $\mu\text{mol}$  de ácido/ min.  $g_{\text{enzima}}$  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 da enzima imobilizada utilizada na reação (g)

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

$t$  = tempo de reação (min)

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e o resultado apresentado é a 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.

### 3.7. Determinação das velocidades iniciais de reação

A velocidade inicial da reação enzimática foi calculado na fase inicial e linear da curva que representa a cinética da reação, de acordo com a Equação 3.2.

$$r = \frac{dC}{dt} \cong \frac{\Delta C}{\Delta t} \quad (3.2)$$

Onde:

r = velocidade inicial da reação (mol/g/min),

C = concentração de monoacilgliceróis ou diacilgliceróis (mol/g) e

t = tempo de reação (min).

Para o cálculo das concentrações molares de MAG e DAG 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 MAG e DAG. Para o cálculo das concentrações de TAG foi utilizada a massa molar média para o óleo de oliva que é de 876,86 g/mol.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo, são apresentados os planejamentos experimentais e os estudos cinéticos realizados para investigação da influência das variáveis da reação de glicerólise enzimática do óleo de oliva.

### **4.1 Produção enzimática de mono e diglicerídeos em n-butano pressurizado na presença de surfactante AOT**

#### **4.1.1 Efeito da pressão, temperatura e concentração de surfactante AOT no sistema**

Nesta etapa do trabalho, avaliou-se o efeito da pressão, temperatura e concentração do surfactante AOT no sistema. A Tabela 4.1 apresenta os resultados do planejamento experimental, onde pode ser observado que em 2 h de reação foram alcançadas altas concentrações de MAG, aproximadamente 70% (m/m), como pode ser observado nos experimentos 5 e 7. Somando-se com a concentração de DAG, chega-se em uma concentração de aproximadamente 80%, o que significa uma conversão quase completa de TAG que estava presente no início da reação.

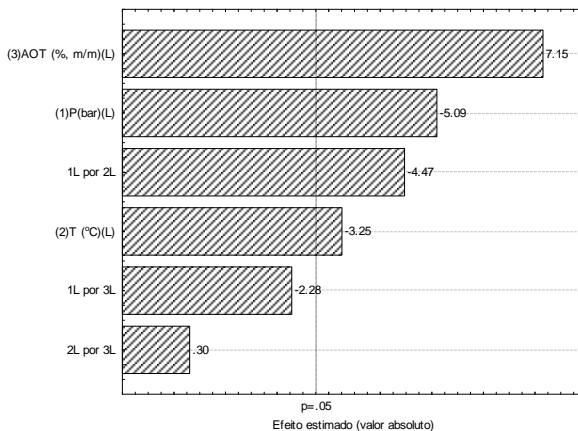
A Figura 4.1 apresenta o Gráfico de Pareto, onde pode ser observado que o teor de surfactante tem um efeito positivo muito pronunciado na produção de MAG, enquanto a pressão e a temperatura apresentam efeito negativo.

A partir do planejamento anterior, decidiu-se proceder uma investigação variando-se agora a pressão de 1 (sem solvente pressurizado) até 20 bar (com n-butano pressurizado), mantendo as faixas de temperatura e concentração de AOT, 30 a 70 °C e 2,5 a 7,5 % (m/m), respectivamente. Estas faixas foram adotadas porque um aumento na concentração de AOT poderia ser inadequado no aspecto econômico, mas mantendo-se a faixa de temperatura original poderia ser interessante devido à temperatura ótima de trabalho da enzima. A Tabela 4.2 apresenta a matriz do segundo planejamento experimental, com as respostas em termos de concentração de MAG, DAG e TAG.

**Tabela 4.1** - Matriz do planejamento experimental (valores reais e codificados) com resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG + DAG. Condições reacionais: razão molar glicerol óleo de oliva de 2:1, 7,5% (m/m) de Novozym 435, 600 rpm, razão mássica de solvente (n-butano) para substratos mantida constante em 4:1 e 2 horas de reação.

Exp.	Variáveis				Rendimentos					
	T (°C)	P (bar)	AOT (%)(m/m)	MAG (%)(m/m)	DAG (%)(m/m)	MAG+DAG (%)(m/m)	TAG (%)(m/m)			
1	30 (-1)	10 (-1)	2,5 (-1)	43,30	8,71	52,01	13,47			
2	30 (-1)	160 (1)	2,5 (-1)	50,58	9,15	59,73	16,95			
3	70 (1)	10 (-1)	2,5 (-1)	49,56	7,38	56,94	18,72			
4	70 (1)	160 (1)	2,5 (-1)	26,16	5,73	31,89	44,33			
5	30 (-1)	10 (-1)	7,5 (1)	70,68	9,62	80,30	8,52			
6	30 (-1)	160 (1)	7,5 (1)	60,03	7,69	67,72	5,09			
7	70 (1)	10 (-1)	7,5 (1)	71,94	9,35	81,29	6,33			
8	70 (1)	160 (1)	7,5 (1)	42,89	3,88	46,77	32,73			
9	50 (0)	80 (0)	5 (0)	55,98	6,80	62,78	15,90			
10	50 (0)	80 (0)	5 (0)	56,87	6,04	62,91	14,33			
11	50 (0)	80 (0)	5 (0)	55,43	7,45	62,88	15,67			





**Figura 4.1** - Gráfico de Pareto dos efeitos de temperatura, pressão e concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0,05$ ).

A Figura 4.2 mostra os efeitos das variáveis na resposta. Os resultados mostram que a temperatura não afetou significativamente a produção de MAG enquanto a concentração de AOT teve um efeito positivo significativo sobre a produção de MAG. É interessante notar também na Figura 4.2 o efeito negativo das interações entre pressão e temperatura, temperatura e concentração de AOT e finalmente pressão e concentração de AOT sobre a concentração de MAG.

**Tabela 4.2** - Matriz do segundo planejamento experimental, mostrando os valores reais e codificados, com resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG. Efeito da temperatura, pressão e concentração de AOT na glicerólise enzimática do óleo de oliva com (10 e 20 bar) e sem (1 bar, pressão ambiente) butano pressurizado. Condições reacionais: razão molar de glicerol:óleo, 2:1, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, razão mássica solvente:substratos constante em 4:1 (experimentos com n-butano) e 2 horas de reação.

Exp.	Variáveis				Rendimento			
	T (°C)	P (bar)	AOT (%, m/m)	MAG (%, m/m)	DAG (%, m/m)	MAG+DAG (%, m/m)	TAG (%, m/m)	
1	30 (-1)	1 (-1)	2,5 (-1)	30,6	9,3	39,9	35,5	
2	30 (-1)	20 (1)	2,5 (-1)	29,9	13,6	43,5	29,9	
3	70 (1)	1 (-1)	2,5 (-1)	37,6	13,8	51,4	31,2	
4	70 (1)	20 (1)	2,5 (-1)	37,6	7,8	45,4	17,6	
5	30 (-1)	1 (-1)	7,5 (1)	43,3	12,0	55,3	25,1	
6	30 (-1)	20 (1)	7,5 (1)	48,9	10,0	58,9	20,6	
7	70 (1)	1 (-1)	7,5 (1)	58,3	16,1	74,4	8,5	
8	70 (1)	20 (1)	7,5 (1)	20,5	7,2	27,7	48,1	
9	50 (0)	10 (0)	5 (0)	42,3	13,9	56,2	17,7	
10	50 (0)	10 (0)	5 (0)	40,1	10,3	50,4	16,6	
11	50 (0)	10 (0)	5 (0)	40,6	14,7	55,3	17,8	

Os resultados obtidos no primeiro planejamento experimental foram estatisticamente analisados, onde foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 4.3, e observa-se que a temperatura e interação enzima e agitação não foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.3** – Coeficientes de regressão para a produção de MAG – Primeiro planejamento experimental.

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	p
Média*	29,10	0,345	0,0001
(1)Temperatura	1,54	0,378	0,0547
(2)AOT*	10,97	0,378	0,0011
(3)Enzima*	9,64	0,378	0,0015
(4)Agitação*	-1,73	0,378	0,0445
Interação 1 x 2*	-2,74	0,378	0,0184
Interação 1 x 3*	3,13	0,378	0,0142
Interação 1 x 4	-1,06	0,378	0,1065
Interação 2 x 3*	2,50	0,378	0,0221
Interação 2 x 4	-0,01	0,378	0,9789
Interação 3 x 4	-2,03	0,378	0,0329

\*efeitos significativos a  $p < 0,05$ .

Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 4.4, resultando na validação de um modelo empírico codificado para produção de MAG como função da concentração de enzima, de AOT, agitação, interação entre temperatura e AOT, temperatura e concentração de enzima e por último concentração de enzima e AOT.

**Tabela 4.4** – Análise de variância para a produção de MAG no primeiro planejamento experimental.

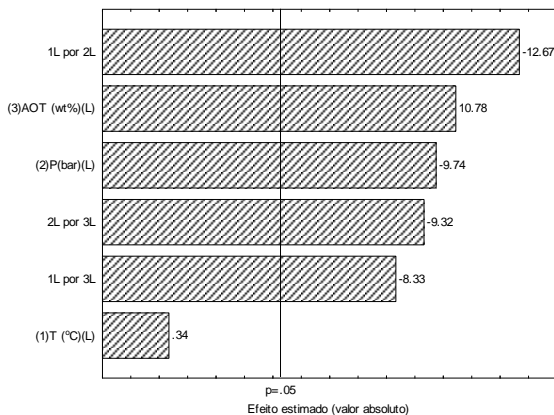
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Regressão	2097,145	3	699,0482	10,29025
Residual	475,532	7	67,93309	
Falta de ajuste	447,952	5		
Erro Puro	27,579	2		
Total	2572,676	10		

$$R = 0,93; F_{0,05; 7; 11} = 3,01$$

O coeficiente de correlação R obtido foi de 0,93 e o F calculado foi aproximadamente 3 vezes maior que o valor tabelado, sendo que estes validaram estatisticamente o modelo ( $p < 0,05$ ), representado pela Equação 4.1, para a conversão de MAG na faixa investigada, e permitiram a construção das superfícies de resposta apresentadas na Figura 4.5.

$$\begin{aligned} \text{Conversão MAG (\%)} = & 29,10 + 10,97 \cdot \text{AOT} + 9,64 \cdot \text{E} \\ & - 1,73 \cdot \text{Agit} - 2,74 \cdot \text{T} \cdot \text{AOT} + 2,50 \cdot \text{T} \cdot \text{E} - 2,03 \cdot \text{AOT} \cdot \text{E} \end{aligned} \quad (4.1)$$

Mesmo que a concentração máxima de MAG + DAG encontrada neste planejamento, de aproximadamente 74% (m/m) no experimento 7, não seja maior que a concentração de MAG + DAG obtida no planejamento anterior (experimento 7, 81% (m/m)), estes valores podem ser considerados relevantes se comparados com os rendimentos obtidos através dos processos convencionais de catálise química, como demonstrado no Capítulo 2.



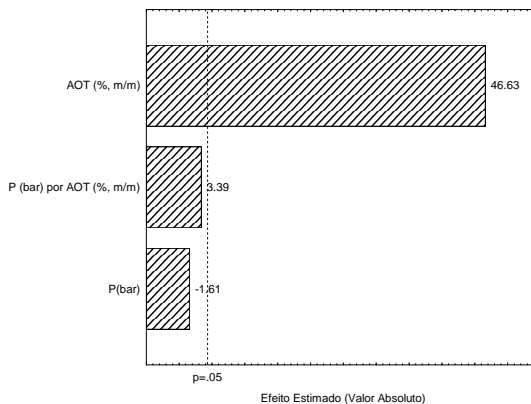
**Figura 4.2** – Gráfico de Pareto dos efeitos de Temperatura, Pressão e Concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0.05$ ) baseado nos dados experimentais do segundo planejamento experimental.

Ainda com o intuito de guiar a investigação, outro planejamento experimental foi delineado, fixando a temperatura no menor nível, 30 °C, e diminuindo a concentração de AOT (0,1 a 2,5 % (m/m)) e mantendo a faixa de pressão do último planejamento experimental (1 a 20 bar). Para este caso, como mostrado na Tabela 4.5, a concentração máxima de MAG obtida foi aproximadamente 46% (m/m), enquanto que em termos de MAG + DAG, foi de aproximadamente 65% (m/m), teor menor, mas não negligenciável quando comparado ao teor encontrado no primeiro planejamento, de aproximadamente 81% (m/m).

Como poderia ser esperado para este caso, como foi visto nos estudos de Fiametti (2008) e Valério (2009), a concentração de AOT teve um efeito positivo na produção de MAG (Figura 4.3). Pode ser notado a partir da Tabela 4.5 que, com exceção do experimento 2, em todos os casos, o emprego de n-butano foi benéfico para a produção de MAG, apontando sua importância na minimização das possíveis restrições à transferência de massa.

**Tabela 4.5** - Matriz do terceiro planejamento experimental, com os valores reais e codificados, e resposta em termos de concentração de MAG, DAG, TAG e MAG+DAG. Efeito da pressão e concentração de AOT na glicerólise enzimática do óleo de oliva com (10 e 20 bar) e sem butano pressurizado (1 bar, pressão ambiente). Condições reacionais: 30 °C, razão molar de glicerol:óleo, 2:1, 7,5% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 600 rpm, razão mássica solvente:substratos constante em 4:1 (para os experimentos utilizando n-butano) e 2 horas de reação.

Exp.	P (bar)	AOT (%, m/m)	MAG (%, m/m)	DAG (%, m/m)	MAG+DAG (%, m/m)	TAG (%, m/m)
1	1 (-1)	0,1 (-1)	3,3	4,9	8,2	58,9
2	20 (1)	0,1 (-1)	0,0	4,5	4,5	54,8
3	1 (-1)	2,5 (1)	31,7	10,2	41,9	32,5
4	20 (1)	2,5 (1)	32,8	18,0	50,8	32,2
5	10 (0)	1,3 (0)	45,3	20,1	65,4	18,3
6	10 (0)	1,3 (0)	46,3	18,1	64,4	20,3
7	10 (0)	1,3 (0)	45,0	18,0	63,0	19,9



**Figura 4.3** - Gráfico de Pareto dos efeitos de pressão e concentração de AOT na produção enzimática de MAG ( $p < 0,05$ ) baseado nos dados experimentais do terceiro planejamento experimental.

Nas faixas de temperatura e pressão investigadas neste trabalho, o n-butano se comporta como um líquido comprimido, mas ainda exibe pequenas variações de densidade. Assim, como notado para o propano, sistemas homogêneos foram observados para os sistemas formados por glicerol + óleo de oliva + n-butano + AOT para todas as condições aqui investigadas (Bender *et al.*, 2008).

Levando em consideração os estudos presentes na literatura e os resultados encontrados no presente estudo, pode ser concluído que a glicerólise é de fato um sistema complexo de reação, envolvendo, neste caso, glicerol, óleo de oliva, n-butano como solvente e surfactante AOT. Acredita-se que o surfactante promove a ocorrência da reação na interface glicerol/óleo e como consequência, a conversão da reação pode ser melhorada. Neste caso, parece ser plausível que as microemulsões contribuam para a formação das micelas reversas, com consequente aumento da área interfacial para a reação ser melhor catalisada, o que poderia demonstrar o papel essencial do surfactante para promover maiores conversões de MAG e DAG.

#### 4.1.2 Estudo cinético da glicerólise enzimática em n-butano pressurizado na presença de surfactante AOT

Um estudo cinético da glicerólise enzimática foi ainda realizado em n-butano e na presença de AOT, e nesta seção serão apresentados os

resultados referentes às cinéticas, avaliando-se os efeitos da razão molar glicerol:óleo e concentração de enzima no sistema, pois a condição que apresentou a maior concentração de MAG, apresentada na Tabela 4.1, com 70 °C, 10 bar e concentração de AOT em 7,5% (m/m) foi definida para avaliar a cinética da reação em até 6 h de experimento. As cinéticas foram destrutivas, ou seja, para cada ponto experimental da curva, foi realizado um experimento. Nas figuras desta seção os pontos experimentais foram unidos por uma linha contínua apenas como forma de melhor visualização do comportamento da reação.

A Tabela 4.6 apresenta as velocidades iniciais de formação de DAG e MAG e de consumo de TAG de cada cinética, as quais foram calculadas para os primeiros 60 min de reação, que corresponderam à faixa linear da curva. No decorrer do item 4.1 estão discutidos os resultados obtidos para as velocidades iniciais de formação dos produtos.

**Tabela 4.6** - Velocidades iniciais das cinéticas estudadas em relação à formação de monoglicerídeos e diglicerídeos e ao consumo de triglicerídeos. Valores para uma base de cálculo de 100 g de substratos.

Ensaio	Enzima (% , m/m)	Razão molar G:O	$r_0$ (mmol/min)
1	5	2:1	0,16
2	7,5	2:1	0,67
3	10	2:1	0,72
4	7,5	6:1	0,27
5	7,5	10:1	0,16

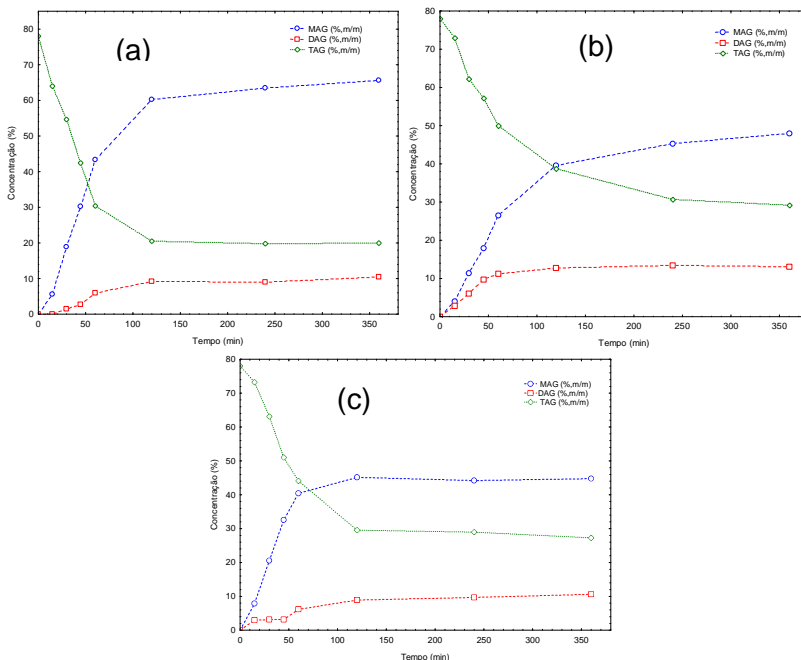
#### 4.1.2.1 Efeito da concentração de enzima na cinética de produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado na presença do surfactante AOT

O efeito da concentração de enzima no sistema foi avaliado mantendo-se fixas as condições do sistema em 7,5% (m/m) de AOT, agitação em 600 rpm, 70 °C e razão molar glicerol:óleo de 2:1, razão mássica de n-butano para substratos de 4:1, possibilitando a obtenção das curvas cinéticas apresentadas na Figura 4.4.

Pode ser observado a partir das Figuras 4.4 – (a), (b) e (c) que a concentração dos produtos alcançou o máximo em aproximadamente 2 h de reação, em todos os casos. A concentração máxima de MAG foi alcançada em 6 horas de reação (65%) para o sistema com 7,5% de



enzima. A diminuição na concentração de MAG e DAG quando grandes quantidades de enzima são utilizadas pode ser explicada pelas limitações de transferência de massa quando uma grande quantidade de enzima está presente no meio.



**Figura 4.4** - Efeito da adição de enzima sobre a concentração de MAG e DAG à temperatura de 70 °C, 10 bar, agitação em 600 rpm, razão molar glicerol:óleo de 2:1, razão mássica solvente para substratos de 4:1 e 7,5% (m/m) de AOT em relação à massa dos substratos. (a) 5% (m/m), (b) 7,5% (m/m) e (c) 10% (m/m) de enzima imobilizada.

Através das respostas obtidas para as velocidades iniciais da reação da produção de MAG em função da variação das concentrações de enzima imobilizada, foi possível verificar que a menor concentração de enzima no meio reacional (5% (m/m)), apresentou a menor velocidade inicial de reação 0,16 mmol/min, e nesta condição experimental, ao final da reação, a concentração de MAG é a menor dentre as três condições cinéticas em estudo. Para o conteúdo enzimático de 7,5% (m/m), a taxa inicial foi de 0,67 mmol/min, e com 10% (m/m) de enzima imobilizada no meio reacional, a taxa inicial

calculada foi de 0,72 mmol/min, maior dentre as três condições, porém, com conteúdo de MAG de aproximadamente 45% (m/m) ao final do experimento, menor que na condição anterior (aproximadamente 65%, m/m). Assim, como nos resultados encontrados neste trabalho, Fiametti *et al.* (2008), ao estudarem o sistema reacional para produção de MAG através da glicerólise do óleo de oliva utilizando lipase Novozym 435, como catalisador e AOT como surfactante observaram que na variação do conteúdo enzimático na faixa de 1 a 10% (m/m), quando a concentração de enzima imobilizada no meio reacional foi de 10% (m/m), maiores velocidades iniciais de reação foram observadas.

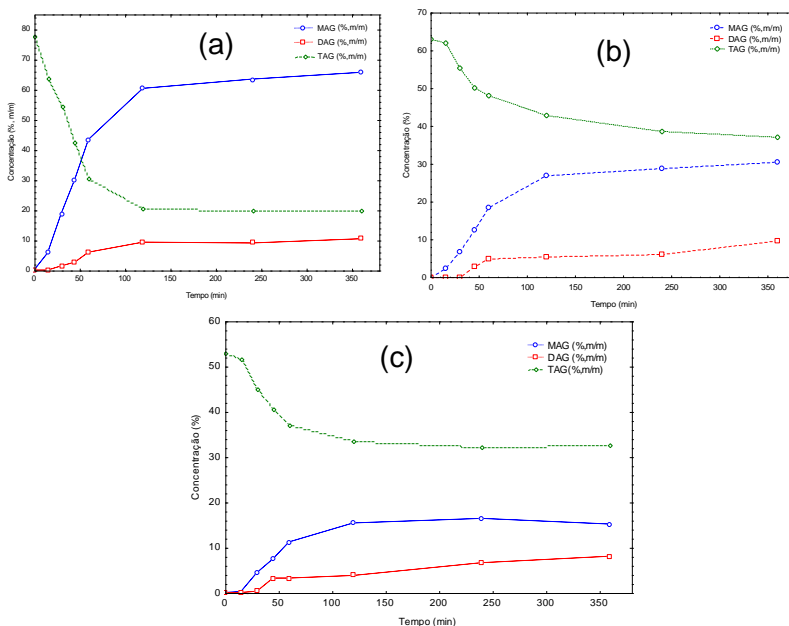
Reações enzimáticas em micelas reversas foram discutidas por Stamatis *et al.* (1999), apontando que a catálise enzimática em sistemas de duas fases consistindo de uma fase apolar e uma fase aquosa (contendo a enzima) é geralmente afetada por limitações difusionais na área interfacial. Entretanto, o excesso de enzima não aumenta a conversão, assim como pode-se observar na Figura 4.4 – (c), a adição de 10% (m/m) de enzima ao meio reacional diminuiu a concentração dos produtos ao longo da reação, quando comparada com a curva de 7,5% de enzima, indicando que dentre as 3 testadas, a concentração de enzima de 7,5% é a melhor concentração de enzima considerando-se o rendimento, assim como Fiametti (2008) observou em seu estudo.

#### **4.1.2.2 Efeito da razão molar de glicerol para óleo de oliva na cinética de produção enzimática de MAG e DAG em n-butano pressurizado na presença do surfactante AOT**

O efeito da razão molar glicerol:óleo de oliva também foi estudado. A Figura 4.5 – (a), (b) e (c) apresenta as curvas cinéticas referentes às diferentes razões molares analisadas. Pode ser notado que um aumento na razão molar glicerol para óleo de oliva diminui progressivamente a concentração em termos de MAG e DAG. Provavelmente, esta diminuição na concentração dos produtos seja devida à visível aderência do glicerol ao suporte da enzima, impedindo a formação dos produtos, pois ao final da reação verificou-se uma grande dificuldade para a remoção da enzima imobilizada do meio reacional.

Yang *et al.* (2005a) analisaram o efeito da razão molar glicerol:óleo (4,5:1, 7:1, 9:1, 11:1, 13:1 e 46:1) na glicerólise do óleo de girassol a 70 °C, 8% (m/m) de enzima imobilizada Novozym 435, 500 rpm e 5 horas de reação, em um sistema livre de solvente, sem o uso de surfactantes e fluido pressurizado. Os autores obtiveram uma

concentração máxima de MAG de 17% com razão molar glicerol:óleo em 9:1. Assim, isto significa que o efeito dos substratos pode seguir dois caminhos: um aumento na quantidade de glicerol além da estequiometria da reação pode favorecer a produção de MAG através do deslocamento da reação para a formação de produtos; por outro lado, uma elevação na quantidade de glicerol certamente afetará a polaridade do sistema a assim influenciará sua estabilidade e homogeneidade.



**Figura 4.5** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, 10 bar, concentração de enzima de 7,5% (m/m), razão mássica de n-butano para substratos de 4:1, agitação de 600 rpm e concentração de AOT de 7,5% (em relação à massa dos substratos). (a) 2:1, (b) 6:1 e (c) razão molar glicerol:óleo de 10:1.

É interessante observar que o rendimento de DAG é maior quanto menor é a razão glicerol:óleo. Ao final de 360 min de reação, para a cinética com razão molar 2:1, a concentração é de 10,5% em DAG, para a relação de 6:1, obteve-se 9,5% de DAG e para a relação 10:1, 8% de concentração em DAG, indicando que a restrição/supressão

do glicerol na reação estimula a produção de DAG, conforme proposto por Moquin *et al.* (2005), Moquin *et al.* (2006) e Cheirsilp *et al.* (2007).

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

As velocidades iniciais de reação foram 0,67, 0,27 e 0,16 mmol/min para razão molar glicerol:óleo de 2:1, 6:1 e 10:1, respectivamente. Através dos resultados obtidos, pode ser observado que o aumento da quantidade de glicerol no meio reacional desfavorece a formação dos produtos, como pode ser claramente observado na Figura 4.5. A cinética utilizando a relação de 10:1 de glicerol:óleo teve uma velocidade inicial menor, provavelmente pela baixa transferência de massa inicial causada pela grande quantidade de glicerol no meio reacional. Por outro lado, para a cinética na razão molar glicerol:óleo 2:1, a concentração de DAG foi a mais elevada, chegando a 10 % (m/m).

Baseado nos trabalhos disponíveis na literatura, nos resultados deste grupo de pesquisa (Fiametti, 2008; Valério, 2009) e nos resultados encontrados neste estudo, pode-se considerar que a glicerólise é um sistema de reação complexo, envolvendo, neste caso, glicerol, óleo de oliva, n-butano como solvente pressurizado e surfactante AOT. Acredita-se que o surfactante promova a reação na interface glicerol/óleo e por consequência a conversão da reação seja melhorada (Stamatis *et al.*, 1999). Neste caso as microemulsões podem estar contribuindo para a formação das micelas reversas, com um consequente aumento na área interfacial para a transformação dos substratos, o que poderia demonstrar que o uso de um surfactante pode promover maiores conversões de MAG e DAG.

Decorrente dos resultados apresentados nesta seção, dois artigos completos foram publicados em periódicos, conforme apresentado ao final deste trabalho, no Apêndice B.

## 4.2 Estudo da produção de MAG e DAG em sistema de ultrassom

Nos últimos anos, a tecnologia ultrassônica começou a ser utilizada mais largamente no campo da biotecnologia. Os cientistas têm combinado a tecnologia ultrassônica e biotecnologia, usando a energia física do ultrassom sobre as células para criar mudanças conformacionais na estrutura das enzimas, alterando assim a atividade da enzima (Chisti, 2003).

Os resultados do estudo da produção de MAG e DAG em diferentes meios ultrassônicos, obtidos na presente tese, encontram-se publicados no periódico *Ultrasonics Sonochemistry*, conforme apresentado no Apêndice B desta tese.

As reações de glicerólise foram realizadas sem agitação, com uma sonda ultrassônica (tecnicamente, um transdutor ultrassônico, também denominado de sonotrodo), variando a intensidade da irradiação de 25 a 40% da potência total do equipamento, em temperatura constante de 65 °C e razão molar de glicerol para óleo de 2:1. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7, onde pode ser notado que os conteúdos de MAG e DAG, a partir do teste em branco, realizado sem enzima e sem surfactante no meio reacional, pode ser considerado desprezível, demonstrando que a reação de glicerólise na condição estudada não pode ser considerada como auto catalítica, mesmo sob influência da irradiação fornecida ao meio.

Entretanto, quando a lipase Novozym 435 é adicionada ao meio reacional, na concentração de 7,5% (em reação à massa dos substratos), rendimentos da ordem de 30% em termos de MAG e DAG foram obtidos em 20 min de reação, mostrando o relevante papel da enzima na reação. A verificação dos resultados indica, no entanto, que existe uma perda maior de atividade quando a potência de irradiação é elevada, provocando a desnaturação da lípase, possivelmente devido ao contato direto entre as partículas de enzima e a sonda ultrassônica, o qual interfere, de certo modo, com o rendimento da reação.

**Tabela 4.7** - Resultados de glicerólise do óleo de oliva sob irradiação ultrassônica, utilizando o Aparato 1, sem agitação e temperatura constante de 65 °C e razão molar glicerol para óleo de 2:1.

Condição	MAG	DAG	TAG	AGL	AE
	(%) (m/m)	(%) (m/m)	(%) (m/m)	(%) (m/m)	(U/g) <sup>a</sup>
<b>Reação em branco (sem enzima e sem surfactante)</b>					
25% potência, 10min	4,18	1,58	74,66	0,21	-
25% potência, 20min	4,19	2,47	73,57	0,35	-
30% potência, 10min	6,55	4,76	69,33	0,44	-
40% potência, 20min	6,93	4,8	68,85	0,23	-
<b>7,5 % (m/m) enzima, sem surfactante e 20 min de reação</b>					
25% potência	19,64	9,11	51,83	0,63	52,7
30% potência	16,50	7,03	56,88	0,33	45,4
35% potência	21,33	10,74	48,47	0,28	43,1
40% potência	17,56	6,75	56,81	0,38	39,5
<b>7,5 % (m/m) enzima, 16 % (m/m) surfactante, 30% potência de irradiação</b>					
Triton X-100, 5 min	10,92	4,08	65,72	0,09	47,7
Triton X-100, 15 min	10,75	1,96	67,88	0,05	46,0
Triton X-100, 25 min	11,41	4,29	67,76	0,62	44,0
AOT, 5 min	8,24	4,44	66,76	0,17	39,8
AOT, 15 min	3,32	6,94	71,97	0,12	37,0
AOT, 25 min	4,67	10,58	67,81	0,28	36,2
Tween 65, 5 min	7,07	2,90	69,76	0,26	38,5
Tween 65, 15 min	5,42	2,61	73,67	0,13	40,2
Tween 65, 25 min	9,01	4,21	68,05	0,37	39,9
Tween 85, 5 min	2,85	1,12	76,99	0,26	38,8
Tween 85, 15 min	7,69	3,37	69,22	0,69	41,2
Tween 85, 25 min	9,91	3,54	68,54	0,42	39,5

a: AE (Atividade Enzimática, U/g)

Na tentativa de melhorar a eficiência da reação, um surfactante foi adicionado ao meio reacional (em concentração constante de 16% com relação à massa dos substratos), mantendo fixa a concentração de

enzima em 7,5% (m/m) e irradiação em 30% (150 W) da potência total, variando o tempo de reação. Os resultados para os quatro surfactantes testados, Triton X-100, AOT, Tween 65 e Tween 85, apresentaram rendimentos de MAG + DAG abaixo de 15 % (m/m), independentemente do tempo de reação. Estes resultados estão muito abaixo comparados com os resultados obtidos com os mesmos surfactantes em sistema livre de solvente e pressão ambiente, estudados por Fiametti *et al.* (2008), Valério *et al.* (2009a) e Valério *et al.* (2009b), ou com fluidos pressurizados (Valério *et al.*, 2009b, Valério *et al.*, 2010b), que foram acima de 50 % (m/m) de MAG + DAG.

Podem ser notados também, na Tabela 4.7, que a atividade enzimática ficou em torno de 70% do valor da atividade enzimática original (enzima não utilizada, com atividade inicial de 55 U/g). Assim, o surfactante parece não ter um importante papel na influência de atividade enzimática e na reação enzimática.

Os resultados da reação de glicerólise enzimática realizada em banho ultrassônico, sob agitação mecânica de 600 rpm, 65 °C, razão molar de glicerol para óleo de 2:1, potência de ultrassom de 132 W e 2 horas de reação estão descritos na Tabela 4.8.

Podem ser notados a partir da Tabela 4.8, que sem o uso do catalisador, a reação apresentou baixos rendimentos MAG e DAG. Por outro lado, quando a enzima foi utilizada, na concentração de 7,5% em relação à massa dos substratos, foram obtidos rendimentos elevados de MAG e DAG, em torno de 52% (m/m) em geral, mesmo sem a adição de surfactante, mostrando assim o papel significativo do catalisador.

**Tabela 4.8** - Resultados de glicerólise enzimática em banho de ultrassom a 600 rpm, 65 °C, razão molar glicerol para óleo de 2:1, potência do ultrassom de 132 W e 2 h de reação.

Condição	MAG (%) (m/m)	DAG (%) (m/m)	TAG (%) (m/m)	AGL (%) (m/m)	AE (U/g)
Reação contraste	5,12	7,74	67,24	0,21	-
Sem surfactante	14,54	38,95	31,24	0,19	47,9
Triton X-100	16,94	34,06	29,41	0,34	51,9
AOT	25,90	12,73	41,62	1,88	51,1
Tween 65	15,33	31,79	33,62	1,63	67,8
Tween 85	19,67	34,37	26,64	1,24	68,3

Podem ser visto também, na Tabela 4.8, que os rendimentos similares para todos os surfactantes, próximos a 50% (m/m) de MAG + DAG, com exceção do surfactante AOT, que apresentou cerca de 38%

(m/m) de MAG e DAG. Os resultados podem ser considerados relevantes, uma vez que bons rendimentos em MAG e DAG podem ser obtidos a partir do uso de irradiação ultrassônica, com pouca perda de atividade enzimática, apontando assim para uma possível reutilização do catalisador. Além disso, o fato de que rendimentos superiores podem ser obtidos sem o uso de surfactantes numa reação sem adição de solventes pode ser interessante científica e tecnologicamente para a produção de MAG e DAG, evitando onerosos processos de separação. Estes resultados, analisados paralelamente ao estudo de Feltes *et al.* (2010), que realizou a glicerólise enzimática de óleo de peixe, utilizando a lipase Novozym 435, a 55 °C, 600 rpm, com 10% de enzima e 10% de surfactante (Tween 65 e Tween 85), (porcentagem em relação aos substratos) e 2 h de reação, permitem fazer uma breve comparação a respeito do uso do ultrassom. O presente estudo apresentou resultados mais elevados para DAG, 31,79% e 34,37% (Tween 65 e Tween 85, respectivamente) enquanto que o estudo de Feltes alcançou 19,41% e 17,04%, para Tween 65 e Tween 85, respectivamente, demonstrando o efeito positivo do ultrassom conforme mencionado no início do parágrafo.

A respeito do efeito do ultrassom na atividade enzimática pode ser verificado nos resultados das Tabelas 4.7 e 4.8, que a atividade enzimática aumenta ou diminui, indicando que uma mudança de conformação na estrutura ou suporte da enzima ocorreu provavelmente depois do tratamento com ultrassom. De acordo com a literatura, uma onda ultrassônica, que é uma flutuação de pressão periódica, pode controlar as características da enzima alterando sua estrutura em resposta a perturbação dinâmica (Hoshino *et al.*, 2006). Irradiação ultrassônica de 10 a centenas de kHz podem fazer perturbações em certas regiões das enzimas afetando assim sua atividade. Esta propriedade do ultrassom pode permitir um controle sobre as funções desejáveis em uma enzima.

A tolerância das enzimas para o ultrassom pode depender da localização física da enzima na célula ou de sua massa molecular. No entanto, muito pouco é conhecido e relatado sobre o verdadeiro efeito do ultrassom no comportamento da enzima, devido a resultados contraditórios de ativação e inativação de enzimas em tratamento com ultrassom. Ao contrário da desativação enzimática tradicional, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo da enzima, e isto pode ser claramente demonstrado para a alfa-amilase, peroxidase, lacase e fosfatase alcalina (Ozbek e Ulgen, 2000; Rehorek *et al.*, 2004; Basto *et al.*, 2007).



No entanto, a desativação de algumas enzimas através do ultrassom, incluindo protease alcalina, glicose-6-fosfatase desidrogenase e tripsina, foi observada quando uma alta potência de ultrassom de 500 W foi utilizada (a potência habitual usada é de 25 a 150 W) (Basto *et al.*, 2007). Isto foi provavelmente devido à reação da hidroxila ou radicais hidrogênio formados com a cadeia proteica (Basto *et al.*, 2007), os quais podem permitir a agregação da enzima, assim obstruindo os sítios ativos enquanto que ao mesmo tempo diminui a estabilidade da proteína (Tian *et al.*, 2004). Além disso, forças de cisalhamento que ocorrem no fluido durante a irradiação ultrasônica também têm um papel significativo na inativação da enzima (Ozbek e Ulgen, 2000).

Mesmo que nenhum trabalho tenha sido encontrado na literatura a respeito da produção de MAG e DAG através da glicerólise enzimática sob irradiação ultrasônica, pode ser mencionado o estudo de Babicz *et al.* (2010), que descreveram a produção de diacilgliceróis através da hidrólise parcial do óleo de soja catalisado por lipase em banho ultrasônico, 125 W e frequência de 47 kHz, sob agitação mecânica. Melhores rendimentos (cerca de 40% (m/m)) e pequenos tempos de reação (1,5 h) foram obtidos sob sonicação quando comparados com processos térmicos. Outro trabalho, Zhong *et al.* (2010), reporta a produção de MAG e DAG a partir da glicerólise enzimática de óleo de soja em agitação mecânica, na presença de NaOH como catalisador, com e sem solvente, sob banho de ultrassom, variando a potência de 40 a 100 W, e frequência de 25 kHz. A formação de DAG não foi observada no sistema livre de solvente em nenhuma das condições experimentais, mas quando os solventes orgânicos foram empregados, rendimentos de 60% (m/m) de MAG e DAG foram observados.

A partir destes dois estudos relatados no parágrafo anterior, o uso do aparato experimental de banho de ultrassom e das condições experimentais pode ser comparado com o presente estudo, no entanto, neste caso, foram utilizados um catalisador reutilizável (enzima) e um sistema livre de solventes.

### **4.3 Estudo cinético da glicerólise enzimática em meio ultrasônico**

A partir dos resultados obtidos com a glicerólise sem o uso de surfactante, realizada em banho ultrasônico sob agitação mecânica, foram realizados diversos experimentos cinéticos, variando a razão molar de glicerol para óleo, temperatura e concentração de enzima, os

quais estão apresentados na Tabela 4.9. Com este objetivo, a glicerólise enzimática foi realizada em um tempo de 6 horas, em cinética com amostragem não destrutiva. As amostras foram retiradas nos tempos de 15, 30, 45, 60, 120, 240 e 360 minutos.

A Tabela 4.9 apresenta as velocidades iniciais de formação de DAG e MAG de cada cinética, as quais foram calculadas para os primeiros 60 min de reação, que correspondem à faixa linear da curva. No decorrer do item 4.3 serão discutidos os resultados obtidos para as velocidades iniciais de formação dos produtos.

**Tabela 4.9** - Resultados de velocidades iniciais de formação de MAG e DAG em reações de glicerólise enzimática em meio ultrassônico, com 6 horas de reação, potência do ultrassom de 132 W e agitação de 600 rpm.

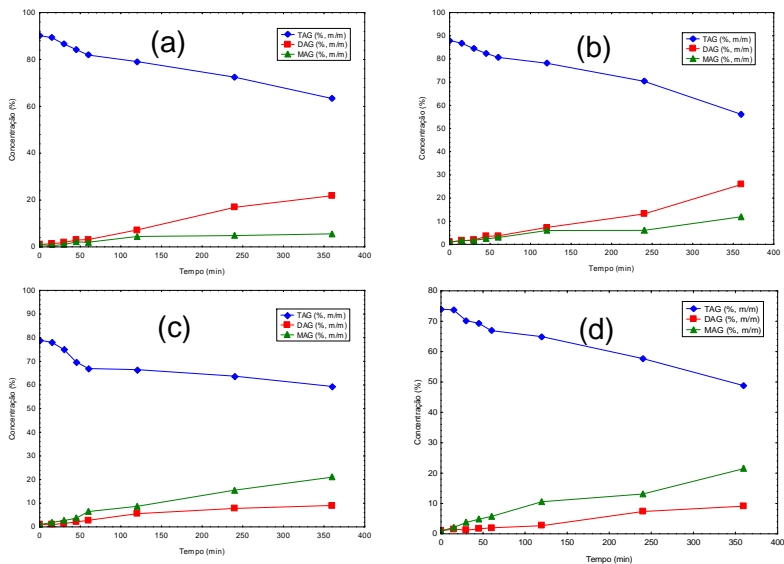
Exp.	Temperatura (°C)	% enzima imobilizada (m/m)	Razão molar glicerol:óleo (mol/mol)	$r_{MAG}$ (mmol/min)	$r_{DAG}$ (mmol/min)
1	70	2,5	0,8:1	0,048	0,035
2	70	2,5	1:1	0,062	0,049
3	70	2,5	2:1	0,109	0,046
4	70	2,5	3:1	0,096	0,033
5	70	7,5	0,8:1	0,428	0,152
6	70	7,5	1:1	0,258	0,179
7	70	7,5	2:1	0,265	0,150
8	70	7,5	3:1	0,160	0,117
9	70	10	0,8:1	0,248	0,125
10	70	10	1:1	0,197	0,143
11	70	10	2:1	0,255	0,085
12	70	10	3:1	0,167	0,107
13	50	7,5	2:1	0,054	0,035
14	50	10	0,8:1	0,095	0,101
15	50	10	1:1	0,121	0,119
16	50	10	2:1	0,061	0,028
17	60	2,5	2:1	0,126	0,068
18	60	7,5	2:1	0,168	0,127
19	60	10	0,8:1	0,190	0,146
20	60	10	1:1	0,171	0,145
21	60	10	2:1	0,171	0,144
22	60	10	3:1	0,116	0,098

### 4.3.1 Efeito da razão molar glicerol:óleo

Para analisar o efeito da razão molar glicerol:óleo, foram realizados experimentos a 70 °C, com concentração de enzima de 2,5, 7,5 e 10% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W, sem surfactante, e as razões molares de glicerol para óleo variando de 0,8:1, 1:1, 2:1 e 3:1. Os resultados obtidos para as cinéticas contendo 2,5, 7,5 e 10% (m/m) de enzima estão apresentados na Figura 4.6, 4.7 e 4.8, respectivamente.

A partir da Figura 4.6-a, pode-se observar que os experimentos realizados na concentração de enzima de 2,5% (m/m) apresentaram concentrações baixas de MAG e DAG, para as razões molares estudadas. Na Figura 4.6-a, utilizou-se a razão molar de 0,8:1 (glicerol:óleo), que, a partir do estudo das etapas de reação de glicerólise enzimática, verificou-se que o equilíbrio pode ser deslocado para o produto de interesse, MAG e/ou DAG, em diferentes condições, como relataram Cheirsilp *et al.* (2007). Para todas as condições apresentadas na Figura 4.6, até 60 minutos de reação, a concentração de MAG + DAG, não alcançou mais que 10% (m/m).

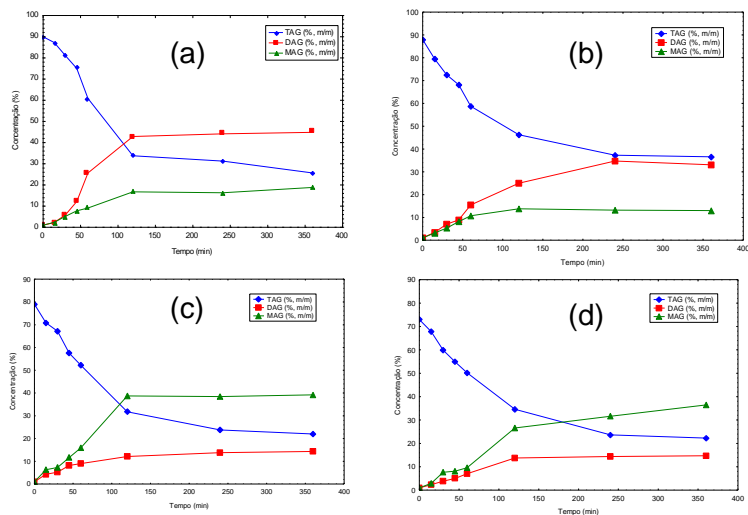
O experimento com razão molar glicerol para óleo de 1:1 apresentou, ao final da reação, em 360 min, 25% (m/m) de DAG e 12 % (m/m) de MAG, mostrando-se a melhor condição em termos de concentração de produtos para a concentração de enzima de 2,5% (m/m) em relação à massa dos substratos e temperatura de 70 °C. Pelos dados de velocidade inicial de reação apresentados na Tabela 4.9, pode-se notar que a condição com razão molar glicerol:óleo de 2:1 apresentou a maior velocidade inicial para formação de MAG, que foi de 0,109 mmol/min, mostrando que com o aumento da concentração de glicerol no meio reacional eleva a velocidade de reação, diminuindo, porém, quando há glicerol em excesso, como se pode ver no experimento 4, com razão molar de glicerol:óleo de 3:1, onde a velocidade inicial foi de 0,096 mmol/min. O mesmo comportamento pode ser observado para a produção de DAG, que obteve a menor velocidade inicial no experimento 4, ficando com 0,033 mmol/min.



**Figura 4.6** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 2,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1.

Foram estudadas também diferentes razões molares para sistemas com 7,5% (m/m) de enzima e temperatura de 70 °C, agitação de 600 rpm e potência de ultrassom de 132 W. A partir da Figura 4.7, pode ser observada uma rápida velocidade inicial de reação com concentrações consideráveis de MAG e DAG em até 2 horas de reação. Portanto, a partir de um ponto de vista prático, a reação poderia ser interrompida, devido a aspectos econômicos, pois apresenta pequenos ganhos de conversão dos reagentes em produtos após certo tempo de reação. As velocidades de reação para a produção de MAG diminui com o aumento da concentração de glicerol, passando de 0,428 mmol/min na condição de 0,8:1 (glicerol:óleo) para 0,160 mmol/min na condição de 3:1 (glicerol:óleo). No caso da velocidade inicial de formação de DAG, seu máximo está na condição de razão molar 1:1, em 0,179 mmol/min, porém, a menor velocidade inicial de formação de DAG também foi observada na condição de razão molar de 3:1, que foi de 0,117 mmol/min.

A estequiometria da reação requer uma razão molar de glicerol para óleo de 2:1, mas a produção de MAG e DAG pode ser favorecida pelo deslocamento da reação para a formação de produtos elevando a razão molar de glicerol para óleo além do valor estequiométrico.



**Figura 4.7** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 7,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) cinética de razão molar glicerol:óleo de 3:1.

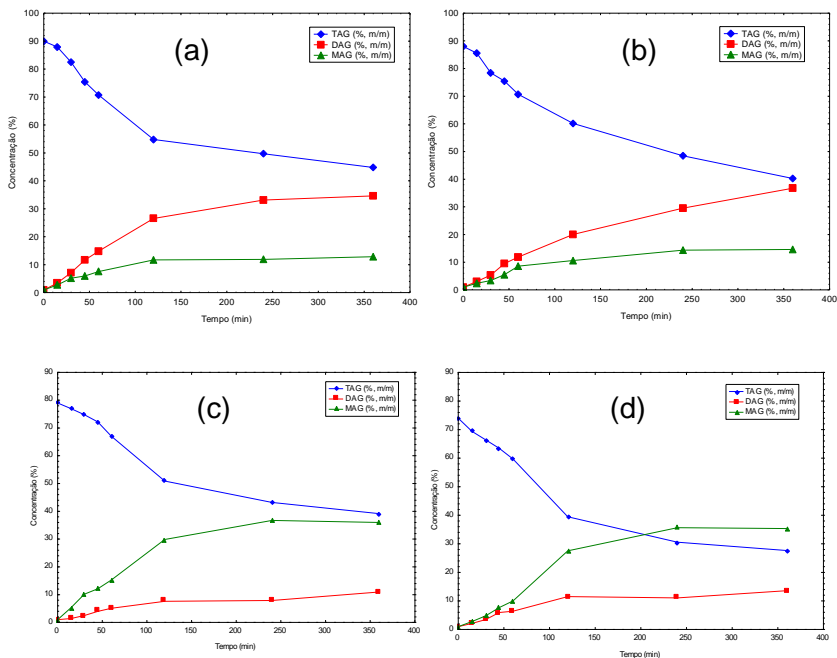
Como mencionado por Yang *et al.* (2005), o efeito da razão dos substratos pode afetar o rendimento dos produtos em dois modos. Um aumento na quantidade de glicerol além da estequiometria pode favorecer a produção de MAG através do deslocamento da reação para a formação de produtos. Por outro lado, um aumento da quantidade de glicerol certamente afeta a polaridade do sistema assim como influencia a estabilidade e homogeneidade do sistema. Além disso, Cheirsilp *et al.* (2007), quando conduziram a glicerólise em óleo de palma utilizando lipase imobilizada, argumentaram que altas concentrações de glicerol podem levar a um aumento na velocidade inicial da reação de produção de MAG e também na concentração final de monoacilgliceróis.

Coteron *et al.* (1998) avaliaram o efeito da razão molar de glicerol para óleo (3:1 e 6:1) na glicerólise enzimática de óleo de oliva sem solventes, a 75 °C e observaram que, após 4 horas, ambos sistemas

alcançaram níveis estáveis de concentração de MAG e, depois de 7 h, o excesso de glicerol não afetou o conteúdo dos produtos. No presente caso, os dados experimentais mostram que o excesso de glicerol não é eficiente no início da reação, mas se torna importante depois de certo tempo de reação. Além disso, parece que a supressão do glicerol a partir da relação estequiométrica, favorece a produção de DAG, que é uma reação de produção intermediária. A partir dos resultados apresentados na Figura 4.7a, podemos observar que os conteúdos de MAG + DAG com cerca de 63% (m/m) foram alcançados em tempos longos, indicando assim uma rota promissora para a produção de MAG e DAG utilizando irradiação ultrassônica utilizando razões molares de glicerol: óleo baixas (0,8:1).

A Figura 4.8 mostra os resultados para a mesma temperatura (70 °C), porém com concentração de enzima elevada (10%), onde pode ser observada uma menor concentração de MAG e DAG, quando comparados com os resultados obtidos com a condição de concentração de enzima em 7,5%. Este fato pode ser explicado devido a uma baixa mistura do meio reacional, visto que a quantidade de enzima adicionada ao meio é grande, e assim pode-se ocorrer uma limitação de transferência de massa. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, onde mostram que um aumento da quantidade de enzima acima de uma certa quantia pode apresentar um efeito negativo no rendimento dos produtos, podendo aumentar somente as taxas de reação (Feltes *et al.*, 2012; Kruger *et al.*, 2010; Valério *et al.*, 2009b; Watanabe *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005).

Observando-se as velocidades iniciais do experimento 8 e 12, apresentados na Tabela 4.9, para MAG e DAG (ambos com razão molar 2:1, porém com concentração de enzima de 7,5 e 10%, respectivamente), pode-se notar que as velocidades iniciais são muito parecidas, 0,160 e 0,167 mmol/min para MAG, e 0,117 e 0,107 mmol/min para DAG, respectivamente. Isso demonstra que a velocidade inicial pode se alterar muito pouco com a quantidade de enzima adicionada ao meio reacional, entretanto há uma grande alteração na velocidade inicial com a mudança na quantidade de substratos, como pode ser observado nas velocidades iniciais dos experimentos 9 a 12, para a formação de DAG, obteve uma velocidade de 0,125 mmol/min no experimento 9 (razão molar 0,8:1), já no experimento 10 (1:1), elevou-se para 0,143 mmol/min, e no experimento 11(2:1), teve um diminuição (0,085 mmol/min).



**Figura 4.8** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 70 °C, concentração de enzima de 10% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1 e (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1.

Por outro lado, analisando os resultados para as condições experimentais apresentadas anteriormente, ao final das 6 horas de reação, o rendimento de MAG é altamente influenciado pelo aumento da razão molar glicerol:óleo, como visto, como por exemplo, nos experimentos 5 a 8, onde a concentração de MAG aumenta, cerca de 13%, 39% e 36%, com o aumento razão molar de 1:1, 2:1 e 3:1, respectivamente.

Estas informações ficam claras ao serem observadas as velocidades iniciais de formação de MAG para as três condições até aqui apresentadas (2,5, 7,5 e 10% de enzima e 70 °C) na razão molar de 3:1, que foram de 0,096, 0,160 e 0,167 mmol/min, respectivamente. Estas cinéticas conduziram a velocidades de formação de MAG mais baixas, quando comparadas com as cinéticas de 0,8:1, 1:1 e 2:1 nesta



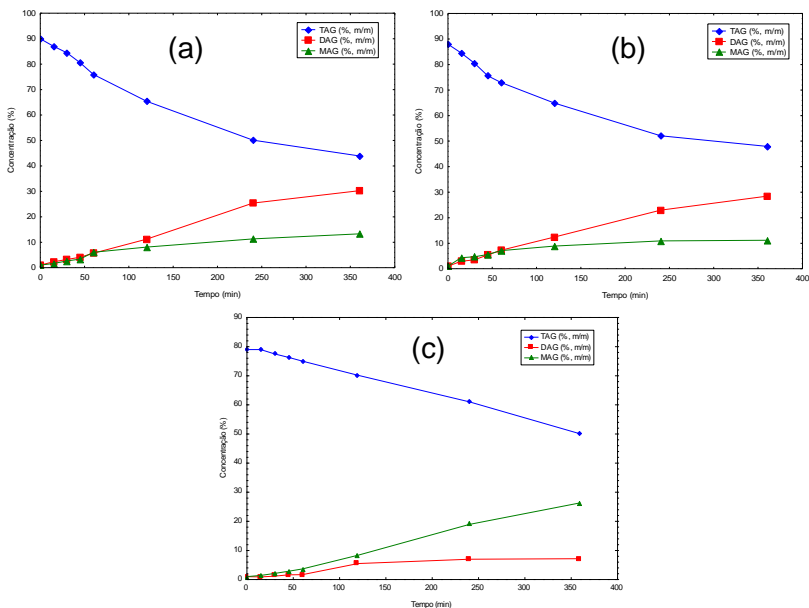
mesma temperatura, provavelmente pelo aumento de viscosidade do meio causada pela grande quantidade de glicerol e consequente diminuição da transferência de massa.

Com o objetivo de racionalizar energia e também avaliar o perfil da reação em temperaturas mais baixas, a temperatura do sistema foi reduzida de 70 °C para 50 °C, adotando-se as concentrações enzimáticas de 7,5% e 10% para esta temperatura, variando a razão molar glicerol:óleo em 0,8:1, 1:1 e 2:1, de acordo com os experimentos 13 a 16, da Tabela 4.9. A condição de concentração enzimática de 2,5% apresentou concentrações dos produtos desprezíveis, por isso não será avaliada neste estudo. Os resultados referentes às cinéticas com temperatura reacional de 50 °C estão apresentados na Figura 4.9.

A partir da Figura 4.9, pode ser notado que a produção de MAG e DAG é mais baixa nestas condições quando comparadas as condições experimentais na temperatura de 70 °C, como no caso dos experimentos 7 (70 °C) e 13 (50 °C), para a mesma concentração de enzima (7,5%) e razão molar glicerol:óleo (2:1). Para a concentração enzimática de 10%, comparado com 70 °C, praticamente valores similares foram encontrados a 50 °C e razão molar glicerol:óleo de 0,8:1 e 1:1, porém resultados muito inferiores foram encontrados na condição com razão molar de glicerol:óleo 2:1 (experimento 16). A baixa miscibilidade do glicerol com o óleo também pode ser a causa da baixa concentração de produtos observada nos experimentos na temperatura de 50 °C. Não foram realizados experimentos na condição de razão molar de glicerol:óleo de 3:1 nesta temperatura devido a baixa miscibilidade dos reagentes, ou seja, o excesso de glicerol no meio reacional dificulta a transferência de massa para o sítio ativo da enzima pela sua aderência ao suporte enzimático, como pode ser visto no estudo de Valerio (2009) que apresentou concentrações baixas de MAG e DAG quando utilizou razões molares de glicerol:óleo superiores a 6:1. Yang *et al.* (2005b) analisaram o efeito da razão molar glicerol:óleo (4,5:1, 7:1, 9:1, 11:1, 13:1 e 46:1) na glicerólise do óleo de girassol com temperatura de 70 °C, 8% (m/m) de lipase imobilizada Novozym 435, 500 rpm e 5 horas de reação, em sistema livre de surfactante e solvente e obtiveram somente 17% de MAG com a razão molar 9:1 de glicerol:óleo.

É de senso comum que a temperatura apresenta dois importantes papéis no sistema reacional. Primeiramente, um aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, elevar a solubilidade e melhorar o processo de difusão dos substratos, reduzindo assim as limitações devido à transferência de massa, além de favorecer as interações entre a enzima e os substratos. Além disso, as enzimas

possuem uma temperatura ótima de atuação, estabelecida para cada sistema reacional, e no caso da enzima utilizada neste estudo, está situada na faixa de 50 a 70 °C (Kruger *et al.*, 2010; Valerio *et al.*, 2009a; Coteron *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 2005 e Novo Nordisk, 1992).

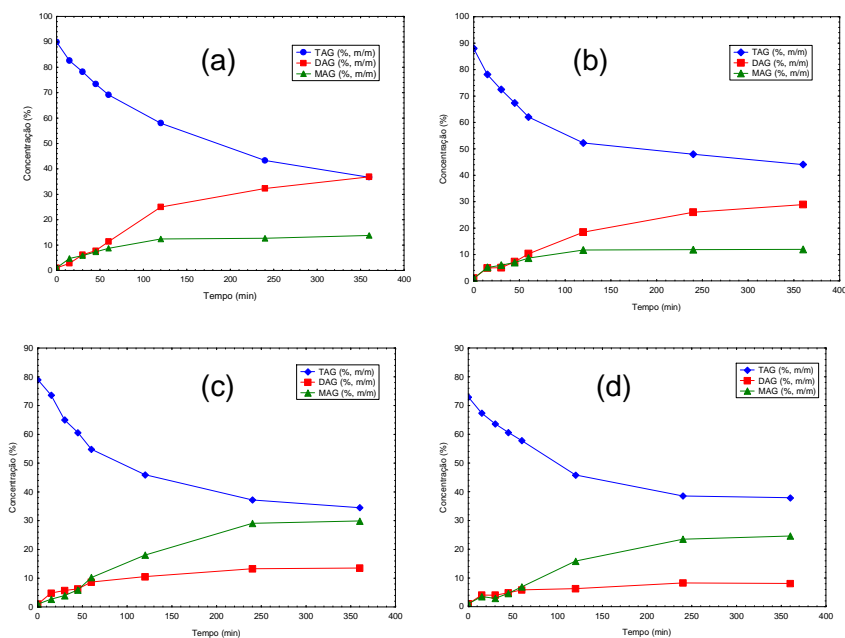


**Figura 4.9** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 50 °C, agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1 com concentração de enzima de 7,5% e, (c) razão molar glicerol:óleo de 2:1, com concentração de enzima de 10% (m/m).

Observando também as velocidades iniciais de reação, pode-se notar que tanto para MAG e DAG, as velocidades iniciais apresentam o mesmo comportamento. Na condição com razão molar 0,8:1, a velocidade inicial de formação de MAG e DAG, foram de 0,095 mmol/min e 0,101 mmol/min, respectivamente, e elevando este valor na condição de razão molar de 1:1, com 0,121 mmol/min e 0,119 mmol/min, respectivamente, porém quando elevou-se a razão molar de glicerol:óleo para 2:1, houve uma queda nas velocidades iniciais de ambos produtos, caindo para 0,061 mmol/min para MAG e 0,028 mmol/min para DAG, mostrando mais uma vez que o aumento de

glicerol no meio reacional pode impedir a formação de DAG. A indicação de que a diminuição da concentração de glicerol aumenta a produção de DAG vem colaborar com o entendimento de resultados semelhantes encontrados na literatura apresentados por Moquin *et al.* (2005 e 2006) e Cheirsilp *et al.* (2007).

Levando em consideração os resultados até aqui apresentados, foram realizados alguns experimentos elevando-se a temperatura até 60 °C, como mostrado nas condições dos experimentos 17 a 22 na Tabela 4.9. Estes experimentos foram divididos em duas etapas, onde nos experimentos 17 e 18 variou-se a concentração de enzima, e nos seguintes manteve-se a concentração de enzima constante e variou-se a razão molar de glicerol:óleo, onde os resultados estão apresentados na Figura 4.10. Os experimentos 17 e 18 serão reportados no próximo item.



**Figura 4.10** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a razão molar de glicerol:óleo. Condições experimentais: 60 °C, concentração de enzima de 10% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 0,8:1, (b) 1:1, (c) 2:1, (d) razão molar glicerol:óleo de 3:1.

Nestes experimentos da Figura 4.10 (a) e (b), pode-se observar o mesmo comportamento reacional das cinéticas quando comparadas as condições experimentais com temperaturas de 50 °C e 70 °C, porém as concentrações dos produtos foram muito próximas às condições experimentais de 70 °C e muito mais elevadas que nas condições de 50 °C. Como foi dito anteriormente, esta temperatura está mais próxima da ideal para a atuação da enzima (Novo Nordisk, 1992), isto pode então explicar as concentrações parecidas dos produtos para as temperaturas de 60 °C e 70 °C.

### 4.3.2 Influência da temperatura de reação

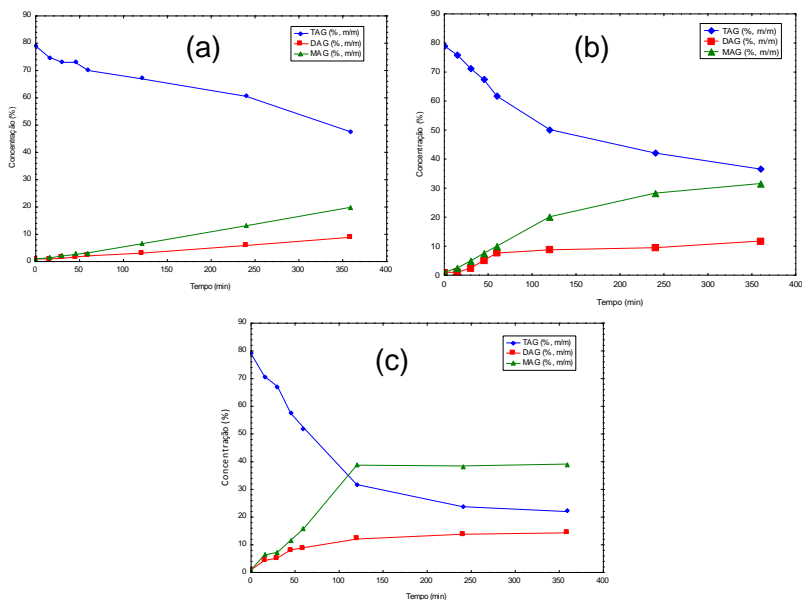
Com a finalidade de avaliar o efeito da temperatura sobre o conteúdo de MAG e DAG manteve-se fixa a razão molar glicerol:óleo de oliva em 2:1, agitação em 600 rpm, concentração de enzima de 7,5% (m/m), possibilitando assim a obtenção das curvas de conteúdo de MAG e DAG em função do tempo, conforme apresentado na Figura 4.11.

Com os resultados obtidos neste estudo, verifica-se claramente que a temperatura apresenta-se como uma variável de grande influência em sistemas reacionais que envolvem a presença de catalisadores enzimáticos. Através da Figura 4.11 é possível verificar que a temperatura que proporcionou a melhor atuação do catalisador, conduzindo à obtenção de maiores conteúdos de MAG e DAG foi a condição utilizando temperatura de 70 °C, atingindo valores de 40% em termos de MAG e 14% em termos de DAG em 2 h de reação e mantendo a concentração até o fim das 6 h de reação. Por outro lado, na menor temperatura estudada, 50 °C, a concentração de MAG não passou de 20% ao final de 6 h de reação.

Com base no exposto anteriormente, é possível concluir que, para este sistema reacional utilizando Novozym 435, 70 °C é a temperatura que proporciona melhor atuação do catalisador enzimático levando à obtenção de maiores conteúdos de MAG e DAG.

Estes resultados corroboram com outros estudos relacionados a glicerólise enzimática, como por exemplo, Yang *et al.* (2005b), que avaliaram o efeito da temperatura na glicerólise enzimática do óleo de girassol em um sistema livre de solvente e surfactante constituído por 10 % de enzima (Novozym 435), razão molar de glicerol:óleo 4,5:1, 500 rpm de agitação nas temperaturas de 40 °C e 70 °C. Os autores observaram que, após 24 h de reação, a conversão de MAG alcançou 16% (m/m) a 40 °C, e o mesmo valor foi observado com 5 horas de

reação a 70 °C (com 8% de enzima), uma reação muito mais rápida, porém não atrativa do ponto de vista comercial. Pawongrat *et al.* (2007) estudaram o efeito da temperatura (30 a 50 °C) na produção de MAG a partir do óleo de atum com a enzima lipase imobilizada comercial IM-AK. Os autores observaram que na faixa de temperatura de 30 a 45 °C, a produção de MAG aumentou com a temperatura.

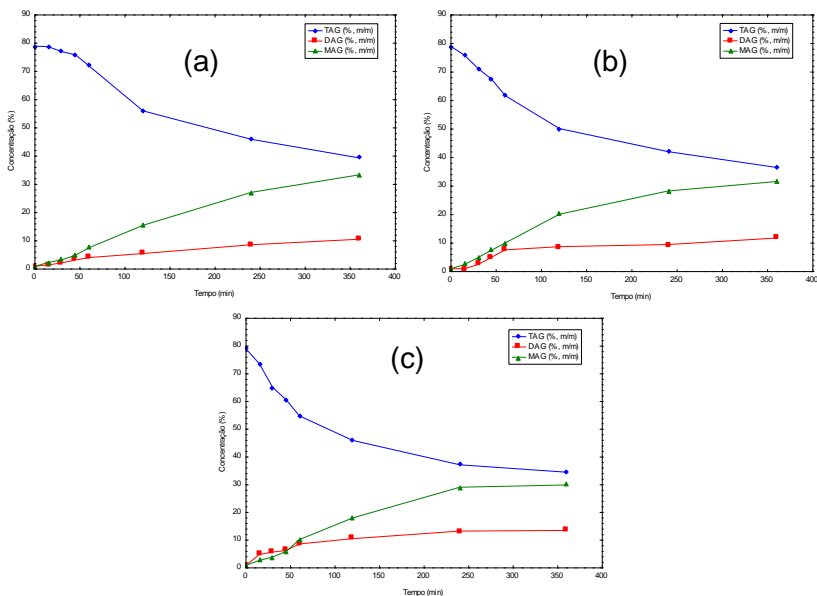


**Figura 4.11** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a temperatura. Condições experimentais: razão molar glicerol:óleo 2:1, concentração de enzima de 7,5% (m/m), agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 50 °C, (b) 60 °C, (c) 70 °C.

Comparando-se as cinéticas da Figura 4.11, pode-se observar que quando a temperatura é elevada de 50 °C para 70 °C, a reação se torna muito mais rápida, com velocidades iniciais de formação dos produtos maiores com o aumento da temperatura, 0,054 e 0,035 mmol/min, 0,168 e 0,127 mmol/min, 0,265 e 0,150 mmol/min, para MAG e DAG a 50, 60 e 70 °C, respectivamente, e, além disso, maiores concentrações de MAG e DAG são obtidas.

### 4.3.3 Influência da concentração de enzima no meio reacional

Na Figura 4.12 são comparadas três cinéticas realizadas nas mesmas condições, 60 °C, razão molar de glicerol para óleo de 2:1, variando a concentração de enzima utilizada nas reações. Pode ser observado a partir das Figuras 4.12 (a), (b) e (c) que o aumento da concentração do catalisador aumenta somente os valores da velocidade da reação, o que fica evidenciado ao se observar as velocidades iniciais obtidas: 0,514 e 1,872 mmol/min para produção de MAG e 0,155 e 0,394 mmol/min para a produção de DAG, respectivamente para as reações com 2,5 e 10% (m/m) de enzima no meio reacional.



**Figura 4.12** – Cinética de produção de MAG e DAG variando a concentração de enzima no meio reacional. Condições experimentais: razão molar glicerol:óleo 2:1, temperatura de 60 °C, agitação de 600 rpm, potência do ultrassom de 132 W e sem a utilização de agente surfactante. (a) 2,5%, (b) 7,5% e (c) 10% de enzima em relação à massa dos substratos.

Levando em consideração os experimentos até aqui apresentados, pode-se observar que o aumento da concentração de enzima de 7,5% a 10%, não se justifica, pelo fato de que os rendimentos

finais de MAG e DAG são muito parecidos, e assim pouco influenciados pela elevação da concentração de enzima. Além disto, uma quantidade maior de enzima adicionada ao meio reacional pode ocasionar a formação de aglomerados de enzima, fazendo com que o sítio ativo das enzimas não esteja disponível para os substratos, conforme relatada por Yang *et al.* (2005a), Valerio *et al.* (2009b) e Kruger *et al.* (2010).

#### 4.4 Medida da atividade enzimática

As medidas das atividades enzimáticas residuais foram determinadas ao final de cada experimento cinético, e na Tabela 4.10 estão reportados os valores de atividade enzimática (U/g) e atividade residual (%) de cada experimento. A atividade enzimática média do lote de enzima utilizado nestes experimentos foi de 65 U/g.

Na Tabela 4.10 pode ser observado que na temperatura de 70 °C (experimentos 1 a 12), a atividade residual ao final dos experimentos 1 a 8 apresentaram valores próximos, isso indica que a elevação de quantidade de enzima até 7,5% (m/m) não altera a atividade, porém, com o aumento da concentração de enzima no sistema para 10%, nos experimentos restantes (9 a 12), a atividade residual diminuiu cerca de 15%. Este último dado mostra que o aumento da concentração de enzima no meio reacional pode colaborar com a diminuição da conversão dos reagentes em produtos, visto que nestes experimentos realizados com 10% (m/m) de enzima, a concentração dos produtos foi inferior aos experimentos com 7,5% de enzima a 70 °C. Um fato interessante a ser notado, é que a razão molar não afetou de maneira expressiva a atividade residual, visto que não foram realizados experimentos com razões molares de glicerol:óleo maiores que 3:1 neste trabalho.

Para os experimentos realizados nas temperaturas de 50 °C, os resultados também mostraram que nos experimentos realizados nas condições com 10% (m/m) de enzima apresentaram atividade residual menor (43,83, 52,92 e 54,93% nos experimentos 14, 15, e 16, respectivamente) quando comparados ao experimento 13, que foi realizado com 7,5% de enzima, e apresentou 62,64% de atividade residual.

**Tabela 4.10** – Valores de atividade enzimática e atividade enzimática residual para os experimentos de glicerólise enzimática em meio ultrassônico.

Exp.	Temperatura (°C)	% enzima imobilizada (m/m)	Razão molar glicerol:óleo (mol/mol)	AE (U/g) <sup>a</sup>	Atividade residual (%)
1	70	2,5	0,8:1	43,19	66,44
2	70	2,5	1:1	42,86	65,93
3	70	2,5	2:1	41,93	64,51
4	70	2,5	3:1	41,12	63,26
5	70	7,5	0,8:1	43,32	66,64
6	70	7,5	1:1	44,40	68,31
7	70	7,5	2:1	45,94	70,67
8	70	7,5	3:1	43,47	66,87
9	70	10	0,8:1	33,41	51,40
10	70	10	1:1	31,84	48,98
11	70	10	2:1	34,23	52,66
12	70	10	3:1	29,98	46,12
13	50	7,5	2:1	40,72	62,64
14	50	10	0,8:1	28,49	43,83
15	50	10	1:1	34,40	52,92
16	50	10	2:1	35,71	54,93
17	60	2,5	2:1	47,28	72,74
18	60	7,5	2:1	44,13	67,89
19	60	10	0,8:1	38,24	58,83
20	60	10	1:1	39,92	61,42
21	60	10	2:1	39,95	61,46
22	60	10	3:1	35,37	54,41

a: AE (Atividade Enzimática, U/g)



O mesmo comportamento pode ser notado também nos experimentos realizados a 60 °C, na concentração enzimática de 2,5% (m/m), a atividade residual foi de 72,74%, enquanto que no experimento de concentração enzimática de 7,5% (m/m), a atividade residual foi de 67,49% e no experimento 21, nas mesmas condições dos anteriores (razão molar 2:1), a atividade residual ficou em 61,46%.

As ondas de ultrassom podem interferir nas características da enzima, alterando sua estrutura em resposta à perturbação dinâmica provocada pelo ultrassom (Hoshino *et al.*, 2006). Existem poucos estudos sobre o efeito do ultrassom sobre as enzimas e têm sido relatados resultados contraditórios de inativação e ativação da enzima após serem submetidas ao ultrassom. Diferente da tradicional inativação das enzimas em temperaturas elevadas, o processo de sonicação não destrói o sítio ativo das enzimas. Esta constatação tem sido claramente demonstrada com  $\alpha$ -amilase, peroxidase de raiz forte, lacase e fosfatase alcalina (Ozbek; Ulgen, 2000; Rehorek *et al.*, 2004; Basto *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos relatam a realização de síntese enzimática em ultrassom em sistemas reacionais livres de solvente e sistemas com solventes (Liu *et al.*, 2008; Babicz *et al.*, 2010; Ceni, 2010), mostrando que o sistema reacional tem grande influência na síntese enzimática.

Babicz *et al.* (2010) verificaram que a taxa de agitação mecânica é muito importante para a conversão de mono e diglicerídeos, mas altas taxas de agitação podem danificar o suporte da enzima ou deixar a enzima aderida à parede do reator, fora da solução reacional, diminuindo a capacidade catalítica. Os autores obtiveram os melhores resultados com agitação de 700 rpm com as enzimas Lipozyme TL IM e Lipozyme RM IM, sendo esta agitação muito próxima a utilizada neste estudo (600 rpm).

Xiao *et al.* (2005) obtiveram conversão de 98% após 2 horas e 120 W em banho de ultrassom e apenas 48% foi observada em agitação sob as mesmas condições. Observaram também que o ultrassom não alterou a regioselectividade da acilação enzimática.

Liu *et al.* (2008) observaram que na hidrólise do óleo de soja em sistema livre de solvente em ultrassom o rendimento das reações foi aumentado em 94, 64, 58, 41 e 34% em tempos de 1, 2, 4, 4 e 5 horas, respectivamente, quando comparado ao rendimento obtido nas condições de agitação em banho termostaticado, provavelmente devido ao fato de o ultrassom induzir a uma melhor dispersão e diminuir a aglomeração da enzima.

Babicz *et al.* (2010) avaliaram o efeito da concentração de enzima (1 e 2% m/m) na hidrólise de óleo de soja em ultrassom (frequência de 47 kHz e potência de 125 W) e observaram que quando utilizado 1% m/m de Lipozyme TL IM em 1,5 horas o rendimento foi de 40% e quando utilizado 2% m/m da mesma enzima, o rendimento foi de 32% em 3 horas. Os autores avaliaram o efeito da concentração de enzima utilizando as enzimas Lipozyme RM IM e Novozym 435. Com a Lipozyme RM IM a concentração de 1% m/m apresentou um rendimento de 41% enquanto 2% m/m de enzima 34%. A Novozym 435 apresentou rendimento de 32% quando utilizado 1% m/m de enzima e 30% com 2% m/m da enzima, mostrando que com menores concentrações de enzima, foram obtidos maiores rendimentos com as duas enzimas testadas.

Liu *et al.* (2008) avaliaram o efeito da concentração de enzima na hidrólise de óleo de soja, para os intervalos de 0,1, 0,55, 1, 2 e 3% de lipase de *C. lipolytica* em sistema livre de solvente utilizando ultrassom. A taxa de reação mostrou aumento rápido seguido por um ligeiro aumento, juntamente com o aumento da concentração de 0,1% para 0,55% e de 0,55% para 3%, respectivamente. Não foi observada diminuição da taxa de reação com o aumento da concentração da enzima. Com base nestes resultados, os autores acreditam que exista uma concentração de enzima crítica (0,55% neste caso), acima do qual a interface de reação está saturada.

#### 4.5. Considerações finais

Os resultados apresentados neste capítulo contribuem para o melhor entendimento da glicerólise enzimática para a produção dos emulsificantes MAG e DAG, bem como para o desenvolvimento de novas rotas de produção destes compostos. O estudo cinético indicou as condições experimentais para maximização dos produtos desejáveis, onde foram discutidos fatores ainda pouco explorados na literatura, como por exemplo, a maximização da produção de DAG pela restrição de glicerol no meio reacional.

A glicerólise enzimática com n-butano pode ser uma rota alternativa para métodos convencionais, devido aos altos teores obtidos dos produtos (70% MAG), que foram alcançados em 70 °C, 7,5% (m/m) de enzima e 10 bar, com uma relativa baixa relação mássica de solvente para substrato (4:1), quando comparado as elevadas razões reportadas na

literatura, de até 10:1, e razão molar estequiométrica em baixos tempos de reação (2 horas).

Um ponto interessante trata da concentração de enzima no meio reacional, onde foi observado que concentrações acima de 7,5% (m/m, em relação aos substratos glicerol e óleo) pouco influenciam na formação dos produtos de interesse da reação.

Em relação às concentrações observadas nas diferentes condições experimentais utilizando meio ultrassônico, o maior valor encontrado para a produção de MAG foi verificado utilizando as condições reacionais de 70 °C, 7,5% (m/m) de enzima, relação molar de glicerol:óleo de 2:1. Para a produção de DAG, as condições em que obteve-se a maior velocidade inicial foram nas condições de 70 °C, 7,5% (m/m) de enzima, relação molar de glicerol:óleo de 0,8:1. As condições experimentais que resultaram nas maiores conversões de MAG, ao final das 6 horas de reação, foram as que utilizaram razão molar de glicerol:óleo de 2:1 (> 30%, m/m).

É interessante observar também que, as reações que utilizaram a relação molar de glicerol:óleo de 3:1 foram as que apresentaram as menores velocidades iniciais para MAG e DAG. Além disso, as condições experimentais que resultaram nas maiores conversões de DAG, ao final das 6 horas de reação, foram as que utilizaram a menor razão molar de glicerol:óleo - 0,8:1 (45%, m/m). O experimento que se obteve, ao final da reação, o maior rendimento de MAG + DAG (64%, m/m) foi o que utilizou as condições de 70 °C, 7,5% (m/m) de enzima, razão molar de glicerol:óleo de 0,8:1.



## 5. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados provaram o potencial do uso de enzimas lipases imobilizadas, no presente caso, da lipase Novozym 435, como catalisador da reação de glicerólise. Além disso, mostraram-se primordiais tanto a contribuição da utilização de solvente pressurizado como meio para diminuir a resistência à transferência de massa no sistema glicerol:óleo, bem como a utilização de meio ultrassônico para maximização da produção de MAG e DAG.

- Em meio pressurizado, a pressão de 10 bar, 70 °C, 7,5% (m/m) de enzima, razão mássica solventes:substratos de 4:1 e razão molar de 2:1 e utilizando AOT como surfactante promoveu elevadas concentrações dos produtos, especialmente MAG (70%, m/m) em 2 horas de reação.

- Nas reações de glicerólise utilizando uma sonda, onde variou-se a intensidade da irradiação de 25 a 45% da potência total, em temperatura constante de 65 °C e razão molar de glicerol para óleo de 2:1. Os conteúdos de MAG e DAG, a partir do teste em branco, realizado sem enzima e sem surfactante no meio reacional, pode ser considerado desprezível, demonstrando que a reação de glicerólise na condição estudada não pode ser considerada como auto catalítica, mesmo sob influência da irradiação fornecida ao meio. Na adição da enzima Novozym 435 ao meio reacional, na concentração de 7,5% (em reação à massa dos substratos), rendimentos da ordem de 30 % em termos de MAG e DAG, foram obtidos em 20 minutos de reação, mostrando o relevante papel da enzima na reação.

- A adição de surfactantes ao meio reacional (em concentração constante de 16% com relação à massa dos substratos) sendo eles Triton X-100, AOT, Tween 65 e Tween 85, mantendo fixa a concentração de enzima em 7,5% (m/m) e irradiação em 30% (150 W) da potência total, apresentaram rendimentos de MAG + DAG abaixo de 15 % (m/m), independente do tempo de reação. Além disso, os resultados apresentados deduzem que a sonda pode danificar a superfície da enzima que existe uma perda maior de atividade quando a potência de irradiação é elevada, possivelmente devido ao contato direto entre as partículas de enzima e a sonda ultrassônica, o qual interfere, de certo modo, com o rendimento da reação.

- Os resultados da reação de glicerólise enzimática realizada em banho ultrassônico, sob agitação mecânica de 600 rpm, 65 °C, razão molar de glicerol para óleo de 2:1, potência de ultrassom de 132 W e 2

horas de reação mostram que sem o uso do catalisador e do surfactante, a reação não apresentou rendimentos aceitáveis de MAG e DAG. Por outro lado, quando a enzima foi utilizada, foram obtidos rendimentos elevados de MAG e DAG, em torno de 50% (m/m) em geral, mesmo sem a adição de surfactante, mostrando assim o papel significante do catalisador.

- Rendimentos similares foram encontrados para todos os surfactantes em estudo, próximos a 50% (m/m) de MAG + DAG, com exceção do surfactante AOT, que apresentou cerca de 38% (m/m) de MAG e DAG.

- As cinéticas das reações foram investigadas em diferentes razões molares de glicerol e óleo de oliva, temperatura e concentrações de enzima em meio ultrassônico. Concentrações apreciáveis de MAG (>16% e 39%, m/m) e DAG (>44% e 19%, m/m) foram obtidas em razão molar de 0,8:1 e 2:1, respectivamente, concentração de enzima baixa (7,5%, m/m) e temperatura muito próxima à temperatura ótima da enzima (70 °C) em 240 min de reação.

Um ponto importante a ser considerado é que a razão molar de glicerol e óleo é um fator altamente seletivo, pois nos experimentos com menor quantidade de glicerol, a formação dos produtos é direcionada para a formação de DAG e nos experimentos com maior quantidade de glicerol, a formação dos produtos está direcionada para a maior síntese de MAG.

## 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

A partir da consecução desta pesquisa e das conclusões delineadas anteriormente, pode-se sugerir, para a continuidade deste trabalho:

- Estudar o reuso da enzima, nas condições otimizadas nas reações de glicerólise, para os diferentes meios testados;
- Quantificar o teor de ácidos graxos livres presentes;
- Avaliar a extração líquido-líquido ou a centrifugação do meio ao final das reações, visando à remoção do glicerol presente no meio reacional, de forma a dosar o teor de mono- e diacilgliceróis em relação ao total de mono-, di-, triacilgliceróis e ácidos graxos livres presentes;
- Avaliar a reação de glicerólise de óleo de oliva utilizando-se outras lipases (comerciais ou não comerciais) como catalisadores;

- Verificar a influência de diferentes concentrações de água no meio reacional no rendimento dos produtos de interesse;
- Avaliar o pH do meio no decorrer da reação e correlacionar com a atividade da enzima; e
- Realizar a separação e purificação de MAG e DAG ao final da glicerólise enzimática.

## **5.2 Produção científica decorrente da consecução desta tese**

### **5.2.1 Artigos completos publicados em periódicos científicos**

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, 2009.

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.

FIAMETTI, K. G.; SYCHOSKI, M. M.; DE CESARO, A.; FURIGO JR., A.; BRETANHA, L. C.; PEREIRA, C. M. P. , TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil.** Ultrasonics Sonochemistry, 18, 981 - 987, 2011.

FIAMETTI, K. G.; USTRA, M. K.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M. L.; FURIGO JR., A.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system.** Ultrasonics Sonochemistry, 19, 440–451, 2012.





## 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***. Microbiological Research, v. 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, v. 38, n. 4, São Paulo, Oct/Dec. 2001.

AOAC. **Triglycerides (by Partition Numbers) in Vegetable Oils**. Liquid Chromatographic Method. Oficial Method, 993.24, 1996.

ARCOS, J.A.; OTERO, C. **Enzyme, medium, and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoylglycerols**. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 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**. 1991. 223f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BABICZ, I. **Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química – EQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

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

BAGWE, R.P.; KANICKY, J.R.; PALLA, B.J.; PATANJALI, P.K.; SHAH, D.O., **Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons**. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., v. 18, p. 77-140, 2001.

BALCÃO, V. M. & MALCATA, F. X. **Lipase catalyzed modification of milkfat.** *Biotechnology Advances*. v.16, n. 2, 309-341, 1998.

BARBOSA, J.C.S.; SERRA, A.A. **Ultrassom: Influência do ultrassom na química.** *Química Nova*, v.15, p. 302-316,1992.

BARON, A.M. **Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais.** 2003. 113 f.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BASTO, C.; SILVA, C. J.; GÜBITZB, G.; CAVACO-PAULO, A. **Stability and decolouration ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, p. 355-362, 2007.

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

BELTRAME, L. T. C. **Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor em efluentes têxteis.** Tese de Doutorado - Departamento de Engenharia Química, UFRN, 2006.

BENAZZI, T., FRANCESCHI, E., CORAZZA, M. L., OLIVEIRA, J. V. and DARIVA, C., **High-pressure multiphase equilibria in the system glycerol + olive oil + propane + AOT,** *Fluid Phase Equilibria*, 244, 128,2006.

BENDER, J.P.; Junges, A.; Franceschi, E.; Corazza, F. C.; Dariva, C.; Oliveira, J.V.; Corazza, M.L.. **High-pressure cloud point data for the system glycerol+ olive oil + n-butane + AOT.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 25, No. 03, pp. 563 - 570, July - September, 2008.

BEVILAQUA, J.V. **Estudo da catálise enzimática em meio orgânico para a produção de protótipo de fármaco antiasmático.** 2005. 131 f.  
Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) - COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

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

BOLDYREV, V.V. **Mechanochemistry and sonochemistry.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 2, n. 2, p. 143-145, 1995.

BORNSCHEUER, U.T. **Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols.** Enzyme and Microbial Technology. v. 17, p. 578-586, 1995.

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

CARVALHO, C.M.L., CABRAL, J.M.S., **Reverse micelles as reaction media for lipases.** Biochimie, v. 82, p. 1063–1085, 2000.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de Lipases Microbianas na Obtenção de Concentrados de Ácidos Graxos Poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

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

CENI, G.C. **Produção enzimática de benzoato de 1-glicerila em diferentes meios reacionais.** 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Bioquímica – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro – RJ, 2010.

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

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.

- CHISTI, Y. **Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity.** Trends in Biotechnology, v. 21, p. 89-93, 2003.
- CHO, K.; HONG, J.; LEE, K. **Monoacylglycerol (MAG)-oleic acid has stronger antioxidant, anti-atherosclerotic, and protein glycation inhibitory activities than MAG-palmitic acid.** J Med. Food 13:99–107, 2010.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils.** Codex Stan, v. 33 – 1981. Revisado em fev. 2003.
- CNPE. **Resolução CNPE nº 6 de 16/9/2009.** Brasília: Conselho Nacional de Política Energética, 2009.
- DAMSTRUP, M.L.; JENSEN, T.; SPARSO, F.V.; KIIL, S.Z.; JENSEN, A.D.; XU, X., **Solvent Optimization for Efficient Enzymatic Monoacylglycerol Production based on a Glycerolysis Reaction.** Journal of American Oil Chemists Society, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.
- DORDICK, J.S. **Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents.** Enzyme Microbiology and Technology, v. 11, p. 194-211, 1989.
- EOM, T.-K.; KONG, C.-S.; BYUN, H.-G.; JUNG, W.-K.; KIM, S.-K. **Lipase catalytic synthesis of diacylglycerol from tuna oil and its antiobesity effect in C57BL/6J mice.** Process Biochemistry, v. 45, n. 5, p. 738-743, 2010.
- ESMELINDRO, A.F.A.; FIAMETTI, K.G.; CENI, G.; CORAZZA, M.L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V. **Lipase-catalyzed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant.** Journal of Supercritical Fluids. Vol. 47, p. 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.
- FELTES, M.M.C., OLIVEIRA, J. V., TREICHEL, H., BLOCK, J. M., OLIVEIRA, D., NINOW, J. L. **Assessment of process parameters on the production of diglycerides rich in omega-3 fatty acids through**

**the enzymatic glycerolysis of fish oil.** Eur Food Res Technol.,231:701–710. 2010.

FELTES, M.M.C., VILLENEUVE, P., BARÉA, B., BAROUH, N., OLIVEIRA, J. V., OLIVEIRA, D., NINOW, J. L. **Enzymatic Production of Monoacylglycerols (MAG) and Diacylglycerols (DAG) from Fish Oil in a Solvent-Free System.** J Am Oil Chem Soc., 2012.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A.C.; BAPTISTA, F.O.; FONSECA, M.M.R. **Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 11, p. 699-711, 2001.

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.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 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.; OLIVEIRA, D.; CORAZZA, M.L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Kinetics of solvent-free lipase catalyzed production of monoacylglycerols from olive oil on aerosol-OT surfactant.** Ind. Eng. Chem. Res., 48 (2), pp 708–712, 2009.

FIAMETTI, K. G.; ROVANI, S.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. **Assessment of variable effects on solvent-free monoacylglycerol enzymatic production in AOT surfactant.** Eur. J. Lipid Sci. Technol., vol. 110, 2008.

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.; WOLF-MACIEL, M. R.; PINTO, G. M. F. **Síntese de Monoglicerídeos e Diglicerídeos através de glicerólise enzimática**. In.: V Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química – EPFEQ – UNICAMP, 2007.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M. F. ; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. BATISTELLA, C. B. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular**. *Química Nova*, Vol. 32, No. 6, 1539-1543, 2009.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PÉREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; de CASTRO, H. F. **Produção de ácidos graxos polinsaturados por via enzimática: revisão dos princípios tecnológicos do processo parte 2: importantes aspectos da alternativa biotecnológica**. *Ciência e Cultura*. v.1, p 50-60, nº1, Novembro, 2006.

FREITAS, L.; CASTRO, M. B. A.; BRUNO, L. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. **Utilização do glicerol residual obtido na produção de biodiesel para a síntese de monoglicerídios via glicerólise enzimática**. XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, 2008.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; REBAI, A.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. **Production of mono-olein by immobilized *Staphilococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 717-23, 2006.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. ***Lipid Biochemistry: An Introduction***; 4<sup>th</sup> 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.

HAMMOND, D. A.; KAREL, M. E KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in supercritical gases**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 11, p. 393, 1985.

HANH, H.D.; DONG, N.T.; OKITSU, K.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. **Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition.** *Renewable Energy*, v. 34, p. 780-783, 2009.

HOLMBERG, K., **Organic and bioorganic reactions in microemulsions.** *Advances in Colloid and Interface Science*, 51, p. 137 – 174, 1994.

JIAN, X., **A study of the microstructure of CTAB/1-butanol/octane/water system by PGSE-NMR, conductivity and cryo-TEM.** *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 191, p. 269-278, 2001.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. **The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production.** *Environmental Progress*, v. 26, p. 338-347, 2007.

KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A., **Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 218–222, 2004.

KAEWTHONG W.; SIRISANSANEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN A. **Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase,** *Process. Biochem.*, 40, 1525 - 1530, 2005.

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. **Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil.** *Food Chem. Toxicol.*, 43, p. 253 – 260, 2005.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P., **Olive Oil: A Review.** *Advances in Food Research*, v. 31, p. 453 - 483, 1987.

KIRK-OTHMER, E. T.. Glycerol. In: *American Society of Chemistry. Encyclopedia of chemical technology.* 5.ed.. New York: John Wiley, 432p, 2007.

KIRKPATRICK, S., GELLAT, C. D. JR., VECCHI, M. P.,  
**Optimisation by simulated annealing.** *Science*, 220, 671 – 680, 1983.

KLIBANOV, A. M. **Why are enzymes less active in organic solvents than in water?** *Trends Biotechnological Science*, v. 15, p. 97-101, 1997.

KORN, M.; ANDRADE, M.V.A.S.; BORGES, S.S. **Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom.** *Revista Analytica*, n. 3, p. 34-39, 2003.

KRÜGER, R.L.; VALÉRIO, A.; BALEN, M.; NINOW, J.L.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D. **Improvement of mono and diacylglycerol production via enzymatic glycerolysis in tert-butanol system.** *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 921–927 921, 2010.

LANGONE, M.; SANT'ANNA, G. L. **Enzymatic synthesis of medium chain triglycerides.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, n. 79, p. 759-770, 2002.

LAWRENCE M.J.; REES G.D., **Microemulsion-based media as a novel drug delivery systems.** *Adv Drug Deliv Rev.* v. 45, p. 89-121, 2000.

LEAL, M.C.M.R.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA Jr., G.L. **Hydrolytic enzymes as adjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.

LERIN, L.; FEITEN, M.C.; RICETTI, A.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M.; OLIVEIRA, J.V.; OESTREICHER, E.G.; OLIVEIRA, D. **Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in ultrasound-assisted system: Process optimization and kinetic evaluation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.18, p. 988-996, 2011.

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

LO, S-K; TAN, C-P; LONG, K; M. S. A., YUSOFF; LAI, O-M.



**Diacylglycerol Oil – Properties, Processes and Products: A Review.** Food Bioprocess Technology.

MAKI, K., DAVIDSON, M., TSUSHIMA, R., MATSUO, N., TOKIMITSU, I., UMPOROWICZ, D., DICKLIN, M.R., FOSTER, G.S., INGRAM, K., ANDERSON, B.D., FROST, S.D., BELL., M. **Consumption of diacylglycerol oil as part of mildly hypocaloric diet enhances loss of body weight and fat compared with a triacylglycerols control oil.** American Journal of Clinical Nutrition. 76 (6), 1230–1236, 2002.

MANIASSO, N., **Ambientes Micelares em Química Analítica.** Química Nova, v. 24, n. 1, 87-93, 2001.

MARANGONI, A. G. *Enzyme Kinetics – A modern approach.* A John Wiley & Sons, INC., publication, New Jersey. p. 90 – 101, 2003.

MARTINEK, K.; LEVASHOV, A. V.; KLYACHKO, N. L.; KHMELNITSKY, Y. L.; BEREZIN, I. V., **Micellar enzymology.** European Journal of Biochemistry, v. 155, p. 453 – 468, 1986.

MARTINEK, K.; BEREZIN, I. V.; KHMELNITSKY, Y. L.; KLYACHKO, N. L.; LEVASHOV, A. V., **Micellar enzymology: Potentialities in applied areas (Biotechnology).** Collection of Czechoslovak Chemical Communications, v. 52, p. 2589 – 2602, 1987.

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

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

MATSUO, N. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods. **Food Science and Technology Research**, v. 10, n. 2, p. 103-110, 2004.

MATSUO, N.; TOKIMITSU, I. **Metabolic characteristics of diacylglycerol.** Inform, v. 12, p. 1098-1102, 2001.

McHUGH, M. e KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.

MENG, X.; ZOU, D.; SHI, Z.; DUAN, Z.; MAO, Z. **Dietary Diacylglycerol Prevents High-Fat Diet-Induced Lipid Accumulation in Rat Liver and Abdominal Adipose Tissue**. *Lipids*, v. 39, n. 1, p. 37-41, 2004.

MESSIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis**. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 623-633, 1999.

MICOV, M.; LUTIŠAN, J.; CVENGROŠ, J. **Balance equations for molecular distillation**. *Separation Science and Technology*, v. 32, n. 18, p. 3051 – 3066, 1997.

MIZUKOSHI, Y.; NAKAMURA, H.; BANDOW, H.; MAEDA, Y.; NAGATA, Y. **Sonolysis of organic liquid: effect of vapour pressure and evaporation rate**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 6, p. 203-209, 1999.

MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. **Lipase catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system**. *Biotechnology Letters*, 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**. *JAACS*, 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. of Supercritical Fluids*, v. 37, p. 417-424, 2006.

MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F. **Production of monoolein from oleic acid and glycerol in supercritical carbon dioxide media: A kinetic approach**. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 44, p. 40-47, 2008.

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

MORITA, O.; KNAPP, J. F.; TAMAKI, Y.; VARSHO, B. J.; STUMP, D. G.; NEMEC, M. D. **Effects of dietary diacylglycerol oil on embryo/fetal development in rats.** Food and Chemical Technology, v. 46, p. 2510-2516, 2008.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel.** Química Nova, v. 32, n. 3, 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.

NDIAYE, P. M. **Equilíbrio de Fases de Óleos Vegetais e de Biodiesel em CO<sub>2</sub>, Propano e n-Butano.** Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 2004.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. **Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações.** Química Nova, v.25 (5): 1-13, 2002.

NOUREDDINI, H.; MEDIKONDURU, V. Glycerolysis of fats and methyl esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 419-425, 1997.

NOVO NORDISK. **Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions.** Technical Report A-05948, 1992.

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.

OLIVEIRA, L. B.; COSTA, A. O., **Biodiesel – Uma Experiência de Desenvolvimento Sustentável.** IX CBE , v. 4, p. 1772, Rio de Janeiro. 2002.

OLIVEIRA, A. L. A.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. **Hidrólise enzimática parcial da gordura de babaçu.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, 270, 1999.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and in SCCO<sub>2</sub>**. Journal of Supercritical Fluids, v. 19, n. 2, p. 141-148, 2001.

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Kinetics of enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 39, n. 12, p. 4450-4454, 2000.

OLIVEIRA de, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, A. M.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ T. P. **Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos**. Química Nova, v. 27 (1), 131-138, 2004.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A. C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids**. Journal of Supercritical Fluids. v. 38, issue 3, p. 373-82, 2006.

OZBEK, B.; ULGEN, K.O. **The stability of enzymes after sonication**. Process Biochemistry, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

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

PLATT, D.; PELLÉD, D.; SHULMAN, A. **Oils enriched with diacylglycerols and phytosterol esters and unit dosage forms thereof for use in therapy**. PUBLICATION, U. S. P. A. EUA. US 2006/0052351 A1 2006.

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

REHOREK, A.; TAUBER, M.; GÜBITZ, G. **Application of power ultrasound for azo dye degradation**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 11, p. 177-182, 2004.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POLING, B. E., **The Properties of Gases and Liquids**. McGraw-Hill Book Company, Fourth Edition, 1987.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; DEBECHE, T.; FOLMER, B.; FAUCONNOT, L.; WATZKE, H. **Lipase catalyzed reactions at different surfaces**. *Langmuir*, v. 22, p. 8169-8177, 2006.

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

ROKHINA, E.V.; LENS, P.; VIRKUTYTE, J. **Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art**. *Trends in Biotechnology*, v. 27, p. 298-306, 2009.

ROSA, C. D. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleo de soja utilizando lipase em propano**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2006.

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

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

SANTOS, F.F.P.; MALVEIRA, J.Q.; CRUZ, M.G.A.; FERNANDES, F.A.N. **Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil**. *Fuel*, v. 89, p. 275-279, 2010.

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

SHAH, S.; GUPTA, M.N. **The effect of ultrasonic pre-treatment on the catalytic activity of lipases in aqueous and non-aqueous media**. *Chemistry Central Journal*, v. 2, p. 1-9, 2008.

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

SONNTAG, N. O. V., **Glycerolysis of Fats and Methyl-Esters – Status, Reviewed and Critique.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 59, 795-802, 1982.

SINISTERRA, J.V. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview.** *Ultrasonics*, v. 30, p. 180-184, 1992.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; KOLISIS, F. N., **Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases.** *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 293 – 318, 1999.

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*, v. 36, p. 379-382, 2001.

TAKEI, A.; TOI, T.; HIDEKA, T.; MORIWAKI, J.; TAKASE, H.; KATSURAGI, Y. **Effects of diacylglycerol-containing mayonnaise on lipid metabolism and body fat in human.** *Journal of Nutrition Food*. 4 (3), 1–13, 2001.

TAKENO N, SHIMOTOYODOME A, MEGURO S. **Inhibitor of increase in postprandial blood insulin**, US Patent 2009/0124691A1, 2009.

TENJARLA, S. **Microemulsions: an overview and pharmaceutical applications.** *Crit. Rev. Ther Drug Carrier Syst*. v. 16, p. 461-521, 1999.

TÜTER, M.; AKSOY, A. A. **Solvent-free of palm and palm kernel oils catalysed by commercial 1,3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and composition of glycerolysis products.** *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 31 – 34, 2000.

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

VALÉRIO, A. **Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes food grade em sistemas livre de solvente.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Engenharia de Alimentos, URI – Campus de Erechim, 2009.

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

VALÉRIO, A.; KRUGER, R.L.; NINOW, J.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; CORAZZA, M.L. **Kinetics of solvent free lipase catalyzed glycerolysis of olive oil in surfactant system.** *J. Agric. Food Chem.*, 57 (18), p. 8350–8356, 2009b.

VALLIYAPPAN, T.; BAKHSHI, N.N.; DALAI, A.K.; **Pyrolysis of glycerol for the production of hydrogen or syn gas.** *Bioresource Technology*, Vol. 99, Issue 10, July 2008, Pages 4476-4483.

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

XU, X. **Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review.** *European Journal of Lipid Science and Technology*. 287-303, 2000.

YAMAMOTO, K., ASAKAWA, H., TOKUNAGA, K., WATANABE, H., MATSUO, N., TOKIMITSU, I., NORIKO, Y. **Long-term ingestion of dietary diacylglycerol lowers serum triacylglycerols in type II diabetic patients with hypertriglyceridemia.** *Journal of Nutrition*. 131, 3204–3207, 2001.

YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X., **Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system.** *Journal of Food Lipids*, v. 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.** Journal of Agriculture Food Chemistry, v. 53, p. 1475-1481, 2005b.

YASUKAWA, T., YASUNAGA, K. **Nutritional functions of dietary diacylglycerols.** Journal of Oil Science. 50 (5), 161–166, 2001.

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

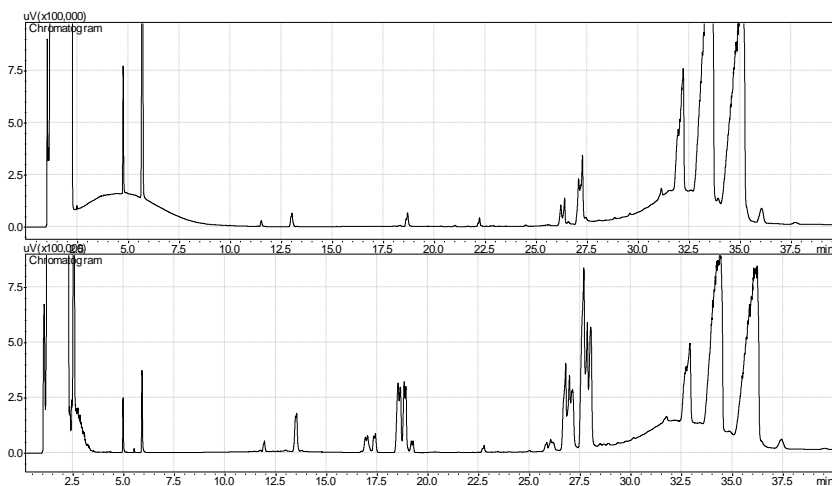
ZHAO, Y.; FENG, R.; SHI, Y.; HU, M. **Sonochemistry in China between 1997 and 2002.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 12, p. 173-181, 2005.



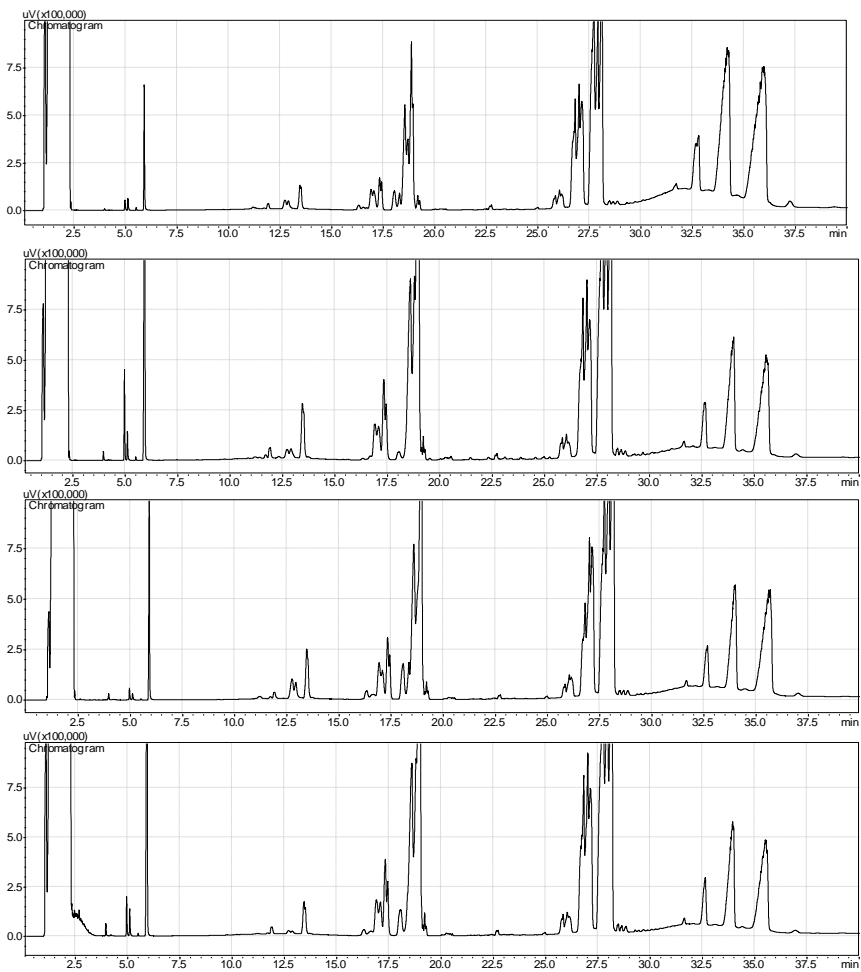
## APÊNDICE A

### 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: 7,5% (m/m) de enzima, 70 °C, relação molar glicerol:óleo de 1:1, ao longo das 6 h de reação. Ao final deste experimento obteve-se em torno de 35% (m/m) de MAG e 25% (m/m) de DAG (resultados em base livre de solvente e glicerol).



**Figura 1A** – Cromatogramas da cinética da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva, 7,5% (m/m) de enzima, 70°C, relação molar glicerol:óleo de 1:1. Tempo de reação: (a) zero; (b) 30 min; (c) 1h; (d) 2h; (e) 4h e (f) 6h. Onde: as áreas entre 4,5 a 6,5 min. correspondem a região de glicerol, de 11 a 14 min. correspondem a região de ácidos graxos livres, de 16 a 20 min. correspondem a região de MAG, de 23 a 28 min. correspondem a região de DAG e de 30 a 36 min. correspondem a região de TAG.



**Figura 1A – Continuação...**

**APÊNDICE B**

**ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS CIENTÍFICOS**





## Enzymatic production of mono- and diglycerides in compressed n-butane and AOT surfactant

Alexandra Valério, Karina G. Flametti, Suzimara Rovani, Elton Franceschi, Marcos L. Corazza, Helen Treichel, Débora de Oliveira, J. Vladimir Oliveira\*

Department of Food Engineering, UFRGS, Campus de Dourados, Av. Sete de Setembro, 662, Dourados 95500-900, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

Article history:  
Received 20 November 2008  
Received in revised form 18 January 2009  
Accepted 1 February 2009

Keywords:  
Glycerides  
Oleic oil  
lipase  
n-butane

### ABSTRACT

This work reports the production of mono- and diglycerides from oleic oil in pressurized n-butane as solvent medium. For this purpose, a commercial immobilized lipase (Novozym 435) was employed as a catalyst and sodium (bis-2-ethyl-hexyl)-sulfosuccinate (Aerosol-OT or AOT) as a surfactant. The experiments were conducted in the batch mode varying the glycerol-to-oil molar ratio, n-butane-to-substrate mass ratio, enzyme concentration, temperature, pressure, and AOT concentration. Results showed that lipase-catalyzed glycerolysis in compressed n-butane might be a potential alternative route to conventional methods, as high contents of reaction products, especially monoacylglycerols (>70wt%), were achieved at mild temperature and pressure with a relatively low solvent-to-substrate mass ratio (4:1:3), short reaction times (2h).

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recently, much attention has been paid to the development of alternative processes for the production of mono- (MAG) and diglycerides (DAG). In contrast to the conventional chemical glycerolysis technique, in which fats and oils are submitted to high temperatures (200–250 °C) in the presence of inorganic alkaline catalysts (e.g. KOH and NaOH), research efforts have been directed to produce MAG and DAG by enzyme-catalyzed reactions. This is because the commercially used method leads to the formation of dark-colored, burnt-tasted products and also due to the fact that chemical catalysis process is energy intensive, provides low yields (30–40%) and there is the need of product post-purification by molecular distillation [1–3].

The interest in MAG arises on their wide utilization in the food industry as emulsifiers for bakery products, margerines, confectionery, and anti-staling agents in bread. In addition, owing to their excellent lubricant, emulsifying and plasticizing properties, MAG are used in textile processing, production of plastics and formulation of oil for different types of machinery [4–7]. One should also notice that the production of MAG from enzymatic glycerolysis has been alleged to offer industrial potential as ingredients of compounds with improved functionality or a healthier nutritional profile [8].

Diglycerides are naturally occurring minor constituents of edible fats and oils, mainly constituted by triacylglycerols and have attracted much attention over the last years due to their several important beneficial properties to human health [9]. Recently, it has been found that DAG, particularly sn-1,3-diglycerols, may have beneficial effects on obesity and lipemia prevention [10,11].

In particular, glycerolysis has been carried out with lipases, in organic medium [4–7], in solvent-free systems [12–14], with free or immobilized enzymes [4–7,12–14], in ionic liquids [15] or using compressed fluids as reaction media [9,9].

Taking into account the limited mutual solubility of glycerol-oil mixtures, the fact that the use of organic solvents may produce various undesirable physicochemical effects on enzyme molecules, and also the high costs associated with solvent removal [2,17], it seems reasonable to consider the use of compressed fluids to conduct enzyme-catalyzed reactions as a promising route to completely eliminate solvent traces from reaction products, bringing many advantages in terms of energy consumption, favorable transport properties, easier recovery of the products, adjustable solvation ability, and minimizing side reactions to prevent the formation of undesired compounds [18–21].

In this field, it has been shown recently that propane may also be convenient to conduct enzyme-catalyzed bioreactions [21–23]. Besides, the use of a surface-active agent with or without compressed fluid has proved to be a potential route to the production of MAG and/or DAG, in the so-called reverse micelle systems, because microemulsions allow both hydrophilic and hydrophobic substances to be dissolved in high concentrations and provide an

\* Corresponding author. Fax: +55 54 2309880.  
E-mail address: vdo@quimica.ufrgs.br (J.V. Oliveira).

enormous interfacial area, which favors lipase-catalyzed reactions [21,24–26].

The present report is part of a broader project aiming at developing new processes for the production of emulsifiers through enzyme-catalyzed glycerolysis reaction [23,29]. Here, the main objective is to investigate the use of compressed *n*-butane as solvent medium for the enzymatic glycerolysis of olive oil using AOT as surfactant for the production of MAG and DAG. Besides the execution of experimental design to produce MAG and DAG, reaction kinetics for both products are also presented.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

The substrates used in the glycerolysis reactions were commercial olive oil (Arisco, Brazil) and glycerol (Merck, 99.5%). A commercial immobilized lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) was purchased from Novozymes (Araucária, PR, Brazil). AOT (sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate, Aerosol-OT or AOT, Sigma-Aldrich, 99%) was used as surfactant and *n*-butane (White Martins S.A., 2,5–99.5 mol% purity) as solvent. Authentic standards of 1-(3-*o*-octadecanoyl)-*sn*-glycerol (Sigma), glycerol-1,2 and 1,3-diglycerol (Sigma) and glycerol trioleate (Sigma-Aldrich) were used for reaction conversion determination. Acetonitrile (99.9%) and acetone (99.8%) were purchased from Merck.

### 2.2. Apparatus and experimental procedure

The experimental apparatus and procedure used for mono- and diglycerides production from olive oil with immobilized lipases in pressurized *n*-butane were presented in a previous, recent, work [21]. Briefly, precise amounts of the substrates (at specified glycerol-to-oil molar ratio, typically 5%), enzyme (by weight of substrates) and AOT (based on the amount of solvent) were weighed on a precision scale balance (Ohaus Analytical Standard) with 0.0001 g accuracy and loaded into the reaction vessel, which was immediately closed and the temperature control (accuracy of 0.5 °C) was turned on. The charge of a known amount of *n*-butane was performed with the help of the syringe pump (resulting accuracy of  $\pm 0.01$  g in *n*-butane loadings) until the pre-established pressure was achieved. With known values of pressure and temperature in the syringe pump reservoir, solvent density was estimated using the HRT (P–V–T) correlation for compressed liquids [30] or taken from experimental literature values [31], making possible to estimate the mass of solvent charged into the reaction vessel. Typically, around 3 minutes were sufficient to feed and pressurize the reactor to the desired value, and once the system pressure had been reached, the agitation was turned on and the reaction time was set to zero, based on the uncertainty in *n*-butane loadings; substrate weighing and predictors in solvent feed, *n*-butane-to-substrate ratio varied approximately 5% of the desired value.

Throughout this work the agitation was kept constant at 600 rpm [21] and, based on the phase behavior of the substrates, olive oil + glycerol, is compressed *n*-butane, the solvent-to-substrate mass ratio was fixed at 4:1 [32]. At the end of the reaction, the immobilized lipase was removed by vacuum filtration and the products were recovered for further analysis. It may be important to emphasize that in all cases, destructive experiments, without sampling, were carried out.

### 2.3. Analytical methods

Quantitative analyses of the products were conducted using a HPLC system from Agilent (1100 Series), with refractive index detector. The following instrumentation and conditions were used:

Zorbax<sub>CL</sub> column (4.6 m  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m), flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 35 °C, detector temperature of 40 °C; the mobile phase, acetonitrile:acetone (1:1, v/v), acetonitrile:acetone (1:1, v/v) was used as a sample dissolving solvent, and the injection volume was 20  $\mu$ L (AOC, 1896). The quantification of reaction products was carried out using authentic standards of MAG, DAG and TAG. The calibration curves were built with the following concentrations: 300, 800, 1000, 2000, 5000, 8000 and 10,000 ppm. The content of reaction products was expressed in terms of the whole amount of MAG, DAG and TAG, as weight percent of the total sample, in surfactant-free basis. All analyses were replicate at least three times. Before injection samples were carefully filtered with slight warming and gentle agitation to avoid phase separation, based on previous works and experience with the system. Investigated, experimental uncertainties are estimated to be less than 5% in terms of MAG, DAG and TAG contents [23,29].

### 2.4. Experimental design

At first, a full experimental design comprising the variables temperature, 30–70 °C; pressure, from 10 to 100 bar; and AOT concentration in the range of 2.5–3.5 wt% (based on the amount of solvent) was executed, keeping fixed the glycerol-to-olive oil molar ratio of 2:1, 7.5 wt% of Novozym 435, and 2 h of reaction [21].

After analyzing the results of the experimental design, reaction kinetics was determined up to 6 h, maintaining the temperature at 70 °C, pressure of 10 bar and AOT concentration of 2.5 wt%, varying the enzyme concentration from 5 to 10 wt% and the glycerol-to-olive oil molar ratio from 2:1 to 10:1. The Software Statistica 6.0 (Statsoft Inc.) was used to assist the design and the statistical analysis of experimental information, adopting in all cases studied a confidence level of 95% ( $\alpha=0.05$ ).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Experimental design

Table 1 presents the results of the experimental design where one can see that high contents of MAG,  $\sim 70$  wt%, with appreciable production of DAG were observed. In 2 h of reaction, which means in some cases almost complete conversion of TAG to products, MAG + DAG,  $\sim 81\%$ , a promising result for possible industrial applications. Statistically strictly speaking, one notices from the Pareto chart shown in Fig. 1 that, considering a confidence level

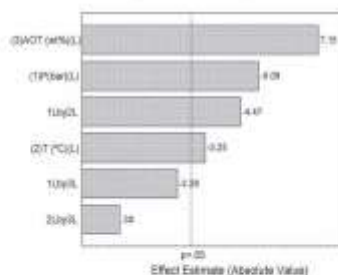


Fig. 1. Pareto chart of the effects of temperature, pressure and AOT concentration on DAG enzymatic production ( $\alpha=0.05$ ). Experimental data and conditions shown in Table 1.

Table 1

Matrix of the first experimental design, showing real and coded values (between parentheses), with response in terms of MAG, DAG, TAG, MAG and DAG contents. Effect of temperature, pressure and AOT in the glycerolysis of olive oil in compressed n-butane. Reaction conditions: glycerol-to-olive oil molar ratio of 2:1, 15 wt% of Novosyn CE, 500 rpm, solvent-to-substrate mass ratio kept constant at 4:1 and 2 h of reaction time.

Run	T (°C)	P (bar)	AOT (wt%)	MAG (wt%)	DAG (wt%)	MAG + DAG (wt%)	TAG (wt%)
1	30 (-1)	10 (-1)	2.5 (-1)	43.9	8.7	52.6	13.5
2	30 (-1)	10 (0)	2.5 (-1)	50.6	9.3	59.8	16.9
3	30 (1)	10 (-1)	2.5 (-1)	43.6	7.4	51.0	18.7
4	30 (1)	10 (0)	2.5 (-1)	38.3	8.2	46.5	14.1
5	30 (-1)	10 (1)	2.5 (1)	38.7	9.4	48.1	14.1
6	30 (-1)	10 (0)	2.5 (1)	40.1	7.7	47.7	13.1
7	30 (1)	10 (-1)	2.5 (1)	37.9	9.4	47.3	14.3
8	30 (1)	10 (0)	2.5 (1)	42.9	7.8	50.7	12.7
9	34 (0)	10 (0)	3 (0)	32.8	4.8	37.6	14.9
10	34 (0)	10 (0)	3 (0)	34.0	6.0	40.0	14.3
11	34 (0)	10 (0)	3 (0)	35.8	7.5	43.3	15.7

of 0.35 ( $p < 0.05$ ), demonstrated by the vertical line, the surfactant had a pronounced positive effect on the production of MAG, indicating that a displacement of the concentration to higher levels would result in an increase in the MAG production. On the other hand, in the investigated range, temperature and pressure presented a negative effect. From this figure, we can also observe that only the cross interaction between temperature and pressure had a significant effect on MAG production ( $p < 0.05$ ). In this figure, 1 means "linear" regression or, in other words, first order relation between response (MAG production) and coefficients of an empirical statistical model. The absolute value in  $t$ -tests is calculated as the estimated effect for each variable divided by the standard error (obtained from the replicates of the central point).

Recently, Tamelindo et al. [21] obtained high contents of MAG (around 60 wt%) in conducting lipase-glycerolysis in compressed propane in the presence of AOT at mild conditions of temperature and pressure. In that case, the authors verified that temperature had a significant negative effect while the system pressure seemed not to influence significantly the reaction conversion. The negligible influence of pressure was explained in that work in terms of two aspects: the homogeneous one-phase system observed for the systems formed by glycerol + olive oil + propane + AOT found for all conditions studied [32] and due to the fact that no significant differences in Novosyn 435 activity were observed when increasing the enzyme in propane [34].

In the temperature and pressure ranges investigated in this work, n-butane behaves like a compressed liquid and thus exhibits small density variations. Also, as noted for propane [21,33], one-phase homogeneous systems were observed for the systems formed by glycerol + olive oil + n-butane + AOT for all conditions investigated here [32]. On the other hand, a positive effect was observed when Novosyn 435 was treated in compressed n-butane in a wide range of temperature (35–75 °C) and pressure (10–250 bar) [34].

### 3.2. Reaction kinetics

The condition that afforded the best MAG conversion in Table 1, 30 °C, 10 bar and 2.5 wt% of AOT concentration, was employed to evaluate the reaction kinetics up to 6 h. Results obtained in this step are presented in Figs. 2 and 3, at varying enzyme concentration and glycerol-to-oil molar ratio, respectively. It can be seen from Fig. 2 that important initial reaction rates (calculated as the slope of the linear part of the curve) are observed with considerable conversions obtained against 2 h of reaction, followed by a nearly asymptotic behavior at larger times. From a practical standpoint, therefore, the reaction might be interrupted to meet economic aspects—small gains after a certain time. Data scattering observed in this figure may be explained in terms of experimental errors associated, and

the fact that deactivative experiments were carried out without sampling, which may be viewed as an important internal consistency test of the results.

It can be observed from Fig. 2a–c that initial reaction rates increase with increasing enzyme concentration, but after 6 h MAG content reaches approximately 48, 68 and 46 wt% for enzyme concentrations of 5, 15 and 10 wt%, respectively. The decrease in MAG and DAG contents when large amounts of enzyme were employed may be explained by a poorer mixing of the reaction, and thereby occurrence of mass-transfer limitations. This result is in agreement with previous reports, showing that an increase in lipase loading above a certain amount may not increase the yield, while might increase the reaction rate, showing that high enzyme concentrations may lead to the formation of aggregates, thus not making the enzyme active site available to the substrates [35,36].

From Fig. 2a–c one can observe that increasing the glycerol-to-olive oil molar ratio from 2:1 to 6:1 and then to 10:1 leads to progressively poor results in terms of MAG and DAG contents. Probably, the decrease verified for MAG and DAG contents at higher glycerol-to-oil ratios is due to the short (insufficient) reaction time combined to the visible adherence of glycerol on the enzyme support, in some extent entrapping the enzyme support, causing mass transfer limitations.

Tam et al. [36] analyzed the effect of glycerol-to-oil molar ratio (4.5:1, 2:1, 1:1, 1:1, 1:1, 1:1 and 4:6:1) in the glycerolysis of sunflower oil at 70 °C, 8 wt% of immobilized enzyme Novosyn 435, 500 rpm and 5 h of reaction, in a solvent-free system, without the use of surfactants. The authors obtained a maximum MAG content of 57 wt% at glycerol-to-oil molar ratio of 9:1. Thus, it seems that the effect of substrate ratio may follow two ways. An increase in glycerol amount beyond the stoichiometric value may favor MAG production through reaction displacement to products formation. On the other hand, a case in glycerol amount will certainly affect the system polarity so as to influence the system stability and homogeneity [36].

Based on the pertinent works available in the literature and results found in the present report, one may conclude that glycerolysis is in fact a complex reaction system, involving, in the present case, glycerol, oil, n-butane as solvent and AOT surfactant. It is believed that the surfactant promotes the reaction to occur in the interface glycerol/oil and as consequence the reaction conversion may be improved. In this case it seems plausible that mesoemulsions contribute to the formation of reverse micelles, with consequent increase of the interfacial area to the substrate to be catalyzed, which would demonstrate the vital role of AOT to provide higher MAG and DAG conversions [21].

In the present work very good conversion values to MAG were reached with olive oil as substrate and Novosyn 435 as catalyst, conducting the reaction at 30 °C, 10 bar, stirring rate of

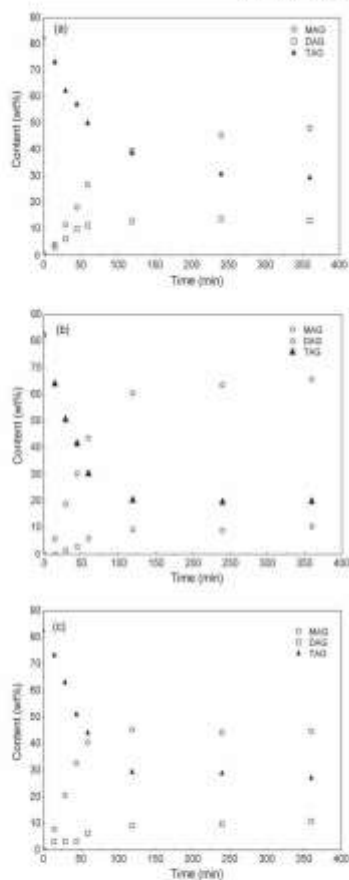


Fig. 2. Effect of enzyme concentration on the kinetics of glycerol production in a butane medium in the presence of ACE. Reaction conditions: (a) 2 wt%, (b) 25 wt%, and (c) 50 wt%. Experimental feed conditions: 30 °C, 10 bar, glycerol-to-oil molar ratio of 2:1, n-butane-to-substrate mass ratio of 4:1, agitation of 600 rpm, and ACE content of 25 wt%. MAG initial reaction rates: 0.33, 0.67, and 0.12  $\text{min}^{-1}$  for 0, 25, and 50 wt% of enzyme content, respectively.

600 rpm, 25 wt% of ACE, 2.5 wt% of enzyme, with n-butane-to-substrate mass ratio of 4:1, and using a glycerol-to-oil molar ratio of 2:1 in 2 h of reaction. Finally, it may be relevant to mention that measurements of enzyme activity [38] before (fresh) and after (used) reaction experiments revealed no important changes

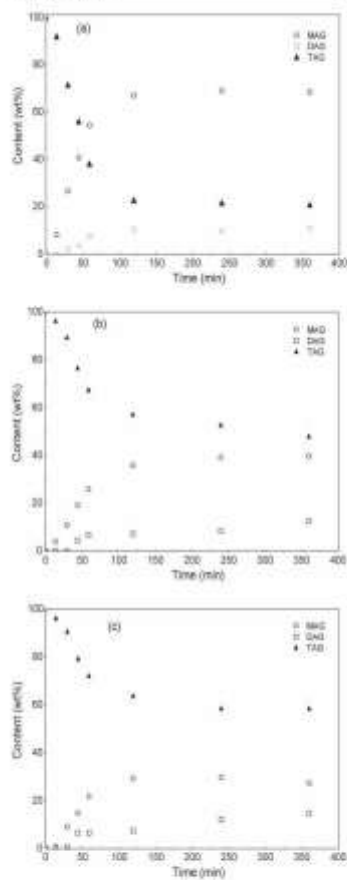


Fig. 3. Kinetics of MAG production at varying glycerol-to-oil molar ratio: (a) 2:1, (b) 1:1 and (c) 0.5:1. Experimental feed conditions: 30 °C, 10 bar, enzyme concentration of 25 wt%, n-butane-to-substrate mass ratio of 4:1, agitation of 600 rpm, and ACE content of 25 wt%. MAG initial reaction rates: 0.67, 0.33 and 0.16  $\text{min}^{-1}$  for glycerol-to-oil molar ratio of 2:1, 0.5:1 and 1:1, respectively. Results of MAG, DAG and TAG contents expressed in surfactant and glycerol free basis.

in residual lipase activity, thus making possible enzyme reuse. Further experiments are underway within our working group, mainly focusing on other types of surfactants and compressed fluids.



#### 4. Conclusions

In this work it was evaluated the effect of process variables on the production of mono- and diacylglycerols from olive oil in compressed n-butane using AOT as surfactant. Results showed that triacylglycerol glycerolysis in pressurized n-butane might be a potential alternative to conventional alkali and enzyme catalyzed reaction in organic solvents, as high conversions were achieved at mild temperature and pressure conditions with a relatively low solvent to substrate molar ratio (<1) in short reaction times (2h).

#### Acknowledgements

The authors thank CAPES/PROACD, CNPq and Intercam Italia for the financial support of this work and scholarships.

#### References

- [1] H. Nourouzi, E.H. Sharkey, M.R. Sarrafian, A continuous process for the glycerolysis of vegetable oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 303.
- [2] R.O. C. Savaris, Chemistry of fats and feeding ruminants: review and update, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58 (1981) 770.
- [3] R. King, *Lipid Technologies and Applications*, Marcel Dekker, New York, 2004.
- [4] M.L. Damstra, J. Robinson, S. Hill, A.D. Jensen, IV, S. Garcia, S. Xu, Evaluation of binary solvent systems for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7113.
- [5] K. Panagoulas, A. Xu, A. H. Ribeiro, Synthesis of monoacylglycerol (MAG) by supercritical CO<sub>2</sub> from ester of methyl esterified lipase, *Food Chem.* 104 (2002) 331.
- [6] J. Ferreira-Dias, A.T. Coimbra, T.O. Baptista, M.M.P. Torres, Optimization of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B: Biotechnol.* 11 (2001) 289.
- [7] M. Kowalski, C. Scharnhaupel, F. Probst, A. B. Kroll, Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm oil in supercritical lipase, *Process Biochem.* 40 (2005) 15–22.
- [8] Y. Yang, M. Roberts, D. England, C. Xu, Enzymatic production of monoacylglycerol containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1475.
- [9] P.M. Mendes, F. Tenreiro, B. Sousa, B.S.A. Cabrita, Kinetic modeling of glycerol hydrolysis at low oil to supercritical carbon dioxide molar ratio: application to olive oil, *Supercrit. Fluids* 27 (2005) 407.
- [10] S. Barana, M. Aoki, T. Wakabayashi, T. Hase, I. Ishikawa, Antibiotic effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice: dietary diacylglycerol attenuates intestinal lipid metabolism, *J. Lipid Res.* 41 (2002) 1112.
- [11] H. Yasuda, T. Onoda, T. Hasegawa, H. Miyata, J. Takahashi, H. Hatanaka, Dietary diacylglycerol suppresses high fat diet-induced hepatic fat accumulation and increases triglyceride transfer protein activity in rat, *J. Biol. Biochem.* 17 (2002) 656.
- [12] H. Yasuda, B. Bhandal, A. Patel, H. Kato, S. Oikawa, Y. Gotoh, Production of mono- and diacylglycerol by supercritical carbon dioxide in a column flow system: optimization by response surface methodology, *Enzyme Microb. Tech.* 35 (2004) 777.
- [13] H. Weber, R.J. Mikolajczyk, Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerol, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3342.
- [14] M. Tani, H.A. Akroy, Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by commercial L<sub>1</sub> lipase lipase from *Hydrophilum* immobilized on porous glycerolipid particles, *Biochim. Biophys. Acta* 22 (2000) 33.
- [15] Z. Guo, X. Mo, Lipase-catalyzed glycerolysis of fat and oil in ionic liquids: a kinetic study on the reaction system, *Chem. Technol.* 31 (2002) 24.
- [16] M.K. Jackson, M. King, Lipase-catalyzed glycerolysis of vegetable oil in supercritical carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 303.
- [17] J.L. Arias, C. Otero, Enzyme, molecular and reaction engineering to design a low cost, selective production method for mono- and diacylglycerols, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 671.
- [18] Z. Guo, H. Hoshino, Compressed gases as alternative enzymatic reaction solvents: a short review, *J. Supercrit. Fluids* 23 (2002) 29.
- [19] K. Kikuchi, S. Matsui, J. Maki, Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 41 (2002) 1526.
- [20] R.C. Joseph, W. Lohrer, *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*, Wiley-VCH, Weinheim, USA, 1998.
- [21] A.M. Trucheteiro, E.G. Hamachi, G. Oishi, M. Okano, H. Teraishi, Y. Okuma, IV, Olive lipase catalyzed production of monoacylglycerols in compressed propane and CO<sub>2</sub>/propane, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2008) 64.
- [22] M. Tabella, Z. Kocz, Kinetics and stability of lipase from different sources in supercritical carbon dioxide and non-supercritical propane, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (2002) 930.
- [23] C. Della Rossa, M.J. Edwards, Jr., J. Russo, C. Datta, G. Okuma, H. Teraishi, Y. Okuma, Lipase-catalyzed production of fatty acid methyl esters from soybean oil in compressed propane, *J. Supercrit. Fluids* 52 (2009) 86.
- [24] C.M.L. Cavallari, J.M.S. Cabral, Reverse micelles as reaction media for lipase, *Biochim. Biophys. Acta* 1582 (2002) 102.
- [25] H. Shimizu, A. Suzuki, H. Kubota, Biocatalytic reaction in microemulsions: the case of lipase, *Biochim. Biophys. Acta* 17 (1999) 293.
- [26] C.F. Singh, D.J. Shah, R. Thibierge, Synthesis of mono- and diacylglycerol in water-in-oil microemulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 585.
- [27] K. Hultberg, E. Gustafsson, Enzymatic preparation of monoacylglycerols in microemulsion, *Surfactant Sci. Technol.* 1 (1991) 1584.
- [28] J.S. Chang, J.S. Kwon, J.I. Kim, Continuous glycerolysis of olive oil by *Candida antarctica* lipase immobilized on lipase in microemulsions, *Biochim. Biophys. Acta* 1591 (2001) 120.
- [29] G.G. Pavanelli, E. Guzman, B. Herrera, M.L. Gonzalez, H. Teraishi, Y. Okuma, Assessment of substrate effects on solvent-free monoacylglycerol enzymatic production in AOT surfactant, *Drug. J. Lipid Sci. Technol.* 110 (2008) 531.
- [30] K.C. Reddy, R.E. Prange, S.E. Peeling, The Properties of Gases and Liquids, 4th ed., McGraw-Hill Book Company, 2007.
- [31] R.H. Sneyd, R.H. Stanton, R.S. Sage, W.M. Leno, Phase equilibria in hydrocarbon systems, *Volumetric Behavior of n-Paraffin, Ind. Eng. Chem. Res.* (1944) 22.
- [32] J.F. Bonini, A. Jansen, E. Hanzowich, E.C. Cerizza, C. Datta, Y.V. Okuma, M.L. Gonzalez, High pressure phase transition for the system glycerol + olive oil + toluene + CO<sub>2</sub>, *J. Chem. Eng. Data* 25 (2000) 501.
- [33] T. Benassi, E. Traversetti, M.L. Gonzalez, Y.V. Okuma, C. Datta, High pressure multiphase equilibria in the system glycerol + olive oil + propane + CO<sub>2</sub>, *Fluid Phase Equilib.* 244 (2006) 176.
- [34] E. Uchida, A.C. Valentini, A.F. Ribeiro, B.H. Souza, C. Datta, Y.V. Okuma, Assessment of new immobilized lipase activity toward compressed fluids, *J. Supercrit. Fluids* 41 (2006) 127.
- [35] T. Watanabe, M. Shimizu, M. Sugan, M. Sato, J. Kubota, M. Yamada, K. Hatakeyama, Optimization of reaction conditions for the production of MAG using immobilized L<sub>1</sub> lipase-specific lipase lipase immobilized on L<sub>1</sub>, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 1201.
- [36] Y. Yang, M. Roberts, D. England, S. Xu, Monoacylglycerol synthesis using compressed glycerolysis using a simple and efficient reaction system, *J. Food Lipid Res.* (2005) 338.

## Low-Pressure Lipase-Catalyzed Production of Mono- and Diglycerides with and Without *n*-Butane and AOT Surfactant

Alexandra Valério · Karina G. Fiametti ·  
Suzimara Rovani · Helen Treichel · Débora de Oliveira ·  
J. Vladimir Oliveira

Received: 5 March 2009 / Accepted: 27 April 2009 /  
Published online: 12 May 2009  
© Humana Press 2009

**Abstract** The aim of this work is to report the production of mono- and diglycerides from olive oil at ambient condition and in pressurized *n*-butane as solvent medium. For this purpose, a commercial immobilized lipase (Novozym 435) was employed as catalyst and sodium (bis-2-ethyl-hexyl) sulfosuccinate (Aerosol-OT or AOT) as surfactant. The experiments were conducted in batch mode varying the temperature, pressure, and AOT concentration. Results showed that lipase-catalyzed glycerolysis either with compressed *n*-butane or in solvent-free system with AOT as surfactant might be a potential alternative route to conventional methods, as high contents of reaction products, especially monoglycerides (~ 60 wt.%), were achieved at mild temperature and pressure with a relatively low solvent to substrates mass ratio (4:1) in short reaction times (2 h).

**Keywords** Glycerolysis · Olive oil · Lipase · AOT · *n*-Butane · Solvent-free system

### Introduction

Over the last 10 years, there has been a growing interest in the development of alternative processes for the production of mono- (MAG) and diglycerides (DAG). The establishment of worldwide biodiesel government programs, with the expected glycerol surplus, together with the well-known drawbacks of the conventional chemical glycerolysis technique [1–3] (energy intensive, provides low yields (30–40%), dark-colored, burn-tasted products, and the need of product post-purification by molecular distillation) have prompted many attempts to produce MAG and DAG by enzyme-catalyzed reactions.

Monoglycerides are widely employed in the food industry as emulsifiers for bakery products, margarines, confectionery, and anti-staling agents in bread. In addition, owing to

A. Valério · K. G. Fiametti · S. Rovani · H. Treichel (✉) · D. de Oliveira · J. Vladimir Oliveira  
Department of Food Engineering, URI-Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim,  
RS 99700-000, Brazil  
e-mail: helen@uri.br

their excellent lubricant, emulsifying, and plasticizing properties, MAG are used in textile processing, production of plastics, and formulation of oil for different types of machinery [4–7]. Also, production of MAG from enzymatic glycerolysis has been alleged to offer industrial potential as ingredients or compounds with improved functionality or a healthier nutritional profile [4, 8].

Diglycerides are naturally occurring minor constituents of edible fats and oils, mainly constituted by triacylglycerols and have attracted much attention over the last years due to their several important beneficial properties to human health [9]. Recently, it has been found that DAG, particularly *sn*-1,3-diacylglycerols, may have beneficial effects on obesity and lipemia prevention [10, 11], despite having a similar energy value and digestibility as known for triacylglycerols.

Glycerolysis of vegetable oils has been conducted with lipases, in organic medium [4–7], in solvent-free systems [12–14], with free or immobilized enzymes [4–7, 12–14], in ionic liquids [15] or using compressed fluids as reaction media [9, 16].

Considering the very limited mutual solubility of glycerol–oil mixtures, the fact that the use of organic solvents may produce various undesirable physicochemical effects on enzyme molecules and also the high costs associated with solvent removal [7, 17], it seems reasonable to consider the use of compressed fluids to conduct enzyme-catalyzed reactions as a promising route to completely eliminate solvent traces from reaction products, bringing many advantages in terms of energy consumption, favorable transport properties, easier recovery of the products, adjustable solvation ability, and minimizing side reactions to prevent the formation of undesired compounds [18–21].

Recently, it has been shown that propane and, due to the low-vapor (saturation) pressure, especially *n*-butane, may also be convenient to conduct enzyme-catalyzed bioconversions [21–24]. Besides, the use of a surface-active agent with or without a compressed fluid has proved to be a potential route to the production of MAG and/or DAG, in the so-called reverse micelle systems, because microemulsions allow both hydrophilic and hydrophobic substances to be dissolved in high concentrations and provide an enormous interfacial area, which favors lipase-catalyzed reactions [21, 24–31].

This work makes part of a broader project aiming at developing new processes for the production of emulsifiers through enzyme-catalyzed glycerolysis reaction [21, 24, 30, 31]. Here, the main objective is to investigate the enzymatic glycerolysis of olive oil for the production of MAG and DAG using AOT as surfactant in low-pressure *n*-butane and at ambient pressure condition.

## Materials and Methods

### Materials

The substrates used in the glycerolysis reactions were commercial olive oil (Arisco, Brazil), Novozym 435 (immobilized lipase obtained by *Candida antarctica*) (Novozymes S.A., Araucária, PR, Brazil), glycerol (Merck, 99.5%), AOT (sodium (bis-2-ethyl-hexyl) sulfosuccinate, Aerosol-OT or AOT, Sigma-Aldrich, 99%) was used as surfactant and *n*-butane (White Martins S.A., 2.5–99.5 mol% purity) as solvent. Authentic standards of 1-(*cis*-9-octadecenoil)-*rac*-glycerol (Sigma), glycerol-1,2 and 1,3-diolate (Sigma) and glyceryl trioleate (Sigma-Aldrich) were used for reaction conversion determination. Acetonitrile (99.9%) and acetone (99.8%) were purchased from Merck.

### Apparatus and Experimental Procedure

The experimental apparatus and procedure used for mono- and diglyceride production from olive oil with immobilized lipases in pressurized *n*-butane was presented in previous, recent, works [21, 24]. Briefly, precise amounts of the substrates (at specified glycerol-to-oil molar ratio, typically 5 g), enzyme (by weight of substrates) and AOT were weighed on a precision scale balance (Ohaus Analytical Standard with 0.0001 g accuracy) and loaded into the reaction vessel, which was immediately closed and the temperature control (accuracy of 0.5 °C) was turned on. The charge of a known amount of *n*-butane was performed with the help of the syringe pump (Isco 260 D, resulting accuracy of  $\pm 0.01$  g in *n*-butane loadings) until the pre-established pressure was achieved. With known values of pressure and temperature in the syringe pump reservoir, solvent density was estimated using the HBT (P-V-T) correlation for compressed liquids [32] or taken from experimental literature values [33], making possible to estimate the mass of solvent charged into the reaction vessel (jacketed 50 mL reactor, Parr, model 48 43). Typically, around 3 min were sufficient to feed and pressurize the reactor to the desired value, and once the system pressure had been reached, the agitation was turned on and the reaction time was set to zero. Based on the uncertainty in *n*-butane loadings, substrates weighing and predictions in solvent feed, *n*-butane-to-substrate ratio varied approximately 5% of the desired value.

With respect to the experiments carried out at room pressure, enzymatic glycerolysis reactions were carried out using 30 g of the substrates in a mechanically stirred (IKA-RW 20 digital stirrer) jacketed flask (60 mL) equipped with a sampling pipette and a PT-100 probe (0.1 °C accuracy) for temperature monitoring—additional details can be found elsewhere [30, 31].

Throughout this work, at room condition, and with pressurized *n*-butane, the agitation was kept constant at 600 rpm and based on the phase behavior of the substrates, olive oil + glycerol, in compressed *n*-butane, the solvent to substrates mass ratio was fixed at 4:1 [21, 24, 30, 31, 34]. At the end of the reaction, the immobilized lipase was removed by vacuum filtration, and the products were recovered for further analysis. It may be important to emphasize that in all cases, at ambient pressure and with pressurized *n*-butane, destructive experiments, considering the whole content of reactor vessel, without sampling, were carried out.

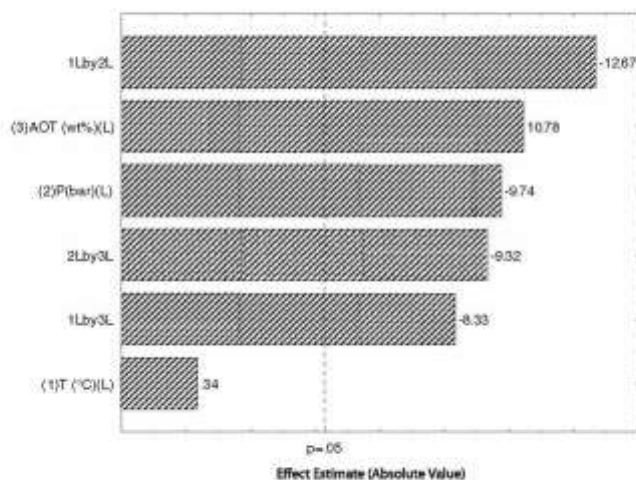
### Analytical Methods

Quantitative analyses of the products were conducted using an HPLC system from Agilent 1100 Series, with refractive index detector. The following instrumentation and conditions were used: Zorbax C<sub>18</sub> column (4.6 m × 250 mm, 5 μm), flow rate of 1.0 mL/min, column temperature of 35 °C; detector temperature of 40 °C; the mobile phase, acetonitrile/acetone (1:1, v/v), acetonitrile/acetone (1:1, v/v) was used as a sample dissolving solvent, and the injection volume was 20 μL. The quantification of reaction products was carried out using authentic standards of MAG, DAG, and TAG. The calibration curves were built with the following concentrations: 300, 800, 1,000, 2,000, 5,000, 8,000, and 10,000 ppm. The content of reaction products was expressed in terms of the whole amount of MAG, DAG, and TAG, as weight percent of the total sample, in surfactant-free basis. All analyzes were replicated at least three times. Before injection, samples were carefully handled with slight warming and gentle agitation to avoid phase separation. Based on previous works and experience with the system investigated, experimental uncertainties are estimated to be less than 5 % in terms of MAG, DAG and TAG contents [21, 24, 30, 31].

**Table 1** Matrix of the first experimental design, showing real and coded (between parenthesis) values, with response in terms of MAG, DAG, TAG, MAG, and DAG contents

Run	T (°C)	P (bar)	AOT (wt.%)	MAG (wt.%)	DAG (wt.%)	MAG + DAG (wt.%)	TAG (wt.%)
1	30 (-1)	1 (-1)	2.5 (-1)	30.6	9.3	39.9	35.5
2	30 (-1)	20 (1)	2.5 (-1)	29.9	13.6	43.5	29.9
3	70 (1)	1 (-1)	2.5 (-1)	37.6	13.8	51.4	31.2
4	70 (1)	20 (1)	2.5 (-1)	37.6	7.8	45.4	17.6
5	30 (-1)	1 (-1)	7.5 (1)	43.3	12.0	55.3	25.1
6	30 (-1)	20 (1)	7.5 (1)	48.9	10.0	58.9	20.6
7	70 (1)	1 (-1)	7.5 (1)	58.3	16.1	74.4	8.5
8	70 (1)	20 (1)	7.5 (1)	20.5	7.2	27.7	48.1
9	50 (0)	10 (0)	5 (0)	42.3	13.9	56.2	17.7
10	50 (0)	10 (0)	5 (0)	40.1	10.3	50.4	16.6
11	50 (0)	10 (0)	5 (0)	40.6	14.7	55.3	17.8

Effect of temperature, pressure and AOT in the glycerolysis of olive oil with (10 and 20 bar) and without (1 bar, ambient pressure) compressed *n*-butane. Reaction condition: glycerol to olive oil molar ratio of 2:1, 7.5 wt.% of Novozym 435, 600 rpm, solvent to substrates mass ratio kept constant at 4:1 (in the case of *n*-butane) and 2 h of reaction time



**Fig. 1** Pareto chart of the effects of temperature, pressure, and AOT concentration on MAG enzymatic production ( $p < 0.05$ ). Experimental data and conditions shown in Table 1

**Table 2** Matrix of the second experimental design, showing real and coded (between parenthesis) values, with response in terms of MAG, DAG, TAG, MAG, and DAG contents

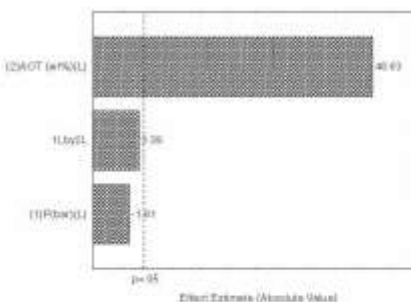
Run	P (bar)	AOT (wt.%)	MAG (wt.%)	DAG (wt.%)	MAG + DAG (wt.%)	TAG (wt.%)
1	1 (-1)	0.1 (-1)	3.3	4.9	8.2	58.9
2	20 (1)	0.1 (-1)	0.0	4.5	4.5	54.8
3	1 (-1)	2.5 (1)	31.7	10.2	41.9	32.5
4	20 (1)	2.5 (1)	32.8	18.0	50.8	32.2
5	10 (0)	1.3 (0)	45.3	20.1	65.4	18.3
6	10 (0)	1.3 (0)	46.3	18.1	64.4	20.3
7	10 (0)	1.3 (0)	45.0	18.0	63.0	19.9

Effect of pressure and AOT in the glycerolysis of olive oil with (10 and 20 bar) and without (1 bar) compressed *n*-butane. Reaction condition: 30 °C, glycerol to olive oil molar ratio of 2:1, 7.5 wt.% of Novozym 435, 600 rpm, solvent to substrates mass ratio kept constant at 4:1 (in the case of *n*-butane) and 2 h of reaction time

observed for some conditions in the first design. As one should expect for this case, AOT concentration had a remarkable positive effect on MAG production (Fig. 2). One should also note from Table 2 that, except for runs 1 and 2, in all other cases, the use of *n*-butane was equivalent or beneficial for the MAG production, thus pointing the importance of minimizing possible mass-transfer restrictions. For these two experimental conditions, one should call attention to the fact that greater experimental errors in TAG content are expected to occur, since phase separation becomes more important and the fact that chromatogram picks also become not so well definite.

Inspection of literature shows that high contents of MAG (around 60 wt.%) were recently found by Esmelindro et al. [21] in conducting lipase-glycerolysis in compressed propane in the presence of AOT at mild conditions of temperature and pressure. In that case, the authors verified a significant negative effect of temperature, while system pressure seemed not to influence significantly the reaction conversion. The negligible influence of pressure was explained in that work in terms of two aspects: the homogeneous one-phase system observed for the systems formed by glycerol + olive oil + propane + AOT found for

**Fig. 2** Pareto chart of the effects of pressure and AOT concentration on MAG enzymatic production ( $p < 0.05$ ). Experimental data and conditions shown in Table 2





all conditions studied [36] and due to the fact that no significant differences in Novozym 435 activity were observed when treating the enzyme in propane [37].

In the temperature and pressure ranges investigated in this work, *n*-butane behaves like a compressed liquid and thus exhibits small density variations. Also, as noted for propane, one-phase homogeneous systems were observed for the systems formed by glycerol + olive oil + *n*-butane + AOT for all conditions investigated here [34]. On the other hand, a positive effect was observed when Novozym 435 was treated in compressed *n*-butane in a wide temperature (35–75 °C) and pressure (10–250 bar) [37].

Taking into account the works available in the literature and results found in the present report, one may conclude that glycerolysis is, in fact, a complex reaction system, involving, in the present case, glycerol, oil, *n*-butane as solvent, and AOT surfactant. It is believed that the surfactant promotes the reaction to occur in the interface glycerol/oil, and as a consequence, the reaction conversion may be improved. In this case, it seems plausible that microemulsions contribute to the formation of reverse micelles, with consequent increase of the interfacial area to the substrate to be catalyzed, which would demonstrate the vital role of AOT to provide higher MAG and DAG conversions. Regarding the use of solvent-free systems, a good discussion on such subject may be found elsewhere [30, 31].

Finally, it may be relevant to mention that measurements of enzyme activity [37] before (fresh) and after (used) reaction experiments revealed no important changes in residual lipase activity, thus making possible enzyme reuse. Further experiments are underway within our working group, mainly focusing on other types of surfactants and compressed fluids.

## Conclusions

In this work, the effect of some process variables on the production of mono- and diacylglycerols from olive oil in compressed *n*-butane and in solvent-free system using AOT as surfactant. Results showed that lipase-catalyzed glycerolysis using AOT surfactant in pressurized *n*-butane might be a promising alternative to conventional alkali and enzyme-catalyzed reaction in organic solvents, as high contents were achieved at mild temperature and pressure conditions with a relatively low solvent to substrates mass ratio (4:1) in short reaction times (2 h).

**Acknowledgements** The authors thank CAPES/PROCAD, CNPq and Intercel Ltda for the financial support of this work and scholarships.

## References

1. Nuzvidini, H., Harkny, D. W., & Gutzman, M. R. (2004). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(4), 203–207. doi:10.1007/s11796-004-0882-y.
2. Szwarc, N. O. V. (1982). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59, 795–802. doi:10.1007/BF02634442.
3. Krog, N. (1997). *Lipid Technologies and applications*. New York: Marcel Dekker.
4. Damstrup, M. L., Abildskov, I., Køl, S., Jensen, A., Flemming, V., & Xu, X. (2006). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7113–7119. doi:10.1021/jf061365t.
5. Pruvost, R., Xu, X., & H-Kittlen, A. (2007). *Food Chemistry*, 104, 251–258. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.036.

6. Ferreira-Dias, S., Correia, A. C., Baptista, F. O., & da Fonseca, M. R. R. (2001). *Journal of Molecular Catalysis B: Biotechnology*, *11*, 699–711. doi:10.1016/S1381-1177(00)0079-5.
7. Kawahara, W., Sirisomsanyakul, S., Prasertan, P., & H-Khilkan, A. (2005). *Process Biochemistry*, *40*, 1525–1530. doi:10.1016/j.procbio.2005.12.002.
8. Yang, T., Rebsdorf, M., Engelrud, U., & Xu, X. (2005). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1475–1481. doi:10.1021/jf0448405g.
9. Moquin, P. H. L., Temelli, F., Sovová, H., & Satriáfa, M. D. A. (2006). *Journal of Supercritical Fluids*, *37*, 417–424. doi:10.1016/j.supflu.2006.01.009.
10. Murase, T., Aoki, M., Wakisaka, T., Hase, T., & Tokimitsu, I. (2002). *Journal of Lipid Research*, *43*, 1312–1319.
11. Taguchi, H., Otsuchi, T., Nagao, T., Matsun, N., Tokinatsu, I., & Nakura, H. (2002). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 678–683. doi:10.1016/S0955-2863(02)00212-7.
12. Ghargui, H., Miled, N., Rebai, A., Karra-chaibouzi, M., & Gargouri, Y. (2006). *Enzyme and Microbial Technology*, *39*, 717–723. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.12.014.
13. Weber, N., & Mukherjee, K. D. (2004). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 5347–5353. doi:10.1021/jf0400819.
14. Tuter, M., & Aksay, H. A. (2000). *Biotechnology Letters*, *22*, 31–34. doi:10.1023/A:1005604406705.
15. Guo, Z., & Xu, X. (2006). *Green Chemistry*, *8*, 54–62. doi:10.1039/b511117j.
16. Jackson, M. A., & King, J. W. (1997). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *77*, 103–106. doi:10.1007/s11746-997-0152-7.
17. Azcos, J. A., & Otero, C. (1996). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76*, 673–682. doi:10.1007/BF02517939.
18. Knez, Z., & Halilun, M. (2002). *Journal of Supercritical Fluids*, *23*, 29–42. doi:10.1016/S0896-8446(01)00138-3.
19. Kumar, R., Madras, S., & Modak, J. (2004). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *43*, 1568–1573. doi:10.1021/ie034052k.
20. Jessup, P. G., & Leitner, W. (1999). *Chemical synthesis using supercritical fluids*. Weinheim, USA: Wiley-VCH.
21. Bandinello, A. F. A., Fiametti, K. G., Cezá, G., Corazza, M. L., Treichel, H., Oliveira, D., et al. (2008). *Journal of Supercritical Fluids*, *47*, 64–69. doi:10.1016/j.supflu.2008.05.004.
22. Halilun, M., & Knez, Z. (2001). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire)*, *76*, 1260–1266. doi:10.1002/jctb.514.
23. Dalla Rosa, C., Morosini, M. B., Ninow, J. L., Dariva, C., Oliveira, D., Treichel, H., et al. (2008). *Journal of Supercritical Fluids*, *47*, 49–53. doi:10.1016/j.supflu.2008.06.004.
24. Valério, A., Fiametti, K. G., Rovani, S., Franceschi, E., Corazza, M. L., Treichel, H., et al. (2009). *Journal of Supercritical Fluids* (on line first) DOI.
25. Carvalho, C. M. L., & Cabral, J. M. S. (2000). *Biochimie*, *82*, 1063–1065. doi:10.1016/S0300-9084(00)01187-1.
26. Stamatia, H., Xenakis, A., & Kolisis, F. N. (1999). *Biotechnology Advances*, *17*, 293–318. doi:10.1016/S0734-9750(99)00007-5.
27. Singh, C. P., Shah, D. O., & Holmberg, K. (1994). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*, 583–587. doi:10.1007/BF02540583.
28. Holmberg, K., & Osterberg, E. (1988). *Surfact Deterg Tech*, *1*, 1544–1548.
29. Chang, P. S., Rhee, J. S., & Kim, J. J. (1991). *Biotechnology and Bioengineering*, *38*, 1159–1165. doi:10.1002/bit.260381097.
30. Fiametti, K. G., Rovani, S., Oliveira, D., Corazza, M. L., Treichel, H., & Oliveira, J. V. (2008). *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*, 510–515. doi:10.1002/ejlt.200700304.
31. Fiametti, K. G., Rovani, S., Oliveira, D., Corazza, M. L., Treichel, H., & Oliveira, J. V. (2009). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *48*, 708–712. doi:10.1021/ie8011956.
32. Reil, R. C., Prauznitz, J. M., & Poling, B. E. (1987). *The Properties of Gases and Liquids*. McGraw-Hill Book Company.
33. Oda, R. H., Beamer, H. H., Sage, B. H., & Lacey, W. N. (1944). *Industrial & Engineering Chemistry*, *36*, 82–88. doi:10.1021/ie50111a022.
34. Bender, J. P., Junges, A., Franceschi, E., Corazza, E., Dariva, C., Oliveira, J. V., et al. (2008). *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *25*, 563–570. doi:10.1590/S0104-66322008000100014.
35. Novo Nordisk (1992). *Characteristics of immobilized lipase in ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions*, Technical Report A-05948.
36. Betancz, T., Franceschi, E., Corazza, M. L., Oliveira, J. V., & Dariva, C. (2006). *Fluid Phase Equilibria*, *244*, 128–136. doi:10.1016/j.fluid.2006.04.005.
37. Oliveira, D., Feilmann, A. C., Rubina, A. F., Kunita, M. H., Dariva, C., & Oliveira, J. V. (2006). *Journal of Supercritical Fluids*, *38*, 373–382. doi:10.1016/j.supflu.2005.12.007.





## Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil

Karina G. Fiametti<sup>a,b</sup>, Melania M. Sychoski<sup>a</sup>, Aline De Cesaro<sup>a</sup>, Agenor Furigo Jr.<sup>b</sup>, Lizandra C. Bretanha<sup>c</sup>, Claudio M.P. Pereira<sup>a</sup>, Helen Treichel<sup>a</sup>, Débora de Oliveira<sup>a</sup>, J. Vladimir Oliveira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Engineering, UNIC – Campus de Itaipava, Av. São do Ipiranga 1421, Itaipava, 13070-906, RS, Brazil

<sup>b</sup>IQG-CIC/UNIC, Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, 88081-900 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química e Geodiversidade, Universidade Federal de Pelotas, 96201-900 Pelotas, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 June 2010

Received in revised form 13 October 2010

Accepted 23 November 2010

Available online 3 December 2010

#### Keywords:

Ultrasound  
Monoacylglycerols  
Diacylglycerols  
Lipase  
Surfactant

### ABSTRACT

This work reports the enzymatic production of mono- and diacylglycerols under the influence of ultrasound irradiation, in a solvent-free system, with and without the presence of surfactants at a constant temperature of 65 °C, glycerol to oil molar ratio of 2:1 and a commercial immobilized lipase (Novozym 435) as catalyst. For this purpose, two operation modes were adopted: the use of a sonotrode (ultrasonic probe), without agitation, varying reaction time, irradiation amplitude (25–45% of the total power) and type of surfactant, and a mechanically stirred reactor (800 rpm) under ultrasound irradiation in a water bath, testing different surfactants. Results show that very satisfactory MAG and DAG yields, above 90 wt%, can be obtained without the use of surfactants, at mild irradiation power supply (<120 W), with an important enzyme activity losses verified, in a relatively short reaction time (2 h), and low enzyme content (7.5 wt% DAG), reaction kinetic results show that contents of MAG + DAG as high as ~65 wt% can be achieved at longer times (6 h), indicating a promising route for producing MAG and DAG using ultrasound irradiation.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Monoacylglycerols (MAG) are nonionic surfactants and emulsifiers containing hydrophilic and hydrophobic parts in molecules with widespread use in food industry, with applications in dairy products, margarine, bakery products and sauces. In addition, due to their excellent lubricant and plasticizing properties, MAG are used in textile processing, production of plastics and formulations of oils for different types of machinery [1–4].

Diacylglycerols (DAG) are esters of glycerol in which two of the hydroxyl groups are esterified with fatty acids (FA). DAG, particularly 1,3-DAG, have been recently claimed to be able to reduce postprandial serum triacylglycerols (TAG) levels, and may have several beneficial effects on human health, such as obesity and lipemia prevention [5–7]. Today, DAG is marketed as functional cooking oil under the brand names “Healthy Extra Cooking Oil” in Japan and “Extra Oil” in the USA [8–10].

Currently, large-scale production of MAG and DAG has been performed by chemical glycerolysis of fats and oils at high temperatures, in the presence of inorganic alkaline catalysts. Because of the high reaction temperature (200–250 °C), dark-colored, burnt

tasted products are formed. Moreover, the chemical catalysis process is energy intensive, provides low yields (30–40%) and there is the need of product post-purification by molecular distillation [11–13].

At this point, it may also be opportune to mention that due to the establishment of world-wide biofuel government programs, huge amounts of glycerol surplus are expected to occur in the near future, which means an unavoidable driving force for the development of new technologies devoted to the transformation of such by-product, e.g. MAG and DAG production, from biodiesel industrial processing.

Lipase-catalyzed systems have been employed to produce MAG and DAG, especially in organic media [1–4], in solvent-free systems [14–16], with free or immobilized enzymes [1–4,14–16], in ionic liquids [17,18] or using compressed fluids as reaction media [5,19]. Enzymatically, MAG and DAG can be produced by direct esterification, glycerolysis, interesterification, partial hydrolysis, or a combination of partial hydrolysis and esterification [15,20,21]. Application of enzymes in the field of MAG and DAG production has attracted great attention due to several attractive features, such as mild reaction conditions, selectivity and “green” reaction systems [10]. In particular, biocatalysis through the use of lipases has become an increasingly important research field in recent years, and has been considered a practical alternative to

\* Corresponding author. Fax: +55 54 3208690.

E-mail address: vladimir@univox.com.br (J.V. Oliveira).

chemical methods in the production of MAG, DAG and free chemicals in the near future [22,23]. Though the main disadvantage of the use of lipases in industrial applications is at present the high cost of enzyme production, recent advances in enzyme technology, such as the use of solvent-tolerant lipases and immobilized lipases – making catalyst re-utilization possible, have allowed for the development of cost-effective systems [24]. To overcome the commonly poor dissolution of both hydrophilic (glycerol) and lipophilic (triglyceride) substrates involved in lipase-catalyzed glycerolysis for MAG and DAG production, surface-active agents have been employed, aimed at the production of MAG and DAG with free [25] or immobilized lipases [2,3,5] in reverse micelle systems [26–30].

Another approach towards improving glycerolysis efficiency would be the use of ultrasonic irradiation, a technique that has been recently identified as an excellent tool for improvement of chemical, physical and biological processes, particularly in highly viscous and immiscible reaction systems [31]. In fact, ultrasound as an environmentally benign method has found many increasing applications in organic chemistry and biochemical engineering/biotechnology [31–40]. The chemical and physical effects of ultrasound arise from cavitation collapse which produces extreme conditions locally and thus induces the formation of chemical species not easily attained under conventional conditions, driving a particular reactivity [31]. When cavitation bubbles collapse near the phase boundary of two immiscible liquids, the resultant shock wave can provide a very efficient stirring/mixing of the layers. As a consequence, cavitation phenomenon can increase reaction rates in heterogeneous reactions and hence may become a useful tool in enzymatic reactions [41,42].

Though the application of ultrasound irradiation to enzymatic reactions is not well explored [43–46], it can be used to reduce mass transfer limitations in enzymatic reactions [41–43], as it is known to perturb weak interactions and to induce conformational changes in protein structures [48,49]. Nevertheless, one should notice that the influence of ultrasound irradiation on enzymatic reactions has been less extensively studied [43,47,50–54], and can be grouped into two main groups. The first approach makes use of ultrasound as an enzymic pretreatment to reduce particle size. This is especially relevant when using enzyme powders to catalyze reactions in organic media [55–57], and in such cases, reduction in particle size and consequent increase in the catalytic surface area are useful to reduce mass transfer limitations. The second approach involves the use of ultrasound throughout the reaction, where the cavitation energy is thought to accelerate the reaction rate. The mechanism by which this occurs is unclear, but perhaps, by increasing the movement of liquid molecules, the substrate access to the active site is increased [50].

While it has been shown that the second approach can accelerate enzymatic reactions [43,47], other reports have demonstrated the occurrence of enzyme inactivation [51–53]. In general, enzymes are known to be more stable in nearly anhydrous organic solvents [55–57], therefore it is not surprising that all reported cases of rate enhancements resulting from ultrasonic treatment are those involving enzymic catalysis in organic media [43,47]. Recently, the enhancement of enzyme activity of Novozym 425 by ultrasound irradiation has been reported in the literature [58].

The performance of ultrasound irradiation in enhancing emulsification of immiscible reaction media was demonstrated in the production of biodiesel by transesterification of triglycerides in homogeneous [59,59–75], heterogeneous catalysis, earth metal oxides and lipases [58,80].

While a relatively abundant number of papers on biodiesel production under sonochemical irradiation can be found in the open literature, there is no corresponding development regarding MAG and/or DAG. In fact, to the best of our knowledge, only one report

on MAG and DAG production through glycerolysis mediated by ultrasound irradiation was found, but using a base-catalyst, in organic solvent medium [10]. Another focused on enzymatic hydrolysis of triglycerides to produce DAG [81].

In this context, this work is aimed to report the production of MAG and DAG through enzymatic glycerolysis of olive oil in solvent-free system under ultrasound irradiation and reflects the efforts of our research group to develop new processes for enzyme-catalyzed glycerolysis [82–88]. Effects of addition of different surfactants, reaction temperature and ultrasonic irradiation modes, namely ultrasonic with and without agitation, on MAG and DAG production were investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The substrates used in glycerolysis reactions were commercial olive oil (Arisco, Brazil), glycerol (Merck, 99.5%) and *n*-hexane (Quintess, 99.5%), which was used for removing and washing the enzymes at the end of each experimental run. The acid value (mg KOH/g) and water content (wt.%) (Karl Fischer titration method, DL 30, Mettler-Toledo) of the olive oil were determined as 0.13 and 0.04, respectively. A commercial immobilized lipase (Novozym 425) from *Candida antarctica* (immobilized on a macroporous anionic resin, 1.4 wt.% water) was purchased from Novozymes (Assacina, PR, Brazil) and presented an enzyme activity of around 55 U/g, determined as the initial rates in esterification reaction between lauric acid and propanol at a molar ratio of 2:1, temperature of 60 °C and enzyme concentration of 5 wt.% in relation to the substrates. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme necessary to consume 1 μmol of lauric acid per minute [90].

Polyoxyethylene surfactant molecule (Tween 85, Fluka), polyoxyethylene glycol sorbitan monoacetate (Tween 85, Fluka), Triton X-100 (sucrose ester, Difeo, purity of 98%, water content lower than 2%) and AOT (sodium [bis-2-ethyl-hexyl] sulfosuccinate, Aerosol-OT or AOT, Sigma-Aldrich, 99%) were used as surfactants. All surfactants, except for Triton X-100, were of analytical grade. These surfactants were chosen based on previous results of MAG and DAG production from enzymatic reactions carried out by our research group [88,89]. For the GC analysis, *n*-heptane, derivatizing MSTA (*N*-methyl-*N*-trimethylsilyliminooxacetamide) and chromatographic standards of glycerol, monoolein, diolein, triolein and oleic acid were purchased from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Experimental procedure

Enzymatic ultrasound-assisted glycerolysis reactions were carried out in two modes, using an ultrasonic bath and a sonotrode. In the first case, mechanically stirred (IKA-RW 20 digital stirrer) Erlenmeyer type flasks (50 mL) were immersed in the chemostatic ultrasonic bath (Ultraso apparatus) (temperature accuracy of ±0.5 °C) and the stirring rate was kept constant for all experimental conditions at 500 rpm [82,84]. The ultrasonic bath was equipped with a transducer having longitudinal vibrations, operating frequency of 37 kHz and a maximum rated power output of 132 W, which was kept at the highest deliver value for all experiments. The ultrasonic transducer (surface area of 282.2 cm<sup>2</sup>) is fixed at the bottom of the bath horizontally along the length of bath. According to Thomaz et al. [38], the advantage of using such a system is that it offers a much larger effective cavitation area as compared to conventional immersion-based acid transducers and hence results in uniform cavitation activity distribution in the ultrasonic bath.

In the case of glycerolysis ultrasound-assisted reaction without agitation, ultrasound irradiation was supplied by a sonotrode (Sonic Vibra-cell, VC 505, 500 W), immersed in a jacketed flask (60 mL), equipped with a PT-100 probe (0.1 °C accuracy) for temperature monitoring. In this case, the ultrasonic amplitude was adjusted to 20% and 30% of the total power, i.e. the ultrasonic power supply produced an electrical output of 100 and 150 W, respectively.

For each reaction system, typically, around 30 g of the substrate (vegetable oil and glycerol) were charged into the reaction vessel, while the amounts of enzyme and surfactant were defined according to pre-established values. Precise amounts of the substrates, enzyme and surfactant were weighed on a precision scale balance (Ohaus Analytical Standard with 0.0001 g accuracy) and loaded into the reaction vessel. The experiments were performed for both reaction systems at 65 °C (at atmospheric pressure), enzyme concentration [E] kept at 7.5 wt.% and surfactant concentration at 10 wt.% (both enzyme and surfactant based on the amount of whole substrate, oil and glycerol), and glycerol to oil molar ratio,  $R$ , at the stoichiometric value, 2:1.

In the first system, mechanical stirring + ultrasound system, the reaction time was set to 2 h. In the second system, ultrasound irradiation without agitation, reaction times were 5, 15 and 25 min.

At the end of the reaction, the immobilized lipase was removed by vacuum filtration and the products were recovered for further analysis. Then, the catalyst was washed twice using 10 mL of *n*-hexane and the sample was vacuum filtered. Afterwards, the enzyme was dried in an oven at 40 °C for 1 h and the recuperated enzyme was kept in a desiccator for 24 h. After this period of time, the enzyme activity was determined. The products were quantified following the methodology described below.

### 2.3. Products and substrate quantification

The analysis of the substrate/products of the reactions was performed in a gas chromatograph (Shimadzu 2010) with automatic on-column injector and flame ionization detector (FID). The column DB-5 [1] and W Scientific, US7162944H, 30 m × 0.25 mm × 0.1 µm) was used. The operational conditions followed the European Standard Committee 14105, with column temperature of 50 °C/min, 15 °C/min until 180 °C, 7 °C/min until 230 °C and 10 °C/min until 380 °C, keeping for 8 min. Detector temperature was 380 °C, hydrogen pressure of 80 kPa and injected volume of 1 µL. Initially, 100 mg of sample was homogenized in a 10 mL flask (10 mg of sample/mL of solvent). Of MSTFA (100 µL) was added and the solution was stirred and kept at room temperature for 15 min. Afterwards, the volume was completed to 10 mL with *n*-heptane. Then, solutions were transferred to sampling flasks and analyzed by the GC-FID. The weight percent of MAG and DAG was calculated taking the concentration values (mg/L) resulting from the chromatographic analysis and performing a straightforward calculation by simply dividing the amount of each component by the whole concentration of the solution injected multiplied by 100. All analyses were replicate at least three times [85].

### 3. Results and discussion

At first, glycerolysis reactions were carried out without agitation, with the sonotrode, varying the irradiation intensity from 25% to 45% of the total power, at a constant temperature of 65 °C and glycerol to oil molar ratio of 2:1. Results are presented in Table 1, where one can notice that the contents of MAG and DAG from the Blank test, without the presence of enzyme and surfactant in the reaction medium, may be considered negligible, hence demonstrating that the glycerolysis reaction in the condition studied may

Table 1

Results of glycerolysis of olive oil under acoustic irradiation (maximum power supply of 500 W) without agitation at constant temperature of 65 °C and glycerol to oil molar ratio of 2:1.

Condition	DAG (wt.%)	MAG (wt.%)	TAG (wt.%)	FFA (wt.%)	SA (L) g <sup>2</sup>
Blank reaction (without enzyme and surfactant)					
250 power 15 min	3.58	4.38	74.69	0.21	–
25% power 20 min	3.47	4.35	73.57	0.35	–
30% power 15 min	4.78	6.53	80.31	0.44	–
40% power 20 min	4.8	6.93	88.85	0.25	–
7.5 wt.% enzyme, without surfactant and 30 min reaction					
25% power	8.11	30.64	51.83	0.63	52.7
30% power	7.01	36.30	56.89	0.33	43.4
35% power	10.74	21.33	48.47	0.28	43.1
40% power	6.75	37.85	54.81	0.34	34.5
7.5 wt.% enzyme, 10 wt.% surfactant, 30% irradiation power					
Times X-300 – 5 min	4.08	10.63	85.31	0.89	47.7
Times X-300 – 15 min	3.86	10.75	87.88	0.85	44.0
Times X-300 – 25 min	4.20	11.41	87.35	0.62	44.0
AUT – 5 min	4.44	6.24	88.76	0.37	33.8
AUT – 15 min	6.94	3.92	71.87	0.31	37.0
AUT – 25 min	10.50	4.87	87.81	0.28	36.2
Times 65 – 5 min 15 min	2.9	7.87	90.78	0.26	38.3
Times 65 – 25 min	4.21	8.81	88.80	0.37	38.0
Times 65 – 5 min 15 min	3.12	2.81	76.88	0.26	34.8
Times 65 – 25 min	3.57	7.88	88.22	0.80	41.2
Times 83 – 25 min	3.54	0.81	88.54	0.67	38.3

\* Initial enzyme activity = 30 U/g.

not be considered as auto-catalytic even under the influence of typical power irradiations supplied to the medium.

However, when the enzyme is added to the medium at the concentration of 7.5 wt.%, more acceptable reaction yields, on the order of 30 wt.% in terms of MAG and DAG, were obtained at 20 min reaction, showing the relevant role of the enzyme in the reaction. Inspection of these results indicates however that there is an increase in enzyme activity loss as the irradiation power is raised, possibly due to the direct contact between enzyme particles and ultrasound probe, which interferes, to a certain extent, with the reaction yield.

In attempt to improve reaction efficiency, surfactant was added to the reaction medium (constant concentration of 10 wt.% by weight of substrate) keeping a fixed enzyme concentration at 7.5 wt.% and irradiation at 30% (150 W) of the total supply, and varying the reaction time. Results for all the four surfactants tested, Triton X-300, AOT, Tween 65 and Tween 85, were nevertheless somewhat disappointing, as yields of MAG + DAG were, in general, lower than 15 wt.%, independent of reaction time. This is a much inferior performance compared to results obtained with the same surfactants in solvent-free system at ambient pressure [83,86,88] or with compressed fluids [87,89], above 50 wt.%. In this case, one should also note that enzyme activity remained around 70% of its original (initial, fresh enzyme) value, so that the surfactant does not seem to play an important role in both enzyme activity and enzymatic reaction.

Results of ultrasound-assisted glycerolysis carried out in flasks in an ultrasonic bath under mechanical agitation at 800 rpm,

Table 2

Results of ultrasound-assisted glycerolysis in ultrasound bath at 400 rpm, 60 °C, 75 wt.% enzyme, glycerol to oil molar ratio of 2:1, ultrasonic power of 132 W and 2 h of reaction.

Condition	DAG (wt.%)	MAG (wt.%)	TAG (wt.%)	FA (wt.%)	DA (%)
Blank reaction	5.11	7.74	67.36	0.21	-
Without surfactant	14.54	18.92	31.24	0.39	47.9
Tween 80	39.04	34.08	25.41	0.54	33.0
AOI	25.06	12.71	43.62	1.88	35.1
Tween 02	35.53	33.78	30.02	1.83	37.8
Tween 80	39.67	34.37	26.94	1.24	68.5

65 °C, glycerol to oil molar ratio of 2:1, ultrasonic power of 132 W and 2 h of reaction are shown in Table 2. One can see from this table that as in the case of sonolysis, the absence of the catalyst and surfactant did not lead to acceptable reaction yields. On the other hand, when the enzyme was used, important MAG and DAG yields were obtained, around 50 wt.% in general, even without surfactant addition, hence showing the significant role of the catalyst. It can also be seen from this table that yields were similar for all surfactants, near 50 wt.%, except for AOI, ~38 wt.%. Results can be considered relevant ones: good products yields can be obtained from the use of ultrasound irradiation, without important enzyme activity losses, thus permitting possible catalytic re-use. Moreover, the fact that even superior results can be obtained without the use of surfactants together with the adoption of a solvent-free system, may open interesting scientific and technological paths for MAG and DAG manufacture, avoiding numerous separation steps without also raising any health and environmental concerns.

Regarding the effect of ultrasound irradiation on enzyme activity, one can see from the results that enzyme activity losses and gains were verified, indicating that a conformational change in the enzyme's support structure probably occurred after ultrasonic treatment. According to current literature, an ultrasound wave, which is a periodic pressure fluctuation, can control the enzyme characteristics by altering its structure in response to a dynamic perturbation [91]. Ultrasound irradiation of ten to several hundred MHz would be able to perturb loop and domain regions of an enzyme and thus affect its activity. This property of ultrasound would allow control over desired enzyme function.

The tolerance of enzymes to ultrasound might depend on the physical location of the enzyme in the cell and on its molecular weight. However, very little is known about the actual effect of ultrasound on enzyme behavior because contradictory results of inactivation and activation of enzymes upon ultrasound treatment have been reported. Unlike traditional heat denaturation, the sonication process does not destroy the active site of an enzyme, and this has been clearly demonstrated for  $\alpha$ -amylase, horse radish peroxidase, lactase and alkaline phosphatase [52,92–94].

However, ultrasound-mediated deactivation of some enzymes, including alkaline phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and trypsin, was observed when high ultrasonic power of 500 W was used (typical power used is 25–150 W) [95]. This was most likely due to the reaction of hydroxyl or hydrogen radicals formed with the protein backbone [93], which in turn could lead to enzyme aggregation, thereby obstructing the active sites while at the same time also decreasing protein stability [53]. Furthermore, shear forces that occur in the fluid during ultrasound irradiation also have a significant role in enzyme inactivation [52].

The overall effect of ultrasound on enzymes will therefore mainly depend on parameters such as energy input and irradiation method [93]. The presence of redox mediators, such as polyvinyl alcohol, malic acid and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABTS), that are able to increase the stability of the

irradiated enzyme [53,94] will also determine the outcome of ultrasound treatment, as well as the type of enzyme [52]. The optimization of these parameters will allow the determination of the threshold conditions for ultrasound irradiation of enzymes so that their activity is not adversely affected.

In this regard, one may also cite the work by Vallon et al. [47] on subtilisin-catalyzed transamidation. In that study, a similar power output was employed (150 W), with the temperature kept constant through the use of a thermostatically-controlled glass reaction vessel. Ultrasonic treatment of subtilisin in phosphate buffer led to inactivation of the enzyme (50% in around 2 h), while no equivalent effect was observed in 1-amyl alcohol (containing 15 wt.% buffer). Sistierra [50] also reported that the ultrasonic inactivation of subtilisin is more pronounced in aqueous media than under biphasic conditions (1-amyl alcohol, 1% phosphate buffer). Another study of interest is that of Čobek and Ulgen [52], who investigated the effect of ultrasound on six enzymes (dehydrogenases, alkaline phosphatase and  $\beta$ -galactosidase) in aqueous buffers. Apart from alkaline phosphatase, all other enzymes showed (variable) inactivation profiles (although ultrasonic treatment was carried out at 5 °C). Higher ultrasonication times or power outputs resulted in greater inactivation. In addition, it was observed that when the viscosity of the medium was increased by the addition of glycerol, an enhancement in enzyme activity was observed by the use of ultrasonic power.

The studies of Ishizumi et al. [95] and Sakakibara et al. [96] reported enhanced reaction rates resulting from the application of ultrasound to enzymatic reactions in aqueous buffers. The first work reported the acceleration of  $\alpha$ -chymotrypsin activity, while the second demonstrated that the activity of amylase was promoted by ultrasound at low substrate concentration. While the  $t_{50\%}$  remained unaltered,  $k_a$  roughly halved upon ultrasonication (i.e. affinity for the substrate increased). Related to this specific subject, experiments are underway by our work to try to elucidate the effect of ultrasound irradiation on enzyme activity behavior.

Although no work was found in the literature regarding the production of MAG and DAG through enzymatic glycerolysis under ultrasound irradiation, one can mention the work by Elicic et al. [81] who described very recently a protocol for the production of diacylglycerols by the partial hydrolysis of soybean oil catalyzed by lipase in an ultrasound water bath, 125 W and frequency of 47 kHz, under mechanical stirring. Better yields (about 40 wt.%) and shorter reaction times (1.5 h) were obtained under sonication as compared to the thermal process. Another work from Zheng et al. [10] reports the production of MAG and DAG from the glycerolysis of soybean oil under mechanical stirring, in the presence of NaOH as catalyst, with and without solvent, under ultrasound water bath irradiation varied in the range 40–100 W and frequency of 25 kHz. DAG formation was not observed in the solvent-free system under any experimental conditions, but when organic solvents were employed, yields as high as 60 wt.% of MAG and DAG were observed.

One can see from these two works the use of similar experimental setup and operating conditions compared to the present work, but in this case a re-soluble catalyst and solvent-free system were adopted. Regarding the production of MAG and DAG in conventional (organic solvent systems), the interested reader may take a look at the works of Fianetti et al. [83], Fianetti et al. [84] and Valério et al. [84–89].

From the results obtained with the application of surfactant-free ultrasound-assisted glycerolysis carried out in flasks in a ultrasonic bath under mechanical agitation, kinetic experiments were performed varying the glycerol to oil molar ratio, keeping fixed the other variables. For this purpose, the kinetic study of the enzymatic glycerolysis was carried out with a batch time of 6 h with samples taken from the bulk reactive system at 15, 30, 45, 60,



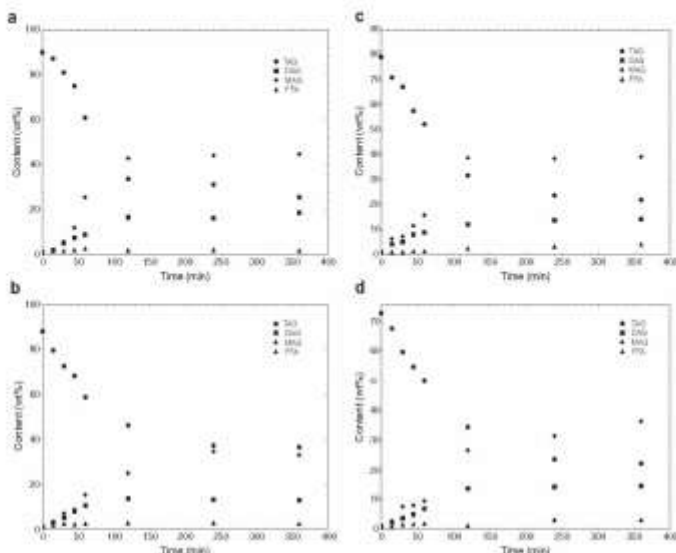


Fig. 3. Kinetics of MAG and DAG production at varying glycerol-to-oil molar ratio: (a) 0.6:1, (b) 1:1, (c) 1.5:1 and (d) 3:1. Experimental conditions: 70 °C, enzyme concentration of 7.5 wt.%, agitation of 600 rpm, ultrasonic power of 132 W, surfactant-free.

120, 240 and 360 min. The reaction kinetic experiments were performed at 70 °C, with immobilized enzyme concentration of 7.5 wt.%, 600 rpm agitation, ultrasonic power of 132 W, surfactant-free, and glycerol to olive oil molar ratio of 0.6:1, 1:1, 2:1 and 3:1.

Results obtained from the kinetic experiments are shown in Fig. 3a–d. One can see from these figures that relatively fast initial reaction rates are observed with considerable conversions obtained up to 2 h of reaction, followed by a nearly asymptotic behavior at longer times. Therefore, from a practical standpoint, the reaction might be interrupted to meet economic aspects – small gains after a certain time.

The stoichiometry of the reaction requires a molar ratio of glycerol to oil of 2:1, but MAG and/or DAG production may be favored by reaction displacement to products formation by increasing the glycerol to oil ratio beyond the stoichiometric value. As mentioned by Yang et al. [57], the effect of the substrate ratio may affect the product yields in two ways. An increase in glycerol amount beyond the stoichiometric value may favor MAG production through reaction displacement to product formation. On the other hand, a raise in glycerol amount will certainly affect the system polarity as it influences the system stability and homogeneity. Besides, Chaitulp et al. [58] when dealing with the glycerolysis of palm olein using immobilized lipase PS, argued that high concentrations of glycerol might lead to an increase in the initial reaction rate of MAG

production and also in the final concentration of monoacylglycerols. Corroin et al. [59] evaluated the effect of glycerol to oil molar ratio (2:1 and 4:1) on the enzymatic glycerolysis of olive oil without solvents at 75 °C and observed that, after 4 h, both reacting systems reached steady levels of MAG concentration and, after 7 h, the excess of glycerol did not affect the product content. In the present case, the experimental kinetic data shows that the excess of glycerol is not so effective at the beginning of the reaction but becomes important after a certain reaction time elapsed. Also, it seems that the suppression of glycerol from the stoichiometric ratio favors DAG production, a reaction intermediate production. One can notice from the kinetic results that contents of MAG + DAG as high as ~63 wt.% were achieved at longer times, thus indicating a promising route for producing these important ingredients using ultrasound irradiation.

#### 4. Conclusion

This work reports for the first time enzyme-catalyzed glycerolysis under the influence of ultrasound irradiation with and without the presence of surfactants, in solvent-free system. Results showed a promising perspective to the use of environmental benign technique to produce MAG and DAG without health concerns and unnecessarily costs associated with solvent separation.

Appreciable reaction yields of MAG and DAG were obtained under mild conditions. Further experiments comprising detailed investigations of glycerolysis reaction kinetics and studies of enzyme behavior in ultrasound systems are underway by our working group.

#### Acknowledgement

The authors dedicate this work in memory of Professor Octavio Augusto Covo Antunes (his wife and little boy), whose lives were prematurely taken away from our existence, on the 447 Air France flight tragedy. Professor Antunes will remain as a reference scientist, an unforgettable friend, an example of courage, always enlightening us with his experience and creativeness.

#### References

- [1] M.L. Donerup, J. Ashblöcher, S. Eibl, D. Jansen, IV Sprays X-30: Evaluation of fatty solvent reactions for efficient monoacylglycerol production by continuous enzymatic glycerolysis, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7113–7116.
- [2] E. Femenias, J. Xu, A. H. Kizilica, Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acid from fish oil with immobilized lipase *AG Food Chem.* 134 (2007) 233–238.
- [3] S. Ferrero-Diaz, A. Corra, F.O. Bagarina, M.M. Bermejo, Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases, *J. Mol. Catal. B: Biocatal.* 11 (2001) 608–614.
- [4] W. Karawang, S. Sarinayarakulchai, F. Phrasorn, A. H. Kizilica, Continuous production of monoacylglycerol by glycerolysis of palm oil with immobilized lipase, *Process Biochem.* 40 (2005) 1523–1530.
- [5] P.H.L. Mogaer, E. Terzafik, H. Steiner, M.D.A. Saldana, Kinetic modeling of glycerolysis-hydrolysis of canola oil in a supercritical carbon dioxide media using equidistant data, *J. Supercrit. Fluids* 31 (2004) 417–424.
- [6] T. Marano, M. Aoki, T. Wakaiwa, T. Hara, J. Terama, Assessment effect of dietary glycerolysis in CTFA oil using dietary monoacylglycerol structure instead lipid emulsifier, *Lipid Res.* 43 (2002) 1110.
- [7] H. Taguchi, T. Onishi, T. Nagai, M. Misao, S. Tsuboiwa, H. Nakano, Dietary monoacylglycerol suppresses high fat diet-induced hepatic fat accumulation and improves triglycerolipid transfer protein activity in rats, *J. Nutrition Biochem.* 13 (2002) 678.
- [8] S.-K. Im, L.-Z. Cheong, H. An, C.-P. Tan, E. Jung, M.A.A. Hamid, G.-M. Lee, Monoacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface optimized for diacylglycerol production by lipase catalyzed esterification in a pilot packed bed reactor, *Food Bioproc. Technol.* 33 (2010) 3585–3595.
- [9] S.-K. Im, C.-P. Tan, E. Jung, M.A.A. Hamid, G.-M. Lee, Diacylglycerol self-purification, processes and products: a review, *Food Bioproc. Technol.* 1 (2008) 224–233.
- [10] H. Zhang, J. Xu, J. Xu, L.-Z. Cheong, X. Zhao, H. Li, Production of diacylglycerols through low temperature supercritical glycerolysis, *Food Chem.* 112 (2008) 280–285.
- [11] H. Nusselder, B.W. Hartley, R.R. Giddens, A continuous process for the glycerolysis of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 281–302.
- [12] W.D. Seitzung, Glycerolysis of fat and methyl ester: status, review and outlook, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56 (1979) 195A–202A.
- [13] H. Kang, *Lipid Technologies and Applications*, Marcel Dekker, New York, USA, 1993.
- [14] H. Chang, M. Miled, M. Kato, Choudhury, S. Gopani, Production of monoacylglycerol by immobilized lipase in a solvent-free system: optimization by response surface methodology, *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 717–723.
- [15] N. Weiss, K.D. Makarewicz, Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerol, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5247–5252.
- [16] H. Yoon, H. Aoki, Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by commercial L3-specific lipase from *Humicola lanuginosa* and comparative glycerolysis kinetics, *Biochem. Lett.* 32 (2001) 31–34.
- [17] Z. Yan, X. Xu, Lipase-catalyzed glycerolysis of fish and oils in toluene: lipase a further study on the reaction system, *Chem. Chem.* 6 (2001) 54–62.
- [18] H. Kubota, T. Gao, B. Corrick, S. Guo, Optimization of enzymatic synthesis of diacylglycerols in binary medium system containing acyl lipids, *Food Chem.* 118 (2005) 889–898.
- [19] H.A. Jackson, 194, Solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 1183–1188.
- [20] L.-Z. Cheong, C.-P. Tan, E. Jung, M.A.A. Hamid, S.-K. Im, D.-M. Lee, Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: optimization using response surface methodology, *Food Chem.* 105 (2007) 3016–3022.
- [21] Z. Gao, S. Guo, Solvent-free production of 1,3-diglyceride of olive: strategy optimization and process design, *Food Chem.* 110 (2007) 1056–1064.
- [22] Z. Kozel, M. Hladik, Compressed gases as alternative enzymatic reaction solvents: a first review, *J. Supercrit. Fluids* 23 (2002) 29–42.
- [23] E. Corra, C. Padoa, S. Seno, The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications, *Chem. Phys. Lipids* 93 (1998) 157–166.
- [24] H. H. Kula, A. Kordik, H. Hahn, Industrial lipid production by transesterification, *Oilseed. J. Biocatal. Bioproc.* 10 (2001) 405–416.
- [25] J.A. Ayres, C. Otero, Lipase: synthesis and reaction engineering to design a solvent-free production method for mono- and diacylglycerols, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 673–682.
- [26] C.M.L. Carralho, D.M.S. Cabral, Reverse micelles as reaction media for lipases, *Biochim. Biophys. Acta* 1563 (2000) 1053–1085.
- [27] H. Saitama, M. Kikuchi, Biocatalytic reactions in microemulsions: the case of lipase, *Biochem. Adv.* 17 (1988) 263–276.
- [28] C.P. Singh, D.D. Shah, K. Hasegawa, Synthesis of mono- and diglycerides in water-in-oil microemulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 203–207.
- [29] E. Holmberg, L. Olsson, Biocatalytic preparation of monoacylglycerols in microemulsions, *Surfactant Science Technology* 1 (1993) 1544–1549.
- [30] P.S. Chang, J.S. Hwang, J.H. Kim, Continuous glycerolysis of olive oil by immobilized lipase on crosslinked anion exchange resin, *Enzyme Microb. Technol.* 30 (2001) 1130–1135.
- [31] H. Grasa, J.L. Luche, The solvothermal approach, *Green Chem.* 1 (1999) 113–120.
- [32] J.L. Lee, J.R. Segler, Ultrasonic-promoted di-olefin reaction: synthesis of carachene 1A, carachene and (4)-limbadiol, *B. J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 1522–1524.
- [33] B. Turk, K. Bulut, M. Turk, G. Sohal, M. Karak, Asymmetric monoacetal formation: microwave photocatalytic polymerization of methacrylate over chitosan catalysis, *Ultrasound Sonochem.* 7 (2000) 131–133.
- [34] T. Mason, Large scale sonochemical processing: apparatus and activity, *Ultrasound Sonochem.* 7 (2000) 343–348.
- [35] T.J. Mason, Sonochemistry and the environment – providing a ‘green’ link between chemistry, physics and engineering, *Ultrasound Sonochem.* 8 (2002) 456–463.
- [36] I. Pérez, L.A. Pinheiro, A.C. Flores, E.H. Quina, C.M.P. Pereira, Homogeneously catalyzed microwave assisted preparation of 3-Tetraacetyl-1,3-bis(4-ethyl-4,5-dihydro-3H-pyrazol-5-yl)urea, *Ultrasound Sonochem.* 9 (2002) 728–731.
- [37] L. Pérez, P.L.C. Martins, G.A. Ribeiro, H.H. Quina, C. Flores, A.C. Flores, D. Venho, C.M.P. Pereira, Ultrasound accelerated synthesis of novel 3,5-dicyclo-4-dihydro-1H-pyrazole 1-yl-urea-derivatives, *Ultrasound Sonochem.* 17 (2010) 84–87.
- [38] V.G. Dehghani, F.R. Gogaji, A.S. Faridi, Ultrasound assisted synthesis of poly(ester) from palm fatty acid and diols, *Ultrasound Sonochem.* 16 (2009) 362–370.
- [39] P.R. Sanyal, J.M. Kalish, A review of applications of cavitation in biochemical engineering/Biootechnology, *Biochem. Eng. J.* 34 (2005) 69–72.
- [40] E.V. Koldina, P. Ivin, V. Kargin, Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 288–306.
- [41] V.G. Yachemov, J.J. Barford, A.H. Corbett, Use of ultrasonic energy for identification of the pre-polymerization of polyurea, *Ultrasound* 42 (1994) 87–91.
- [42] C. Li, M. Yoshimizu, H. Ogura, N. Tsuboiwa, K. Fukunaga, E. Nakai, Effect of ultrasonic intensity and reaction time on kinetics of enzymatic esterification of carboxylic waste paper in continuously stirred tank reactor, *Ultrasound Sonochem.* 12 (2005) 133–146.
- [43] G. Im, H. Li, Ultrasound promoted lipase-catalyzed reaction, *Biochim. Biophys. Acta* 36 (1993) 0901–0908.
- [44] C.M.L. Carralho, D.N. Passaroto, E.L.S. Bertelli, Ultrasound in enzymatic transesterification of vinyl 1-hydroxy-3-phenylpropanoate, *Synthet. Lett.* 42 (2001) 6477–6479.
- [45] E.C.S. Bertelli, J.M. Ferrando, Sonochemical synthesis of 1,2-alkandiol with vinyl acetate, catalyzed by lipase *Annu. Rev. Teratol. Biophys. Membr.* 34 (2005) 1223–1228.
- [46] Y. Sato, Q. Wu, Y. Gu, X. Liu, Ultrasound accelerated enzymatic synthesis of sugar ester in nonaqueous solution, *Catalysis Lett.* 340 (2002) 209–210.
- [47] E.S. Vilkov, B.A. Sanyal, B.K. Liu, Enhancement of catalytic catalyzed transesterification in organic solvents by ultrasound irradiation, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1991) 103–106.
- [48] E. Engelmann, E.A. Gullerud, D.M. Jensen, O.M. Johnson, S.K. Challa, F. Davis, Low intensity ultrasonic effects on yeast fermentation, *Biolet. Environ. Bioproc.* 29 (1995) 47–50.
- [49] L. Gorbak, J.L. Gekko, The effect of ultrasonic on free enzyme in aqueous solution, *J. Enzyme Microb. Technol.* 12 (1997) 133–140.
- [50] J.M. Sotomayor, Application of ultrasound to biotechnology: an overview, *Ultrasound Sonochem.* 10 (2003) 1017–1020.
- [51] E. Hwang, K.A. Shewring, B.J. Douglas, Reducing the environmental impact of enzyme dispersion in organic solvents: in situ kinetic inhibition, *Enzyme Microb. Technol.* 22 (1998) 140–151.
- [52] B. Terzik, K.S. Çigir, The stability of enzymes after cavitation, *Process Biochem.* 35 (2000) 1127–1130.
- [53] Z.M. Tang, M.G. Wan, S.P. Wang, J.Q. Wang, Effect of ultrasound and additive on the function and structure of tyrosinase, *Ultrasound Sonochem.* 11 (2004) 389–404.
- [54] X. Hladik, M.M. Gupta, The effect of ultrasound pre-treatment on the catalytic activity of lipase in aqueous and non-aqueous media, *Chem. Commun. J.* 2 (2000) 1–3.

- [52] H.K. Gupta, *Alkyne Reaction in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, 2001, pp. 25–32.
- [53] M.H. Gupta, *Methods in Heterogeneous Catalysis*, Weinheim Verlag, Berlin, 2000.
- [54] J. Halling, *Alkyne conversion to organic and other low value products*, in: E. Torres, M. Wellman (Eds.), *Organic Catalysts in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, pp. 256–285.
- [55] H. Yu, L. Fan, H. Wu, L. Wang, Y. Wang, D. Ma, S. Tang, Ultrasonic irradiation with ultrasound for biodiesel production from rapeseed oil by Novozym 435, *Process Biochem.* 45 (2010) 519–525.
- [56] C. Sannarath, M. Veenara, K. Nishimura, Y. Ikeda, Fatty acid methyl ester can be vegetable oil by means of chemical energy, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 303–312.
- [57] C. Sannarath, M. Veenara, Y. Ikeda, Ultrasonic assisted esterification of vegetable oils, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 483–492.
- [58] C. Sannarath, M. Veenara, Y. Ikeda, Effect of ultrasonically assisted esterification of various vegetable oils with methanol, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 880–886.
- [59] C. Sannarath, M. Veenara, Y. Ikeda, H. Bandow, Ultrasonically driven catalytic process for synthesis of transmethanol, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 411–417.
- [60] H.G. Stein, A.C. Hernandez, C.S. Pappas, P.A. Barakat, H.G. Polanco, Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy, *JACS* 131 (2009) 55–57.
- [61] S. Rodriguez, L.C. Hernandez, E.F. Santos, M.G.A. Cruz, F.A.N. Fernandes, Optimization of the production of methyl ester by ultrasonic assisted reaction of rapeseed oil and ethanol, *Adv. J. Chem. Eng.* 18 (2009) 391–396.
- [62] E.P. Santos, J.B.L. Henri, S. Rodriguez, F.A.N. Fernandes, Optimization of the production of methyl ester from rapeseed seeds oil applying ultrasound technology, *Energy Fuels* 23 (2009) 4179–4183.
- [63] E.P. Santos, J.B.L. Henri, S. Rodriguez, F.A.N. Fernandes, Optimization of the production of biodiesel from rapeseed oil by ultrasonic assisted methanolysis, *Ind. Polym. Technol.* 10 (2009) 512–516.
- [64] N.N. Mahapatra, T.G. Adhary, *In situ* transform infrared spectroscopy (FTIR) method to monitor the biodiesel acid response of the transesterification reaction, *proceedings, 10th World Biofuels and Biodiesel Conference*, vol. 1, Energy Fuels 21 (2009) 3772–3782.
- [65] H.D. Hanh, S.C. Ong, S. Okoro, S. Mutha, R. Nishizawa, Test comparison dependence of transesterification of tallow and low frequency ultrasound irradiation condition, *Japan. J. Appl. Phys.* 46 (2007) 4771–4774.
- [66] H.D. Hanh, S.C. Ong, C. Sannarath, S. Okoro, Y. Ikeda, S. Mutha, Mechanism of tallow by low frequency ultrasound irradiation, *Energy Conversion Manage.* 49 (2008) 279–285.
- [67] H.D. Hanh, S.C. Ong, E. Okoro, S. Mutha, R. Nishizawa, Y. Ikeda, Biodiesel production through transesterification of tallow with various alcohols in an ultrasonic bath, *Process. Energy* 34 (2009) 796–798.
- [68] H.D. Hanh, S.C. Ong, S. Okoro, S. Mutha, R. Nishizawa, Y. Ikeda, Biodiesel production by esterification of oleic acid with short-chain alcohols under ultrasonic irradiation condition, *Energy* 34 (2009) 790–795.
- [69] S. Okoro, C. Sannarath, E. Okoro, C.F. Song, Fast, easy transesterification of coconut oil for biodiesel production assisted by ultrasonication, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 285–289.
- [70] D. Kozul, G. Horac, *Process. Energy* 34 (2009) 279–285.
- [71] M.N. Mahapatra, Y.S. Adhary, Optimization of the synthesis of biodiesel via ultrasonic enhanced base-catalyzed transesterification of soybean oil using a methylolpropyl ammonium resin, *Energy Fuels* 21 (2007) 4797–4798.
- [72] C. Pedro, M. Ojeda, S. Miermay, G. Galindo, G. Gonzalez, A new pilot scale reactor for high intensity ultrasonic irradiation, application to the synthesis of biodiesel, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 589–593.
- [73] S.M. Singh, P.K. Gupta, V.K. Rishbeth, Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using ultrasonic irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 617–623.
- [74] F. Wu, Y. Tang, J.S. Guo, X. Gu, Bio Ethanol of ultrasonic-assisted in alkyne ester in biodiesel synthesis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 437–444.
- [75] Y. Zhang, M. Anandakrishnan, M. Hoss, Rapid transesterification of soybean oil with glass catalyst catalysts, *Appl. Catal. A: General* 344 (2008) 136–144.
- [76] M.A. Jochim, P.R. Lopez, A.R. Pardo, Biodiesel production by esterification of acids for synthesis of biodiesel using acoustic and hydrodynamic cavitation, *Ultrason. Sonochem.* 15 (2008) 148–154.
- [77] H. Mousavi, S. Kademian, S. Shari, A.Z. Jafarideh, Ultrasonic-assisted biodiesel production from palm oil using alkaline earth metal oxides as the heterogeneous catalysts, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 2008 (2008) 1333.
- [78] H. Mousavi, S.C.P. Lorie, R.M.A. Saeed, D.A.C. Antunes, Ultrasound-assisted diacylglycerol production under noncatalytic conditions, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 4–8.
- [79] A.A. Karamkhan, K.C. Hameri, C. Cruz, M.L. Cornejo, H. Trinkel, D. Okoro, J.V. Oliveira, Ultrasound-assisted production of monoacylglycerols in compressed propane and *n*-butyl sulfonate, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2008) 64–69.
- [80] K.G. Hameri, S. Savaei, S. Okoro, M.L. Cornejo, H. Trinkel, J.V. Oliveira, Assessment of variable effects on ultrasonic monoacylglycerol synthesis production in *n*-butyl sulfonate, *Environ. Sci. Technol.* 190 (2008) 239–245.
- [81] K.G. Hameri, S. Savaei, S. Okoro, M.L. Cornejo, H. Trinkel, J.V. Oliveira, Kinetics of solvent-free liquid-liquid production of monoacylglycerols from oleic acid and *n*-butyl sulfonate, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 1728–1732.
- [82] R.L. Kojer, A. Walker, M. Suter, L.J. Neves, J.V. Oliveira, M.L. Cornejo, Improvement of mono and diacylglycerol production via ultrasonic glycerolysis of sunflower oil, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (2009) 204–210.
- [83] A. Valério, K.G. Hameri, S. Savaei, H. Trinkel, D. Okoro, J.V. Oliveira, Sono-assisted liquid-liquid production of mono and diglycerides with and without *n*-butyl sulfonate, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 140 (2010) 1709–1716.
- [84] A. Valério, K.G. Hameri, S. Savaei, L. Faramak, M.L. Cornejo, H. Trinkel, D. Okoro, J.V. Oliveira, Kinetics of production of mono- and diglycerides in compressed *n*-butane and *n*-butyl sulfonate, *J. Supercrit. Fluids* 48 (2009) 204–210.
- [85] A. Valério, K.G. Hameri, S. Savaei, H. Trinkel, D. Okoro, J.V. Oliveira, Sono-assisted liquid-liquid production of mono and diglycerides with and without *n*-butane and *n*-butyl sulfonate, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 140 (2010) 1709–1716.
- [86] A. Valério, S. Savaei, H. Trinkel, D. Okoro, J.V. Oliveira, Optimization of mono and diacylglycerol production from soybean glycerolysis in solvent-free systems, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 140 (2010) 1699–1707.
- [87] D. Okoro, A.C. Pedraza, A.P. Rocha, M.H. Costa, C. Garcia, J.V. Oliveira, Assessment of two ultrasonic liquid-liquid systems to compressed *n*-butane, *J. Supercrit. Fluids* 48 (2009) 173–182.
- [88] Y. Hoshino, T. Kawahara, Y. Okahara, Effect of ultrasound on DNA polymerase reaction monitoring on a 27-MHz quartz crystal microbalance, *Bioacoustics* 17 (2006) 643–645.
- [89] A. Boller, M. Tacke, S. Glinz, Application of power ultrasound in an ether transesterification, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 777–783.
- [90] C. Basso, C.J. Silva, C. Colaco, A. Gomes, Pulse duration and distribution of duty of ultrasonic waves in liquid ultrasonic foams, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 393–395.
- [91] M.M. Taha, G.M. Gilmer, A. Boller, Synthesis of *n*-butyl acetate by catalytic processes – kinetic and ultrasonic treatment, *Bioacoust. Technol.* 8 (2005) 4211–4220.
- [92] Y. Hoshino, J. Kuroki, S. Suzuki, Evaluation of immobilized  $\alpha$ -chymotrypsin activity with ultrasonic irradiation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 202–209.
- [93] M. Sakahama, B. Wang, R. Takahashi, R. Takahashi, S. Matsushima, et al., Effect of ultrasonic irradiation on hydrolysis of fructose catalyzed by invertase, *Enzym. Microb. Technol.* 19 (1996) 444–448.
- [94] Y. Yang, M. Ishikawa, J. Ishigaki, S. Xu, Sonoacoustic synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system, *J. Food Lipid.* 17 (2010) 209–212.
- [95] B. Ghoreilly, W. Farooq, S. H. Khatib, Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase, *Biochem. Eng. J.* 35 (2007) 71–80.
- [96] A. Cornejo, M. Martinez, P. Arred, Structure of olive oil and glycerol ester transesterified lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 427–440.



Contents lists available at ScienceDirect

## Ultrasonics Sonochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultsonch



## Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system

Karina G. Fiametti<sup>A,C</sup>, Mara K. Ustra<sup>A</sup>, Débora de Oliveira<sup>A</sup>, Marcos L. Corazza<sup>B</sup>, Agenor Furigo Jr.<sup>C</sup>, J. Vladimir Oliveira<sup>A,\*</sup><sup>A</sup> Department of Food Engineering, UNB – Campus de Brasília, Av. João de Seixas, 3621, Brasília, 70190-400, BR, Brazil<sup>B</sup> Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná (UFPR), 81530-900 Curitiba, PR, Brazil<sup>C</sup> Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), 88080-500 Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 August 2011

Received in revised form 13 September

2011

Accepted 25 September 2011

Available online 21 September 2011

## Keywords:

Ultrasound

Lipase-catalyzed

Glycerolysis

Lipase

Olive oil

## ABSTRACT

This work reports experimental kinetic data of solvent-free glycerolysis of olive oil using a commercial immobilized lipase (Novozym 435) under the influence of ultrasound irradiation. The experiments were performed in a mechanically stirred reactor under ultrasound irradiation, evaluating the effects of temperature (50–70 °C), enzyme concentration (2.5–10 wt%) and glycerol to oil molar ratio (0.8:1–3:1). Results show that ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis might be a potential alternative route to conventional methods, as high contents of reaction products, especially monoacylglycerols, were achieved at mild irradiation power supply (~110 W) and temperature, in a relatively short reaction time (2 h) and low enzyme content (7.5 wt%). To complement, two simplified kinetic modeling approaches, based on the ordered-sequential fit mechanism and reaction stoichiometry, were employed to represent the experimental data, thus allowing a better understanding of the reaction kinetics.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nowadays, much attention has been paid to the development of alternative processes for the production of mono- (MAG) and diacylglycerols (DAG) due to their widespread use in food industry [1,2]. MAG and DAG are readily biodegradable and generally recognized as safe (GRAS) [3]. Furthermore, DAG oil has beneficial effects on the prevention and management of obesity compared with triacylglycerols (TAG), the main components of edible oils. Consumption of DAG has also been shown to reduce accumulation of visceral abdominal fat [4–6]. It has been suggested that the beneficial health effects of DAG are due to differences in the digestion and absorption of TAG and DAG [7].

In contrast to the conventional chemical glycerolysis technique, in which fats and oils are submitted to high temperatures (200–250 °C) in the presence of inorganic alkaline catalysts (e.g. KOH and NaOH), research efforts have been directed toward producing MAG and DAG using enzyme-catalyzed reactions [8].

At this point, it may also be opportune to mention that with the establishments of government biodiesel programs worldwide, huge amounts of glycerol surplus are expected to occur in the near future, which will represent an important driving force for the

development of new technologies devoted to the transformation of such by-product from biodiesel industrial processing.

Glycerolysis through lipase-catalyzed synthesis has been carried out in organic medium [1,2], in solvent-free systems [9], with free or immobilized enzymes [1,5], in ionic liquids [10,11] or using compressed fluids as reaction media [12,13]. Enzymatically, MAG and DAG can be produced by direct esterification, glycerolysis, aminotransferase, partial hydrolysis, or a combination of partial hydrolysis and esterification [14,15].

Application of enzymes in the field of MAG and DAG production has attracted great attention due to several attractive features, such as mild reaction conditions, selectivity and “green” reaction systems [16]. Today, the main disadvantage of the use of lipases in industrial applications has been alleged to be the high cost of enzyme production, but recent advances in enzyme technology and the possibility of catalyst re-utilization have allowed for the development of cost-effective systems.

The use of ultrasonic irradiation has been recently identified as an excellent tool for improvement of chemical, physical and biological processes, particularly in highly viscous and immiscible reaction systems [16]. Moreover, such technique has been pointed as an environmentally benign method and has found many interesting applications in organic chemistry and biochemical engineering/biotechnology [17,18]. It has been found that the interesting chemical and physical effects of ultrasound arising

\* Corresponding author. Tel.: +55 54 33399980.

E-mail address: vladimir@unb.br (J. Vladimir Oliveira).



Table 1

Experimental conditions employed in the kinetic ultrasonic-assisted glycerolysis experiments of olive oil using lipasepsin 415 as catalyst and initial reaction rates of MAG and DAG.

Experiment	T [°C]	[S] (wt%)	G:O molar ratio (glycol/glycerol)	Initial reaction rate (min <sup>-1</sup> )	
				MAG	DAG
1	50	2.5	8:0.1	0.046	0.073
2	50	2.5	1:1	0.062	0.148
3	50	2.5	2:1	0.106	0.144
4	50	2.5	3:1	0.086	0.123
5	50	2.5	8:0.1	0.026	0.112
6	50	7.5	1:1	0.236	0.238
7	50	7.5	2:1	0.245	0.158
8	50	7.5	3:1	0.140	0.177
9	50	10	8:0.1	0.248	0.123
10	50	10	1:1	0.137	0.143
11	50	10	2:1	0.230	0.081
12	50	10	3:1	0.167	0.107
13	50	7.5	2:1	0.054	0.013
14	60	10	8:0.1	0.080	0.101
15	60	10	1:1	0.111	0.118
16	60	10	2:1	0.081	0.078
17	60	2.5	2:1	0.106	0.068
18	60	7.5	2:1	0.108	0.127
19	60	10	8:0.1	0.100	0.148
20	60	10	1:1	0.171	0.243
21	60	10	2:1	0.171	0.144
22	60	10	3:1	0.106	0.089

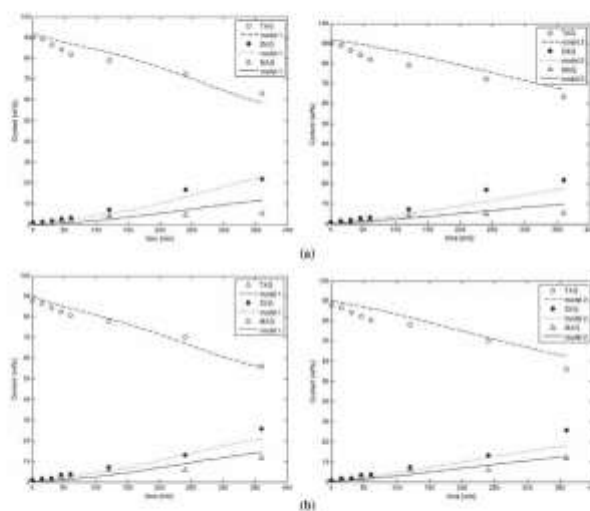


Fig. 3. Experimental data and kinetic modeling results for the ultrasonic glycerolysis of olive oil at 70°C, agitation of 600 rpm, ultrasonic power of 130 W in solvent-free system. Experimental conditions: enzyme concentration of 2.5 wt% and glycerol: oil molar ratio of (a) 8:0.1, (b) 1:1, (c) 2:1 and (d) 3:1.

from cavitation collapse may increase reaction rates in heterogeneous or partially-miscible substrates (which is the case of glycerol

and a triglyceride) reactions and hence may become a useful tool to reduce mass transfer limitations in enzymatic reactions

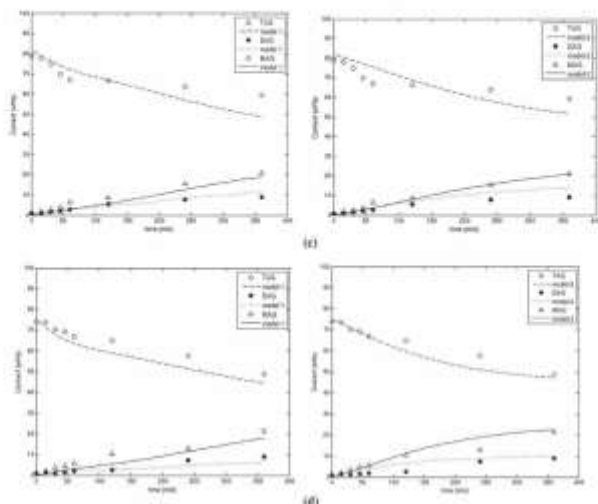


Fig. 1 (continued).

[19,20], though the influence of ultrasound irradiation on enzymatic reactions is currently the object of controversy in the literature [21,22].

Literature is relatively vast on the production of biodiesel via ultrasound irradiation (e.g., [23–28]), but just few reports on MAC and DAG production through glycerolysis mediated by sonochemical irradiation have been found [16,29,30], only one covering a kinetic experiment of enzymatic glycerolysis [30].

In this context, this work is aimed to report experimental data and semi-empirical kinetic modeling for a lipase-catalyzed glycerolysis system. To the best of our knowledge, experimental kinetic data on the solvent-free lipase-catalyzed glycerolysis under the influence of ultrasound irradiation has not been reported yet and reflects the efficacy of our research group to develop new processes for enzyme-catalyzed glycerolysis [30–39].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The substrates used in glycerolysis reactions were commercial olive oil (Arisco, Brazil), glycerol (Merck, 99.5%) and *n*-hexane (Quares, 99.5%), which was used for removing and washing the enzymes at the end of each experimental run. The acid value (mg KOH/g) and water content (wt%) (Karl Fischer titration method, DL 50, Mettler-Toledo) of the olive oil were determined as 0.11 and 0.04, respectively. A commercial immobilized lipase (Novozym 435) from *Candida antarctica* (immobilized on a macroporous

anionic resin, 1.4 wt% water) was purchased from Novozymes (Avançada, PR, Brazil) and presented an enzyme activity of around 20 U/g, determined as the initial rates in saponification reactions between lauric acid and propanol at a molar ratio of 3:1, temperature of 60 °C and enzyme concentration of 5 wt% in relation to the substrates. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme necessary to consume 1  $\mu$ mol of lauric acid per minute [40]. For the GC analysis, *n*-heptane, derivatizing BSTFA (N-methyl-bis(trimethylsilyl)fluorobutanesulfonamide), and chromatographic standards of glycerol, monoolein, diolein, triolein and oleic acid were purchased from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Experimental procedure

Enzymatic ultrasound-assisted glycerolysis reactions were carried out using an ultrasonic water bath (Ultraso apparatus – temperature accuracy of  $\pm 0.5$  °C) in which Henschel-type flasks (50 mL) were immersed with the content mechanically stirred (KA-800-20 digital stirrer) at constant stirring rate of 500 rpm for all experimental conditions [30,32,33]. The ultrasonic bath was equipped with a transducer having longitudinal vibrations, operating frequency of 37 kHz and a maximum rated power output of 132 W, which was kept at the highest deliver value for all experiments. The ultrasonic transducer (surface area of 282.2 cm<sup>2</sup>) is fixed at the bottom of the bath horizontally along the length of bath, which has been considered a suitable ultrasonic system [41].

Typically, around 30 g of the substrates (vegetable oil and glycerol) were charged into the reaction vessel, while the amount of

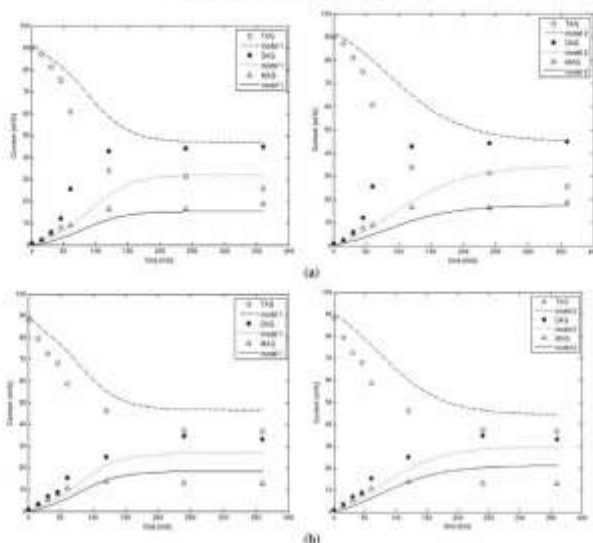


Fig. 3. Experimental data and kinetic modeling results for the enzymatic glycerolysis of olive oil at 18 °C, agitation of 800 rpm, ultrasonic power of 150 W in solvent-free system. Experimental conditions: enzyme concentration of 7.5 wt% and glycerol:oil molar ratio of: (a) 0.5:1, (b) 1:1, (c) 2:1 and (d) 3:1.

enzyme was defined according to pre-established values. Precise amounts of the substrates and enzyme were weighed on a precision scale balance (Ohaus Analytical Standard with 0.0001 g accuracy) and loaded into the reaction vessel. The kinetic experiments were performed varying the temperature (T) (30, 60 and 90 °C), enzyme concentration [E] (2.5, 7.5 and 10 wt%), based on the amount of whole substrates, oil and glycerol and glycerol to oil (C:O) molar ratio (0.8:1, 1:1, 2:1 and 3:1), providing 22 sets of experimental kinetic conditions, as shown in Table 1.

At the end of each reaction, the immobilized lipase was removed by vacuum filtration and the products were recovered for further analysis. Then, the catalyst was washed twice using 10 mL of *n*-hexane and the sample was vacuum filtered. Afterwards, the enzyme was dried in an oven at 40 °C for 1 h and the regenerated enzyme was kept in a desiccator for 24 h. After this period of time, the enzyme activity was determined. The acid value (mg KOH/g) measured at the end of each experimental condition was never greater than 0.5, and the water content (Karl Fischer titration method, DL 50, Merck-Toledo) was never higher than 1 wt%, does not interfering in the glycerolysis efficiency [34].

### 2.3. Products and substrates quantification

The analysis of the substrates/products of the reactions was performed in a gas chromatograph (Shimadzu 2010) with automatic on-column injector and flame ionization detector (FID). The column DB-5 J and W. Scientific, 057162940,

30 m × 0.25 mm × 0.1 μm) was used. The operational conditions followed the European Standard Committee 14305, with column temperature of 50 °C, 15 °C/min until 180 °C, 7 °C/min until 270 °C and 10 °C/min until 300 °C, keeping for 6 min. Detector temperature was 380 °C, hydrogen pressure of 80 kPa and injected volume of 1 μL. Initially, 100 mg of sample was homogenized in a 10 mL flask (10 mg of sample/mL of solvent). Hundred microliters of MSTFA was added and the solution was stirred and kept at room temperature for 15 min. Afterwards, the volume was completed to 10 mL with *n*-hexane. Then, solutions were transferred to sampling flasks and analyzed by the GC-FID. The weight percent of MAG, DAG and TAG was calculated taking the concentration values (mg/L) resulting from the chromatographic analysis and performing a straightforward calculation by simply dividing the amount of each component by the whole concentration of the solution injected multiplied by 100. All analyses were replicate at least three times [30,34].

### 2.4. Kinetic modeling

In this work, in an attempt to represent the experimental kinetic data obtained from solvent-free glycerolysis of olive oil with an immobilized lipase as catalyst in ultrasound-assisted system, two modeling approaches were adopted. Although the reaction rate might be controlled by internal mass transfer in the immobilized enzyme, it was also reported that the mass transfer limitation could be neglected for porous supports [10,42–44]. In this work

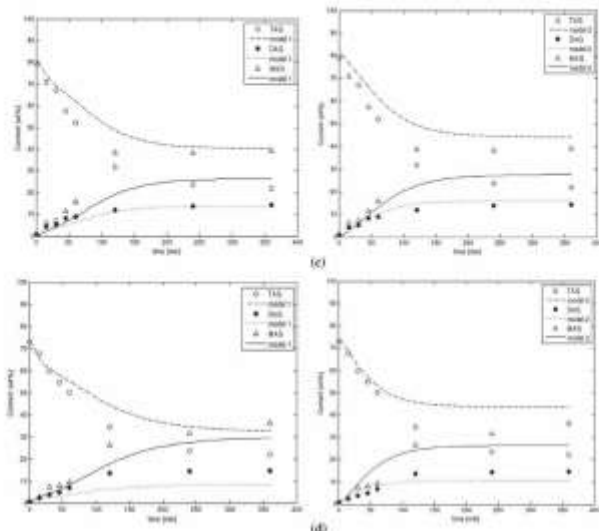


Fig. 2 (continued)

only substrates reaction was considered, adopting the ordered-sequential bi bi mechanism considering glycerolysis and hydrolysis/acidification steps, recently proposed by Völl et al. [39], denominated as model 1, and the semi-empirical model (based on the stoichiometry of the elementary reaction) of Valério et al. [35], named model 2. It is worthy mentioning that the kinetic parameters (12 reaction rate constants) for both adopted models were obtained from a global estimation by regression of all experimental kinetic data for all conditions presented in Table 1. On the whole, 22 experimental data sets, using the three temperature values investigated, comprising 176 experimental data points of MAG, DAG and TAG contents were used for the kinetic model fitting. Details concerning the resulting equations, and numerical procedure to adjust model parameters (which are available upon requesting the authors) can be found in the aforementioned work [35,38].

### 3. Results and discussion

At first, blank reaction tests were carried out, without the presence of enzyme or without irradiation power supply to the reaction medium. As demonstrated recently [30], results corroborated the fact that the contents of MAG and DAG were negligible (lower than 5 wt%), hence demonstrating that the glycerolysis reaction at the condition studied may not be considered as auto-catalytic. Keeping the enzyme without the use of ultrasound irradiation, also led to

negligible MAG and DAG yields (lower than 4 wt%), pointing that the ultrasonic irradiation is fundamental to reaction takes place.

Fig. 1a–d presents the results at fixed 70 °C and 2.5 wt% enzyme concentration, varying the glycerol to oil molar ratio of 5:8:1, 1:1, 2:1 and 3:1, conducting the reaction up to 6 h. The stoichiometry of the glycerolysis reaction requires a molar ratio of glycerol to oil of 2:1, but MAG or DAG production may be favored by reaction displacement to products formation through increasing the glycerol to oil ratio beyond the stoichiometric value or simply by glycerol suppression. In the work published by Yang et al. [45], the effect of glycerol in oil molar ratio was investigated in the range of 4.5:1–46:1 for the surflower oil glycerolysis at 70 °C, 8 wt% of Novozym 435, stirring of 900 rpm and 5 h of batch time in a surfactant and solvent-free system and the authors obtained 17 wt% of MAG with a glycerol to oil molar ratio of 9:1. These authors argued that the substrate ratio may have two different behaviors on reaction system: an increase in glycerol amount beyond the stoichiometric value may favor MAG production through reaction displacement to products formation. On the other hand, a raise in glycerol amount beyond a certain value may affect the system polarity as to influence the system stability and homogeneity.

Christilly et al. [42], when dealing with the glycerolysis of palm olein using immobilized lipase PS (Amano), argued that high concentrations of glycerol might lead to an increase in the initial reaction rate of MAG production and also in the final concentration of monoacylglycerols. Cerezo et al. [50] evaluated the effect of glycerol to oil molar ratio (3:1 and 6:1) on the enzymatic

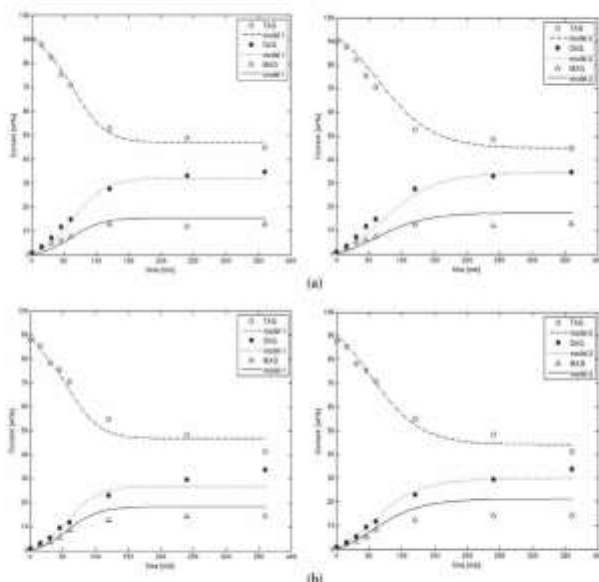


Fig. 4. Experimental data and kinetic modeling results for the enzymatic glycerolysis of olive oil at 70 °C, agitation of 900 rpm, ultrasonic power of 332 W in solvent-free system. Experimental conditions: enzyme concentration of 10 wt% and glycerol molar ratio of (a) 1:1, (b) 1:2, (c) 1:3, and (d) 1:4.

glycerolysis of olive oil without solvents at 75 °C and observed that, after 4 h, both reacting systems reached steady levels of MAG concentration and, after 7 h, the excess of glycerol did not affect the product content.

For the present case, 70 °C and 2.5 wt% enzyme concentration, the experimental kinetic data presented in Fig. 1a–d show that the excess of glycerol is not so effective at the beginning of the reaction (say, 2 h). In terms of differences in MAG (initial reaction rate, calculated as the slope of the linear part of the kinetic curves, of  $0.109 \text{ min}^{-1}$ ) and DAG (initial reaction rate of  $0.046 \text{ min}^{-1}$ ) concentrations, this becomes important after a certain reaction time had elapsed.

Nevertheless, it is interesting to notice from Fig. 1a and b that the glycerol restriction, conditions 1 and 2 of Table 1, clear lead to higher DAG production (initial reaction rates of  $0.035$  and  $0.049 \text{ min}^{-1}$ , respectively), whereas the opposite trend is verified for the stoichiometric and 3:1 ratios ( $0.046$  and  $0.033 \text{ min}^{-1}$ , respectively). Thus, as verified previously by our research group [34] and demonstrated in the literature by Moqan et al. [13,46] and Chiriac et al. [42], it seems possible to favor the DAG production through restriction of glycerol amount in the reaction medium.

In general, results obtained using 2.5 wt% enzyme concentration showed slow initial reaction rates (see the caption of Fig. 1), with relatively poor conversions verified to MAG and DAG. One

should also note from Fig. 1 that the employed models were able to satisfactorily describe the kinetics of the glycerolysis reaction.

In Fig. 2a–d is depicted the kinetic results for conditions 3–6 of Table 1, which means the same temperature of Fig. 1, 70 °C, but now for 7.5 wt% enzyme concentration. It can be seen from such figure that, here, relatively fast initial reaction rates are observed (see the caption of Fig. 2), with considerable production of DAG (1–50 wt%) for glycerol to oil molar ratio below the stoichiometric value, followed by a nearly asymptotic behavior for MAG and DAG contents at larger times for all conditions. Hence, from a practical standpoint, the reaction might be interrupted to meet economic aspects – small gains after a certain time. Note that higher glycerol to oil molar ratios makes DAG content progressively smaller than MAG, with important MAG contents obtained for 2:1 glycerol to oil molar ratio. On the whole, better results were reached for the total production of MAG and DAG comparatively in the use of 2.5 wt% enzyme content, thus corroborating the importance of availability of the catalyst to substrates in the reaction medium. The fact that gradually poorer results in terms of MAG and DAG total content is found as glycerol content is enhanced has been attributed to the visible adherence of glycerol onto the enzyme support, to some extent encapsulating the enzyme support, causing mass transfer limitations [36]. Again, both models were capable of satisfactorily capturing the experimental trends of MAG and DAG production.

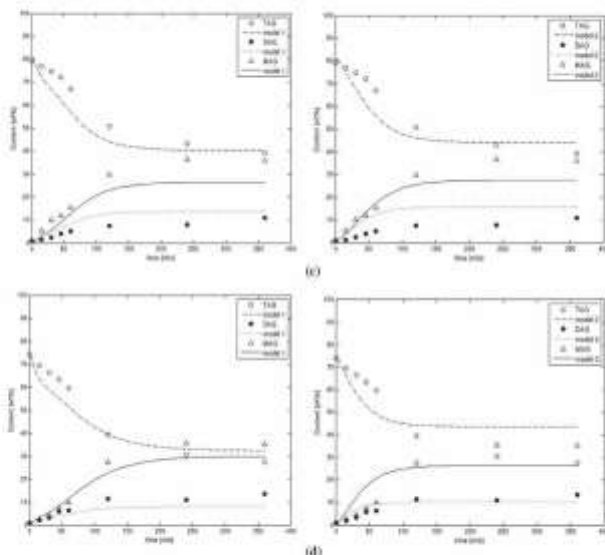


Fig. 3 (continued).

Fig. 3a–d, conditions 9–12 of Table 1, show the results at the same temperature, but for 10 wt% enzyme concentration, where it can be seen that a lower MAG + DAG content was obtained in comparison with the previous enzyme concentration, 7.5 wt%. This fact may be explained by a poorer mixing of the reaction medium, and thereby occurrence of mass-transfer limitations. This result is in agreement with previous reports, showing that an increase in *l*-leucine loading above a certain amount may not increase the yield, while might increase the reaction rate, showing that high enzyme concentrations may lead to the formation of aggregates, thus not making the enzyme active site available to the substrates [34,36,47,48]. One could risk affirming that, in general, satisfactory representation of experimental kinetic data was again possible by both semi-empirical models employed in this work.

In attempt to seek process energy saving, temperature was reduced down to 50 °C, adopting the enzyme concentrations of 7.5 and 10 wt% (for 2.5 wt% enzyme concentration, negligible MAG and DAG production was verified), varying the glycerol to oil molar ratio, according to conditions 13–16 in Table 1. Related kinetic results are shown in Fig. 4a–d, where it can be noted from Fig. 4a that much poorer production of MAG and DAG was observed compared to 70 °C, for the same enzyme content (7.5 wt%) and glycerol to oil ratio (2:1). For 10 wt% of enzyme concentration, compared to 70 °C, practically similar values were found at 50 °C for glycerol to oil molar ratio of 0.8:1 and 1:1, but with considerable inferior results verified for 2:1. The very poor mutual miscibility of oil and glycerol is believed to be the reason of the unsatisfactory result

obtained at 50 °C. In fact, safe experimentation using the glycerol to oil molar ratio of 3:1 at this temperature was not possible to be conducted due to the poor homogeneity of the starting mixture (solution not completely translucent).

Besides, comparison between Figs. 4a and 2c or Fig. 4b–d with Fig. 3a–c shows that when the temperature was increased from 30 to 70 °C, the reaction became much faster and higher MAG and DAG contents were obtained. This result is in agreement with other reports available in the literature. For example, Yang et al. [45] evaluated the effect of temperature on the enzymatic glycerolysis of sunflower oil in a solvent-free system constituted by 10 wt% of enzyme (Novozym 435), glycerol to oil molar ratio of 4.5:1, 500 rpm of agitation, without surfactant, at 40 and 70 °C. These authors observed that, after 24 h of reaction, the conversion of MAG reached 16 wt% at 40 °C, the same value observed with 5 h of reaction at 70 °C (with 8 wt% Novozym 435), a much faster reaction rate but still not attractive from a commercial perspective. Penougat et al. [48] studied the effect of temperature (30–50 °C) on the MAG production from tansu oil with IM-AE commercial immobilized lipase. They observed that in the temperature range of 30–45 °C, MAG production increased with temperature.

It is a common sense that temperature presents two important roles in the reacting system. Firstly, an increase in temperature can reduce mixture viscosity, enhance mutual solubility and improve diffusion process of substrates, thus reducing mass transfer limitations and favoring interactions between enzyme particles and substrates. Further, enzymes generally have an ‘optimal working

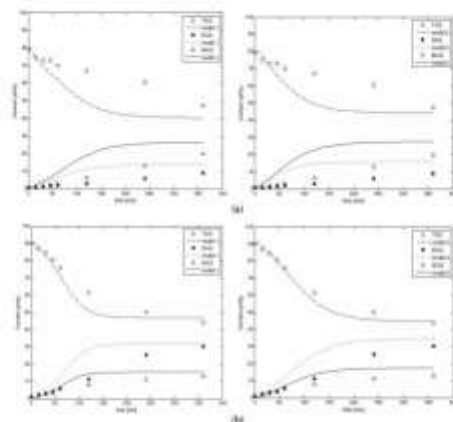


Fig. 4. Experimental data and kinetic modeling results for the enzymatic glycolysis of olive oil at 50 °C, agitation of 600 rpm, ultrasonic power of 133 W in solvent free system. Experimental conditions (a) enzyme concentration of 7.5 wt% and glycerol to oil molar ratio of 2:1; enzyme concentration of 15.0 wt% and glycerol to oil molar ratio of (b) 8:8, (c) 1:1, and (d) 1:1.

temperature value", established for each reaction system under evaluation and, in the case of Novozym 435, it is situated around range of 50–70 °C [34,35,20–32].

Taking into account these results, another set of kinetic experiments was accomplished, increasing the temperature to 60 °C, as

shown by conditions 17–22 in Table I. First, two conditions were studied with 2.5 and 7.5 wt% enzyme concentration, both at glycerol to oil molar ratio of 2:1. Comparison of results obtained at 60 °C with those at 70 °C (e.g., Fig. 5a with Fig. 1c, Fig. 5b with Fig. 2c and Fig. 5c–f with Fig. 3a–f) demonstrates that nearly

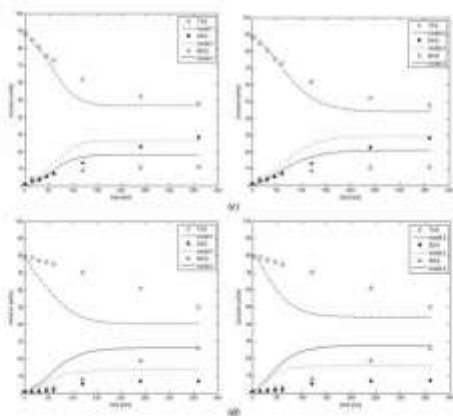


Fig. 4 (continued).

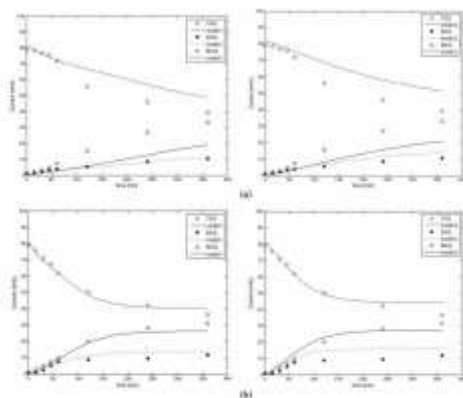


Fig. 4. Experimental data and kinetic modeling results for the transesterification of olive oil at 60 °C, agitation of 600 rpm, 1.0 molar power of 132 W in solvent-free system. Experimental conditions: (a) enzyme concentration of 2.0 wt% and glycerol oil molar ratio of 2:1, (b) enzyme concentration of 2.0 wt% and glycerol oil molar ratio of 2:1, (c) enzyme concentration of 2.0 wt% and glycerol oil molar ratio of 2:1, (d) enzyme concentration of 2.0 wt% and glycerol oil molar ratio of 2:1.

similar results were found, with slightly better MAG and DAG production reached at 70 °C, and much superior to those found at 50 °C (compare Fig. 5b with Fig. 4a, or Fig. 5c–e). It can also be observed from the results obtained at 60 °C, that, as occurred for the

other conditions investigated, the models employed provided a satisfactory representation of the experimental data, particularly if we take into account that global parameter estimation was performed.

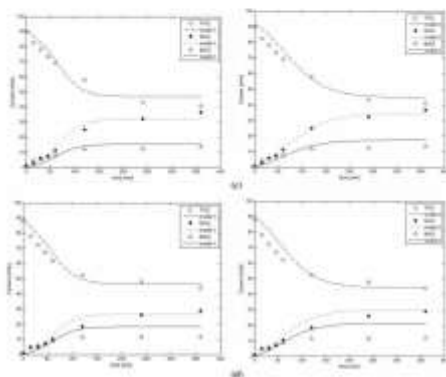


Fig. 5 (continued).



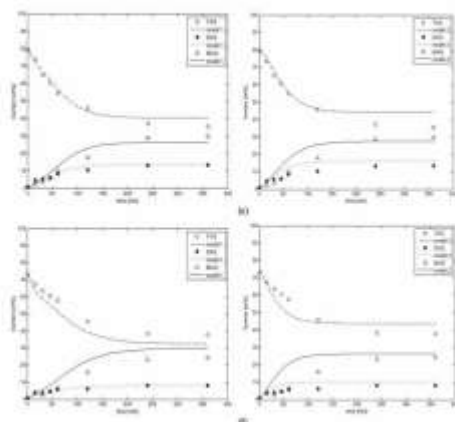


Fig. 3 (continued)

Regarding the effect of ultrasound irradiation on enzyme activity, it may be relevant to mention that measurements of enzyme activity [16] before (fresh) and after (used) reaction experiments revealed no relevant changes in the residual lipase activity, thus making possible enzyme reuse. This indicates that important conformational changes in the enzyme/support structure probably may not have occurred after ultrasonic treatment. According to current literature, the tolerance of enzymes to ultrasound might depend on the physical location of the enzyme in the cell and on its molecular weight. However, very little is known about the actual effect of ultrasound on enzyme behavior because contradictory results of inactivation and activation of enzymes upon ultrasound treatment have been reported. Unlike traditional heat denaturation, the inactivation process does not destroy the active site of an enzyme, and this has been clearly demonstrated for  $\alpha$ -amylase, horseradish peroxidase, lactase and alkaline phosphatase [57–60]. Whereas ultrasound-mediated deactivation of some enzymes, including alkaline protease, glucose-6-phosphate dehydrogenase and trypsin, was observed when high ultrasound power of 500 W was used (typical power used is 25–150 W) [55]. A good discussion about the effect of ultrasound irradiation on enzyme activity can be found in the literature [55].

Although just one work was found in the literature dealing with the kinetics of MAG and DAG production through enzymatic glycerolysis under ultrasound irradiation [30], at only one condition, one can mention the work by Balnic et al. [28] who described very recently a protocol for the production of diacylglycerols by the partial hydrolysis of soybean oil catalyzed by lipase in an ultrasound water bath, 125 W and frequency of 47 kHz, under mechanical stirring. Better yields (above 40 wt%) and shorter reaction times (1.5 h) were obtained under sonication as compared to the thermal process. Another work from Zheng et al. [16] reports the production of MAG and DAG from the glycerolysis of soybean oil under mechanical stirring, in the presence of NaOH as catalyst, with and without solvent, under ultrasound water bath irradiation varied in the range 40–100 W and frequency of 25 kHz. DAG

**Table 2**  
Modeling results of glycerolysis of olive oil under sonochemical irradiation in terms of root mean square deviation (rmse) of TAG, MAG and DAG.

Model	rmse <sub>MAG</sub> (%)	rmse <sub>DAG</sub> (%)	rmse <sub>TAG</sub> (%)
1	7.24	4.09	4.79
2	6.00	4.08	5.43

rmse =  $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i,exp} - y_{i,model})^2}{n}}$ ; TAG, MAG, DAG, RMSE represents the number of observations (experimental data points) and exp and calc denote experimental and calculated (model) values, respectively.

formation was not observed in the solvent-free system under any experimental conditions, but when organic solvents were employed, yields as high as 60 wt% of MAG and DAG were observed. One can see from these two works the use of similar experimental setup and operating conditions compared to the present work, but in the present case a re-usable catalyst and solvent-free system were adopted.

In general, one could be seen from Figs. 3–5 that the two models presented a similar fitting quality with a slightly superior performance observed for model 1, as demonstrated in Table 2 by the root mean square deviation (rmse) between experimental and calculated values. Deeper investigation in this regard is underway within our working group, taking for example into consideration enzyme inactivation by glycerol blockage and/or due to ultrasound irradiation at higher irradiation power supply.

#### 4. Conclusion

This work reports for the first time a systematic kinetic study of enzyme-catalyzed glycerolysis under the influence of ultrasound irradiation in solvent-free system. Results showed a promising perspective in the use of environmental benign technique to produce MAG and DAG without health concerns and unnecessarily costs associated with solvent separation. Appreciable reaction yields of

MAC and/or DAC were obtained under mild conditions, irradiation power supply 1–135 W, temperature (60–70 °C), in a relatively short reaction time (2 h), and low enzyme content (7.5 wt%). The kinetic approaches employed showed that rates a quite satisfactory agreement between experimental data and model results thus allowing a better understanding of the reaction kinetics, pointing a promising route to be further investigated and improved to use in process optimization. Further experiments comprising detailed investigations of glycomono-saccharide kinetics and studies of regarding the behavior of commercial and non-commercial enzymes in ultrasonic systems are underway by our working group.

#### Acknowledgments

The authors thank CAPES, CNPq and Fapes/Unicamp for the financial support of this work and scholarships.

#### References

- [1] M.L. Herrera, J. Adamez, S. Hill, A.D. Jones, J.F. Speers, S. Xu, Evaluation of Sacchariobacterium for efficient monosaccharide production by continuous enzymatic glycolysis, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7113–7118.
- [2] P. Xia, Z. Yang, Y. Hua, H. Wang, W. Shi, H. Wang, C. Ding, H. Wang, L. Li, Enzymatic production of monosaccharides with Caracalla oil by the glycolysis reaction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87 (2010) 211–217.
- [3] F. Hill, L. Corrigan, M.S. Sarmento, P. Durrant, Biocatalyzed synthesis of 6,3-diacylglycerol oil from virgin olive oil, *Enzyme Microb. Technol.* 43 (2007) 727–732.
- [4] T. Kauravath, R. Gupta, H. Bhat, G. Mehta, G. Singh, H. Maithe, V. Saini, M. Sachin, Enzymatic studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil, *Food Chem. Technol.* 41 (2008) 353–360.
- [5] K.C. Ganetti, M.H. Andrade, R. Zanatta, M. Mattoso, I. Volante, D.M. Longpre, M.R. Duarte, L.L. Farias, R.B. Aguiar, E.D. Andrade, M.D. Freire, M. Hill, Consumption of diacylglycerol as a part of a reduced energy diet reduces fat body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 1238–1246.
- [6] T. Nagai, H. Watanabe, H. Gotoh, K. Iritani, H. Takaya, M. Mizuma, Y. Yashida, K. Tsubota, H. Shimizu, M. Iizuka, Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in rats: is a double-blind controlled trial, *J. Nutr.* 130 (2000) 782–787.
- [7] H. Kanda, T. Hara, J. Mizuta, I. Volante, Digestion and assimilation features of dietary diacylglycerol in the rat small intestine, *Lipids* 38 (2003) 29–38.
- [8] H. Watanabe, H.M. Hattori, M.B. Carlson, A candidate gene for the glycerolipid synthesis, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 280–287.
- [9] H. Ganetti, H. Hill, M. Kura-Choshima, Y. Ganetti, Production of mono-oligomer by immobilized *Sacchariobacterium* strains: lipase in a water-free system: optimization by response surface methodology, *Enzyme Microb. Technol.* 38 (2006) 717–723.
- [10] Z. Gan, X. Xu, Lipase-catalyzed glycolysis of free and acid in situ lipase: a further study of the reaction system, *Food Chem.* 8 (2006) 54–62.
- [11] D. Kadow, Z. Gan, K. Oonuki, S. Xu, Optimization of enzymatic synthesis of diacylglycerol in binary emulsion systems containing water, lipase, and food Chem. 110 (2010) 699–685.
- [12] M.A. Jackson, J.M. King, Lipase-catalyzed glycolysis of soybean oil in emulsified carbon dioxide, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (1997) 301–309.
- [13] P.H.L. Maguire, F. Terroba, H. Senoia, M.D.A. Saldana, Kinetic modeling of glycolytic hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide media using equilibrium data, *J. Supercrit. Fluids* 37 (2006) 417–424.
- [14] J.C. Cheong, J.-P. Lee, B. Lim, H.S.A. Tseng, S. Anli, S. E. Je, D.M. Lee, Production of a diacylglycerol rich palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology, *Food Chem.* 101 (2003) 1414–1420.
- [15] J. Guo, Y. Sun, Solvent-free production of 1,3-diglyceride of olive triolein: catalysis and kinetic design, *Food Chem.* 100 (2007) 3078–3084.
- [16] M. Zhang, L. Li, X. Su, L. Z. Cheng, S. Zhu, B. Li, Production of diacylglycerol through free-temperature catalysis, *Food Chem.* 123 (2010) 228–232.
- [17] L. Perroti, P.L.G. Mattia, R.A. Sposito, E.H. Pires, K.C.C. Hepp, H. Vicente, C.H.F. Pereira, Efficient enzymatic synthesis of novel 2,5-diary-4,3-dihydro-1H-pyridin-1-carboxamide, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 34–37.
- [18] K.J. Sato, P. Lewis, J. Volante, Low frequency ultrasound in Sonochemistry: state of the art, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 986–996.
- [19] G. Gal, H.C. Liu, Ultrasound powered lipase-catalyzed reactions, *Ultrason. Sonochem.* 16 (2009) 4067–4068.
- [20] Y. Xian, Q. Wu, Y. Gu, S. Lin, Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of lipase system in heterogeneous systems, *Ultrason. Sonochem.* 16 (2009) 2007–2011.
- [21] S. Shah, M.H. Gupta, The effect of ultrasonic power (measured on the catalytic activity of lipase in aqueous and non-aqueous media, *Chem. Commun.* 3 (2001) 1–4.
- [22] D. Li, L. Yan, H. Wu, S. Wang, Y. Wang, H. Ma, X. Jiang, Ultrasonic irradiation with vitamin E boosted production from soybean oil by lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 40 (2010) 419–423.
- [23] D. Kauravath, G. Kothari, P. Durrant, C.P. Singh, Ultrasound-assisted transesterification of jatropha curcas oil using solid catalyst, *Mol. Catal.* Ultrason. Sonochem. 17 (2010) 830–844.
- [24] P. Ganai, S. Marigona, K.C. Ganetti, G. Dandrea, A new pilot flow reactor for high-accuracy chains of irradiation. Application to the synthesis of biodiesel, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 645–650.
- [25] S.M. Wang, F.R. Goggin, V.R. Riedel, Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using ultrasonic irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 427–432.
- [26] H. Watanabe, S. Yamamoto, S. Kikuta, A.T. Mujumdar, Ultrasound-assisted biodiesel production from palm oil using alkaline earth metal oxide as the heterogeneous catalyst, *Fuel* 89 (2010) 1818–1823.
- [27] L.L. Thattai, K. Ojima, Y. Saitohara, N. Takemura, Y. Maeda, H. Banikow, A feasibility evaluation of biomass-derived production of biodiesel fuel from waste cooking oils: a practical and economical approach to produce high quality biodiesel fuel, *Bioresour. Technol.* 105 (2010) 5344–5347.
- [28] F.F.P. Santos, D.J. Malveira, M.L.A. Cruz, F.A.X. Fernandes, Production of biodiesel by ultrasound-assisted transesterification of *Orbignya speciosa* oil, *Fuel* 89 (2010) 275–278.
- [29] I. Kocet, S.L.F. Iyora, M.S.M.A. Saiz, S.A.F. Arantes, Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 17 (2010) 4–6.
- [30] K.L. Farnesi, M.M. Sivilski, A. Casati, A. Fajon, J.L. C. Ferreira, C.M.F. Ferreira, H. Trinchel, D. Oliveira, UV-assisted, ultrasonic-mediated efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerol from olive oil, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 981–987.
- [31] A.A. Karimzadeh, E.S. Farnesi, L. Corti, M.L. Corzana, H. Trinchel, D. Oliveira, J.V. Oliveira, Lipase-catalyzed production of mono-glycerol in compressed propane and AOT surfactant, *J. Supercrit. Fluids* 49 (2008) 64–66.
- [32] K.L. Farnesi, S. Román, D. Oliveira, M.L. Corzana, H. Trinchel, J.V. Oliveira, Assessment of variables effects on solvent-free monoacylglycerols enzymatic production in AOT surfactant, *Int. J. Lipid Sci. Technol.* 118 (2008) 316–318.
- [33] K.C. Ganetti, S. Román, D. Oliveira, M.L. Corzana, H. Trinchel, J.V. Oliveira, Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed production of monoacylglycerol from olive oil in AOT surfactant, *Int. J. Food Chem.* 106 (2008) 708–712.
- [34] R.L. Krige, A. Volante, M. Bales, J.L. Weiss, J.R. Oliveira, D. Oliveira, M.L. Corzana, Improvement of mono and diacylglycerol production via enzymatic glycolysis in non-aqueous media, *J. Lipid Sci. Technol.* 111 (2010) 421–427.
- [35] A. Volante, R.L. Krige, J.L. Weiss, E.C. Gattuso, D. Oliveira, J.V. Oliveira, M.L. Corzana, Kinetics of solvent-free lipase-catalyzed glycolysis of olive oil in surfactant system, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4238–4244.
- [36] A. Volante, K.C. Ganetti, S. Román, E. Farnesi, M.L. Corzana, H. Trinchel, D. Oliveira, J.V. Oliveira, Enzymatic production of mono- and diglycerols in compressed *n*-butane and AOT surfactant, *J. Supercrit. Fluids* 48 (2009) 216–220.
- [37] A. Volante, K.C. Ganetti, S. Román, H. Trinchel, D. Oliveira, J.V. Oliveira, Low-pressure lipase-catalyzed production of mono and diglycerols with and without *n*-butane and AOT surfactant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 148 (2010) 1789–1794.
- [38] A. Volante, S. Román, H. Trinchel, D. Oliveira, J.V. Oliveira, Optimization of mono and diacylglycerol production from enzymatic glycolysis in solvent-free systems, *Bioprocess Biotechnol.* 25 (2010) 819–821.
- [39] F. Voli, R.L. Krige, P. Carillon, J.C. Ribeiro, J. Carval, J. Weiss, M.L. Corzana, Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycolysis of olive oil, *Biotechnol. Eng. J.* 4 (2011) 107–110.
- [40] D. Oliveira, K.C. Ganetti, A.C. Sivilski, M.H. Euzébio, C. Durva, J.V. Oliveira, Assessment of two immobilized lipase activity toward to compressed fluids, *J. Supercrit. Fluids* 46 (2008) 373–382.
- [41] P.R. Gupta, L.H. Ezzamel, A review of applications of carbonates in biochemical engineering/biotechnology, *Biochem. Eng. J.* 44 (2006) 40–53.
- [42] B. Dandrea, H. Gauerberg, A. Hill, Kinetic study of glycolysis of palm olein by monoacylglycerol production by immobilized lipase, *Biotechnol. Eng.* 15 (2007) 71–80.
- [43] J.P. Chen, H.C. Wang, Improved synthesis of diacylglycerol by entrapping in alginate-chitosan gel matrix, *Bioresour. Technol.* 112 (2010) 851–855.
- [44] M.D. Romero, J. Galvis, C. Alba, A. Durrant, Kinetic study of enzymatic mono-glycerol by immobilized lipase-catalyzed acylation in *n*-butane, *J. Biotechnol.* 122 (2007) 265–277.
- [45] T. Tang, M. Belandier, D. Lapetoff, X. Xu, Monoacylglycerols synthesis via enzymatic glycolysis using a simple and efficient reaction system, *J. Food Lipids* 12 (2005) 289–312.
- [46] P.H.L. Maguire, F. Terroba, J.H. King, M.H. Farias, Kinetic modeling of glycolytic reaction for soybean oil in supercritical carbon dioxide media, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82 (2005) 613–617.
- [47] T. Watanabe, M. Shimizu, M. Sugita, M. Sato, J. Kikuchi, N. Yamada, K. Natsuyuki, Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-specific lipase Lipzyme-601 HL, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 1281–1287.
- [48] T. Yang, M. Belandier, D. Lapetoff, X. Xu, Enzymatic production of monoacylglycerol containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycolysis system, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1473–1481.

- [40] B. Pawaraj, X. Yu, A.H. Elkhatib, synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from sun of seed (ramanold) lipase *Al*, *Food Chem.* 104 (2007) 231–238.
- [41] A. Gomez, M. Martinez, J. Anad, Reaction of olive oil and glycerol over immobilized lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 657–668.
- [31] H. Mirrezaei, X. Yu, H. Ma, Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary acylglycerols by lipase-catalyzed glycolysis, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5059–5066.
- [32] West Medtek. Characteristics of immobilized lipase at ester synthesis and effects of water and temperature in various reactions. Technical Report, 1992, 4-00344.
- [33] B. Orlak, G.D. Sigan, The stability of enzymes after immobilization, *Process Biochem.* 35 (2000) 1613–1661.
- [34] A. Reborek, M. Tachar, G. G. Chem. Application of power ultrasound for an dye degradation, *Ultrason. Sonochem.* 11 (2004) 177–182.
- [35] C. Ruiz, C.J. Silva, G. Lillo, A. Gomez-Pardo, Stability and deactivation kinetics of immobilized lipase in liquid ultrasonic fields, *Ultrason. Sonochem.* 14 (2007) 857–862.
- [36] M.M. Tachar, G.M. Gomez, A. Reborek, Degradation of azo dyes by catalase process - kinetic and ultrasound treatment, *Bioelectr. Technol.* 3 (2006) 4213–4220.