

Stéphanie Baía Cancela da Fonseca

**ASPECTOS TÉCNICOS E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA O ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE
GLICERÓLISE CATALISADA PELO DERIVADO
ENZIMÁTICO LIPOZYME TL IM**

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

Orientador: Prof. Dr. Agenor
Furigo Jr.

Coorientadora: Prof. Dr.^a Silvana
Licodiedoff

Florianópolis, SC
2015

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

Fonseca, Stéphanie Baía Cancela da
Aspectos técnicos e avaliação de metodologia para o
acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo
derivado enzimático Lipozyme TL IM / Stéphanie Baía
Cancela da Fonseca ; orientador, Agenor Furigo Junior ;
coorientadora, Silvana Licodiedoff. - Florianópolis, SC,
2015.
97 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Catálise/tecnologia
enzimática. 3. Glicerólise enzimática. 4. Cromatografia a
gás. 5. Quantificação de glicerol. I. Furigo Junior, Agenor
. II. Licodiedoff, Silvana. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

Stéphanie Baía Cancela da Fonseca

**ASPECTOS TÉCNICOS E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA O ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE
GLICERÓLISE CATALISADA PELO DERIVADO
ENZIMÁTICO LIPOZYME TL IM**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação de Engenharia Química.

Florianópolis, 14 de dezembro de 2015.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Silvana Licodiedoff, Dr.^a
Orientadora
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Miguel Müller, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcelo Lanza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este modesto trabalho aos meus amáveis e diligentes pais, Antônio e Maria; ao meu companheiro nesta jornada, Pedro; aos professores, funcionários e amigos do Colégio Técnico de Lorena e aos meus amigos do reino animal Bia (*in memoriam*) e Frederico.

AGRADECIMENTOS

Exprimo minha gratidão a alguns professores inspiradores que foram determinantes na minha vida. Começo por agradecer aos meus pais, primeiros mestres que ensinaram-me a ler, escrever, contar e aguçaram minha imaginação. Agradeço aos professores que tive no Colégio Técnico de Lorena Professor Nelson Pesciotta, em especial ao Prof. Dr. Adriano Siqueira, cujo brilhantismo e amor à matemática foram fundamentais para que eu me apaixonasse por exatas e escolhesse a engenharia como profissão.

Agradeço ao querido Professor Dr. Agenor Furigo Jr., meu orientador nesta jornada, por sua compreensão, pelos *insights*, pelo rigor técnico e por tudo quanto aprendi com ele. Agradeço também à minha coorientadora e amiga Prof.^a Dr.^a Silvana Licodiedoff, por me ajudar com seu pragmatismo, correções, senso de objetividade e com uma amizade para a qual apenas atos podem responder.

Deixo minha eterna gratidão aos demais alunos do Professor Agenor: Bruno Niero, Gabriela Pompeo, Jonathan Bork, Lucas Fachin, Mara Zenevitz, Martha Möecke, Rosana Henriques e Samara Ortiz. Agradeço especialmente aos dedicados e incríveis alunos de Iniciação Científica: Lucas, Gabriela (minha eterna irmãzinha) e Martha. Seria impossível concluir tantos experimentos sem vosso espírito de equipe. Também deixo um agradecimento especial ao doutorando Jonathan, meu grande amigo, que me apresentou o mundo da cromatografia e dedicou tantas horas ao desenvolvimento do método cromatográfico, sua ajuda foi inestimável.

Demonstro todo meu apreço à generosidade da Prof.^a Dr.^a Jane Mara Block e suas alunas, em especial à doutoranda Rosssana Podestá, pela acolhida em seu Laboratório de Óleos e Gorduras do CAL – UFSC. Vossa disponibilidade em ceder-nos espaço, cromatógrafo e outros itens foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos demais alunos, professores do Engebio e a nossa técnica, Dr.^a Denise Esteves Moritz. Os almoços e cafés filosóficos, a animação e generosidade dos colegas conferiram cor a dias e noites de trabalho.

Por fim, agradeço aos membros da banca, pelas contribuições e disposição, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFSC, e a todos seus professores e funcionários pelo auxílio e oportunidade ofertada, bem como à CAPES pelo apoio financeiro.

“No estudo da natureza, não nos cabe questionar se Deus, O Criador, dispõe de suas criaturas para operar milagres e afirmar Seu poder. Antes, devemos nos questionar sobre o que a Natureza pode naturalmente trazer a tona a partir de suas causas imanentes.”

(São Alberto Magno, padroeiro dos cientistas e das ciências naturais, em *De Vegetabilibus*, 1260 d.c.)

RESUMO

Este trabalho objetivou elucidar alguns aspectos técnicos da glicerólise enzimática de óleos e gorduras catalisada pela lipase imobilizada Lipozyme TL IM e avaliar a metodologia para acompanhamento dessa reação. Azeite de oliva extra-virgem (AOEV) foi utilizado como óleo modelo. Os ensaios cinéticos foram realizados através de reações não destrutivas e destrutivas, conduzidas entre 0 e 24 h, a 55°C, sob agitação mecânica de 600 rpm, utilizando razão molar AOEV/glicerol 2:1 e biocatalisador a 10% m/m em relação aos reagentes. Para acompanhamento das reações, desenvolveu-se um método espectrofotométrico para quantificação de glicerol (Gli) e implementou-se o método consolidado AOCS Cd 11b-91 para quantificação de acilgliceróis por cromatografia a gás. O método espectrofotométrico permitiu acompanhar o perfil da concentração de Gli ao longo do tempo, mas os resultados mostraram que as etapas de preparo da amostra (filtração, lavagem e extração) requerem aprimoramento. O método AOCS Cd 11b-91 mostrou-se adequado para acompanhar a reação em função da formação de monoacilgliceróis (MAGs). Constatou-se que devido aos fenômenos de transporte de massa, os valores obtidos a partir de reações não destrutivas referem-se à dispersão de reagentes e produtos na fase líquida do meio reacional e que quantidade considerável do Gli permanece adsorvida no suporte hidrófilo do biocatalisador durante a reação. Para os ensaios com reações não destrutivas, obtiveram-se os seguintes valores para velocidade inicial de dispersão de MAG, frações mássicas máxima de MAG, mínima e máxima de glicerol respectivamente: $v_{iMAG}^D = 0,0064 g_{MAG} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$, $w_{MAGmáximo} = 0,0892$, $w_{Gli_{mínimo}} = 0,0005$, $w_{Gli_{máximo}} = 0,0031$. Para os ensaios com reações destrutivas, foram obtidos os seguintes valores para velocidade inicial de formação de MAG, frações mássicas mínima de Gli e máxima de MAG respectivamente: $v_{iMAG} = 0,0174 g_{MAG} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$, $w_{Gli_{mínimo}} = 0,0181$, $w_{MAGmáximo} = 0,0900$. O rendimento final da reação em MAG ficou entre 0,31 e 0,47.

Palavras-chave: Glicerólise enzimática. Lipase. Lipozyme TL IM. Quantificação de Glicerol. Cromatografia à gás. Adsorção.

ABSTRACT

The present work aims to elucidate some technical features of the enzymatic glycerolysis of oils and fats catalyzed by the immobilized lipase Lipozyme TL IM, as well as evaluate the methodology required to monitor this reaction over time. Extra-virgin olive oil (EVOO) has been chosen to serve as the model oil. Kinetic experiments have been conducted by means of non-destructive and destructive reactions, between 0 and 24 hours, under 55°C, 600 rpm of mechanical stirring, molar ratio EVOO/glycerol 2:1, and 10% of the total mass of the reagents as biocatalyst. In order to monitor the reaction course, a spectrophotometric method to quantify the glycerol (Gly) was developed, and the standard method AOCS Cd 11b-91 for acylglycerols quantification by gas chromatography was implemented. The spectrophotometric method allowed to establish the glycerol concentration profile over time; nevertheless, results have indicated that sample preparation steps (washing, filtration and extraction) must be improved. The AOCS CD 11b-91 method proved to be useful to monitor the reactions regarding the production of monoacylglycerols (MAG). It was observed that due to mass transport phenomena, values provided by non-destructive reactions are related to the dispersion of reagents and products through the reaction bulk, and that most of the total glycerol amount remains adsorbed to the hydrophilic support of the biocatalyst during the entire course of the reaction. The following results of initial velocity of MAG dispersion, maximum fraction mass of MAG, minimum and maximum fraction mass of Gly were provided by the experiments conducted through non-destructive reactions: $v_{i_{MAG}}^D = 0,0064 \text{ g}_{MAG} \cdot \text{g}_{medium}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $w_{MAG_{max}} = 0,0892$, $w_{Gli_{min}} = 0,0005$, $w_{Gli_{max}} = 0,0031$. Regarding the experiments conducted through destructive reactions, the following results of initial velocity of MAG production, minimum and maximum mass fraction of Gly and MAG were found: $v_{i_{MAG}} = 0,0174 \text{ g}_{MAG} \cdot \text{g}_{medium}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $w_{Gli_{min}} = 0,0181$, $w_{MAG_{max}} = 0,0900$. The final yield of the reaction has varied between 0,31 and 0,47.

Keywords: Enzymatic glycerolysis. Lipase. Lipozyme TL IM. Glycerol quantification. Gas chromatography. Adsorption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do glicerol	5
Figura 2 - Representação da reação de glicerólise de óleos e gorduras	12
Figura 3 – Comparação entre o comportamento cinético de esterases e lipases.....	17
Figura 4 – Estrutura da enzima de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	18
Figura 5 - Aparato utilizado para a reação de glicerólise.....	22
Figura 6 – Fluxograma do preparo de amostras das reações não destrutivas	23
Figura 7 - Fluxograma do preparo de amostras das reações destrutivas	24
Figura 8 - Esquematização das réplicas utilizadas para construção da curva de calibração do glicerol.....	26
Figura 9 - Preparo das soluções amostrais para quantificação do glicerol residual nas amostras provenientes das reações de glicerólise.....	27
Figura 10 –Emulsões formadas durante a etapa de extração do glicerol das amostras das reações de glicerólise ao se empregar a metodologia descrita por BONDOLI; DELLA BELLA (2005)	34
Figura 11 – Curva de calibração para quantificação do glicerol através de método espectrofotométrico: Concentração de glicerol versus absorvância em 410 nm.....	35
Figura 12- Cromatograma típico de uma amostra de emulsificante de MAGs e DAGs.....	36
Figura 13 - Cromatograma relativo à substância de referência monooleína	37
Figura 14 – Cromatograma relativo à substância de referência dioleína	38
Figura 15 - Curva de calibração para quantificação da monooleína por cromatografia a gás	39
Figura 16 - Curva de calibração para quantificação da dioleína por cromatografia a gás	39

Figura 17 - Cromatograma referente à substância de referência trioleína	40
Figura 18 - Cromatogramas referentes às amostras proveniente de reações de glicerólise para tempos iguais a 0 e 12 hs	41
Figura 19 - Cromatograma referente a uma amostra de ácido oleico comercial.....	42
Figura 20 - Cromatograma referente à substância de referência dipalmitina	44
Figura 21 - Variação da fração mássica de glicerol, wG_{LI} , em função do tempo para ensaios com reações não destrutivas	45
Figura 22 – Variação da fração mássica de glicerol, wG_{LI} , em função do tempo para ensaio com reações destrutivas	46
Figura 23 - Comparação entre a variação da fração mássica de glicerol, wG_{LI} , em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas e não destrutivas	47
Figura 24 – Gráfico comparativo dos valores (d. p. média) w G_{LI} para os ensaios com reações não destrutivas e destrutivas	48
Figura 25 - Variação da fração mássica de MAGs, wMAG , em função do tempo para ensaio com reações não destrutivas.....	50
Figura 26 – Variação da fração mássica de MAGs, wMAG , em função do tempo para ensaio com reações destrutivas.....	51
Figura 27 – Comparação entre a variação da fração mássica de MAG, wMAG , em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas e não destrutivas	52
Figura 28 - Gráfico comparativo dos valores (d. p. média) w MAG para os ensaios com reações não destrutivas e destrutivas	53
Figura 29 - Comparação entre a variação do número de moles de glicerol consumido e de MAG formado em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas.....	54
Figura 30 – Relação entre o consumo de glicerol e a formação de MAG	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas do glicerol.....	6
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos do AOEV em porcentagem (média ± d.p.)	8
Tabela 3 – Composição percentual de TAGs do AOEV (média ± d.p.) .	8
Tabela 4 - Perfil dos ácidos graxos esterificados na posição sn-2 das molécula de TAG do AOEV em porcentagem (média ± DP)	9
Tabela 5 – Composição do derivado enzimático Lipozyme [®] TL IM....	19
Tabela 6 – Comparação entre o perfil de ácidos graxos da amostra do azeite de oliva e o estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA, 1999; MAPA, 2012).....	31
Tabela 9 –Distribuição dos valores da razão (<i>d. p. média</i>)w MAG para os ensaios cinéticos com reações não destrutivas e destrutivas.....	53
Tabela 10 - Massas molares das espécies químicas envolvidas na reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – área

AOCS – American Oil Chemists' Society

AOEV – azeite de oliva extra-virgem

ASTM – American Society for Testing and Materials

CMC – concentração micelar crítica

C – concentração

CSTR – reator contínuo de tanque agitado (*Continuous Stirring Tank Reactor*)

DAG – diacilglicerol

d.p. – desvio padrão

Gli - glicerol

m – massa

M – massa molecular

MAG – monoacilglicerol

n – número de mol

P.I. – padrão interno

S.R. – substância de referência

t – tempo

TAG – triacilglicerol

v – velocidade

w – fração mássica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. O GLICEROL	5
2.2. O AZEITE DE OLIVA	7
2.3. OS ACILGLICERÓIS.....	9
2.3.2. Os monoacilgliceróis	10
2.4. PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	11
2.5. AS LIPASES	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAIS	19
3.1.1. Substratos.....	19
3.1.2. Derivado enzimático.....	19
3.1.3 Padrões e derivatizantes para cromatografia	19
3.1.4. Gases para cromatografia.....	20
3.1.5. Outros reagentes.....	19
3.1.6. Aparato experimental	20
3.2 MÉTODOS	20
3.2.1. Determinação do perfil de ácidos graxos do azeite de oliva. 20	
3.2.2 Ensaio cinéticos da reação de glicerólise.....	21
3.2.2.1. Ensaio cinéticos com reações não destrutivas.....	22
3.2.2.2. Ensaio com reações destrutivas	24
3.2.3 Determinação da concentração de glicerol.....	25
3.2.3.1. Construção da Curva de Calibração	25

3.2.3.2 Análise de glicerol nas amostras	26
3.2.4. Determinação dos acilgliceróis por cromatografia a gás.....	27
3.2.4.1. Construção da curva de calibração.....	28
3.2.4.2 Análise de acilgliceróis nas amostras.....	29
3.2.5. Cálculo do rendimento em MAG da reação de glicerólise do óleo de oliva extra-virgem	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	31
4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO GLICEROL.....	32
4.3. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ACILGLICERÓIS	35
4.3.1. Estabelecimento das curvas de calibração para quantificação dos acilgliceróis.....	37
4.3.2. Interpretação dos cromatogramas referentes às amostras provenientes da reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem	40
4.4. ACOMPANHAMENTO DOS ENSAIOS CINÉTICOS DA GLICERÓLISE DO AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM	44
4.4.1. Acompanhamento dos ensaios cinéticos através da quantificação do glicerol residual.....	45
4.4.1.1. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos realizados com reações não destrutivas	45
4.4.1.2. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos com reações destrutivas	46
4.4.1.3. Comparação entre os resultados fornecidos pelos ensaios cinéticos com reações não destrutivas e destrutivas em função do consumo de glicerol	47
4.4.2. Acompanhamento dos ensaios cinéticos através da quantificação dos acilgliceróis.....	49

4.4.2.1. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos realizados com reações não destrutivas.....	49
4.4.2.2. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos com reações destrutivas	50
4.4.2.3. Comparação entre os resultados obtidos para ensaios com reações não destrutivas e ensaios com reações destrutivas em função da quantificação dos acilgliceróis	51
4.4.3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do acompanhamento da reação através da quantificação de glicerol consumido e de MAGs formados	53
4.5. ANÁLISE DO RENDIMENTO REAL DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE DO AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM EM FUNÇÃO DA FORMAÇÃO DE MAG	55
5. CONCLUSÃO	59
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

É inegável a importância da química na história da humanidade. Há registros de que os Sumérios (10 000 a.C.) já faziam uso de uma espécie de sabão preparado com cinzas e óleos vegetais. No mundo moderno, ao mesmo tempo que a sociedade usufrui das benesses dos produtos atuais, a Indústria Química é vista como vilã: poluidora, consumidora de elevadas somas de recursos hídricos e energéticos, produtora de e responsável por produtos inseguros chegarem até o consumidor final. Além disso, grande parte dos ingredientes utilizados na indústria química é obtida por via petroquímica e pela síntese orgânica tradicional, por isso, podem conter traços de compostos tóxicos mesmo após etapas de purificação.

A fim de mitigar esses males, floresceram esforços como o *Responsible Care*, *Product Stewardship* e a chamada Química Verde. Nesse cenário, os bioprocessos destacam-se como uma tecnologia para a produção de compostos mais seguros, biodegradáveis, obtidos com menos consumo energético, com menor geração de coprodutos e que utilizem matérias-primas de origem renovável. A tecnologia enzimática ganha destaque neste contexto, pois as enzimas viabilizam reações orgânicas sob condições de temperatura e pressão amenas, geram menos ou nenhum coproduto e como são moléculas de origem biológica, os efluentes dos processos por elas catalisados são facilmente biodegradados.

Dentre as enzimas utilizadas em escala industrial, as lipases possuem importância devido a sua estabilidade e versatilidade. São empregadas principalmente na indústria oleoquímica, como na produção de biodiesel (reação de transesterificação) e na transformação de óleos e gorduras com o objetivo de se obterem lipídios estruturados que possuam características funcionais e nutricionais desejáveis (interesterificação).

O presente trabalho insere-se no contexto acima e apresenta um estudo sobre a glicerólise enzimática de óleos e gorduras, uma reação de transesterificação na qual uma fonte de triacilgliceróis reage com o glicerol formando monoacilgliceróis e diacilgliceróis, emulsificantes usualmente conhecidos como monoglicerídeos e diglicerídeos. Em escala industrial, esta reação é catalisada por álcalis sob temperaturas de 200 a 250 °C. Devido a tais condições reacionais, o produto final requer etapas de neutralização e purificação, apresenta coloração escura, sabor residual de queimado e os ácidos graxos insaturados dos óleos utilizados são convertidos a saturados. A aplicação de enzimas como

biocatalisadores permite conduzir a reação em condições reacionais brandas, obtendo-se um produto final com melhores propriedades sensoriais e funcionais.

Como objeto de estudo para este trabalho, selecionou-se a reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem catalisada pelo derivado enzimático comercial Lipozyme TL IM[®].

Conforme será discutido posteriormente, a auto-oxidação de lípidios gera peróxidos que agem como inibidores da enzima. O azeite de oliva extra-virgem possui elevada estabilidade frente a auto-oxidação, pois é rico em polifenóis e tocoferóis que são antioxidantes naturais e foi portanto selecionado como fonte de triacilgliceróis.

Quanto a seleção do biocatalisador, buscou-se utilizar uma lipase imobilizada, para facilitar sua separação do meio reacional, que fosse comercialmente disponível e de baixo custo. O preparado enzimático Lipozyme TL IM[®] preenche esses requisitos, ademais, embora seja bastante empregado em reações de interesterificação, hidrólise e produção de biodiesel, até o momento, há poucos estudos sobre seu emprego na reação de glicerólise. O biocatalisador Lipozyme TL IM[®] consiste na enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em um suporte de sílica hidrófilo, isto é, o suporte possui afinidade com o glicerol, desta forma deve-se trabalhar com pequenas quantidades de 1,2,3-propanotriol, pois a adsorção do poliálcool na matriz hidrófila da lipase provoca a formação de grânulos e aglomerados do biocatalisador que levam a oclusão do sítio ativo da enzima. Este fenômeno é o responsável pela lacuna quanto ao uso da Lipozyme TL IM[®] na catálise de reações de glicerólise.

Assim, o presente trabalho tem o intuito de explorar o uso de uma enzima imobilizada comercial de baixo custo e fornecer elementos que contribuam para o desenvolvimento de processos que viabilizem o uso comercial de enzimas na produção de emulsificantes mono e diacilgliceróis. Na outra ponta deste esforço, devido a complexidade química inata ao meio reacional, propõem-se também desenvolver e elucidar metodologias analíticas para o acompanhamento das reações de glicerólise.

1.1. OBJETIVOS

- Elucidar aspectos da reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem catalisada por uma enzima imobilizada comercial de baixo custo, a saber, Lipozyme TL IM[®] e gerar elementos que sirvam de base para o desenvolvimento de um processo

economicamente viável para a obtenção de emulsificantes mono e diacilgliceróis via catálise enzimática.

- Desenvolver e elucidar aspectos técnicos e teóricos de metodologias analíticas que permitam o acompanhamento da reação de glicerólise.

1.1.1 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia para acompanhar a reação em função do consumo de glicerol.
- Implementar e elucidar metodologia para a quantificação dos acilgliceróis formados e consumidos durante a reação de glicerólise.
- Comparar os resultados obtidos através de ensaios cinéticos realizados com reações não destrutivas e destrutivas.
- Obter velocidades iniciais de reação, tempo de equilíbrio e rendimento da reação de glicerólise do óleo de oliva extra para ensaios com reações não destrutivas e destrutivas.
- Verificar o fenômeno de adsorção do glicerol no suporte do derivado enzimático.
- Determinar a velocidade inicial, o tempo de equilíbrio e o rendimento da reação de glicerólise sob determinadas condições reacionais.

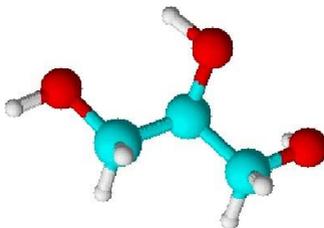
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O GLICEROL

O glicerol, ou 1,2,3-propanotriol de acordo com a nomenclatura IUPAC, é uma substância higroscópica, viscosa, incolor, inodora e de sabor adocicado. O termo glicerol aplica-se somente à substância química pura, enquanto o termo glicerina refere-se a produtos comerciais com teor de glicerol superior a 95%.

Este poliálcool pode ser obtido de fontes petroquímicas, como a partir da oxidação do propileno (MATAR; HATCH, 2001); ou renováveis, através de reações de saponificação, hidrólise e transesterificação de óleos e gorduras. Com o crescimento da indústria do biodiesel, grandes quantidades de glicerol, oriundas da transesterificação de lipídios, foram disponibilizadas no mercado, o que impulsionou a pesquisa e desenvolvimento de processos químicos e biotecnológicos que convertam esta *commodity* em produtos de química fina (LEN; LUQUE, 2014; QUISPE; CORONADO; CARVALHO, 2013; TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013).

Figura 1 - Estrutura molecular do glicerol



Fonte: O Autor.

● átomo de carbono (C); ● átomo de oxigênio (O); ● átomo de hidrogênio (H)

As propriedades físico-químicas do glicerol, cuja estrutura molecular é mostrada na Figura 1, são governadas pela presença dos três grupos hidroxilas em sua molécula, formando uma extensa rede de pontes de hidrogênio que é responsável pelos elevados valores de viscosidade, densidade e pontos de ebulição deste poliálcool (Tabela 1). O 1,2,3-propanotriol é insolúvel em hidrocarbonetos e solventes organoclorados, ligeiramente solúvel em álcoois superiores, éter e dioxano. Devido a sua natureza polar, é completamente solúvel em água, álcoois de cadeias curtas (metanol, etanol, iso-propanol, n-butanol, 2-butanol e 2-metil-2-butanol), e bom solvente para muitas substâncias, entre as quais iodo, bromo e fenol (QUISPE; CORONADO;

CARVALHO, 2013). A presença dos grupos álcoois primários e secundário conferem grande versatilidade e reatividade à molécula do glicerol, pois esses grupos podem ser substituídos por outros grupos funcionais e tornam o glicerol suscetível a diferentes processos de transformação química tais como: oxi-redução (oxidação e hidrogenólise), catálise ácida (eterificação e esterificação), desidratação e oligomerização (LEN; LUQUE, 2014) .

Tabela 1 - Propriedades físicas do glicerol

Propriedade Física	Valor (unidade)
Massa molecular	92,02 g.mol ⁻¹
Densidade	1,261 g.cm ³
Viscosidade	1,5 Pa.s
Ponto de ebulição	290 °C
Ponto de fusão	18 °C
Calor específico	2435 J.g ⁻¹
Tensão superficial	53,4 mN.m ⁻¹

Fonte: Quispe; Coronado; Carvalho (2013).

Mais de 1500 aplicações finais são conhecidas para o glicerol. Por ser considerado uma substância não irritante, é usado em cosméticos, produtos de cuidados pessoais, formulações farmacêuticas e produtos alimentícios. Não é nocivo ao meio ambiente e sob condições ordinárias de armazenamento, é quimicamente estável, exceto em contato com agentes oxidantes fortes como o cloreto de potássio (LEN; LUQUE, 2014; TAN; ABDUL AZIZ; AROUA, 2013). Devido às suas propriedades químicas, o glicerol e alguns de seus derivados são considerados solventes ambientalmente amigáveis, de modo que seu uso como um meio alternativo para reações orgânicas é uma área de pesquisa bastante promissora. Por ser polar e imiscível com hidrocarbonetos e éteres, é adequado para catálise bifásica e separação de produtos por extração líquido-líquido. Além disso, devido ao seu elevado ponto de ebulição pode ser utilizado como meio em reações que requerem temperaturas elevadas. Devido ao crescente apelo por processos ambientalmente seguros e/ou que utilizem matéria primas de origem não petroquímica, tem-se enfatizado o desenvolvimento de processos que utilizem o glicerol como precursor de produtos de maior valor agregado (DÍAZ-ÁLVAREZ et al., 2011), como por exemplo, a bioconversão do glicerol através de processos fermentativos (NICOL; MARCHAND; LUBITZ, 2012).

2.2. O AZEITE DE OLIVA

O azeite de oliva extra-virgem (AOEV) é extraído dos frutos inteiros da Oliveira, *Olea europaea L.*, por processos exclusivamente mecânicos, por isso, retém compostos de interesse biológico desenvolvidos pelos frutos em resposta ao estresse ambiental (COVAS et al., 2006; FRANKEL et al., 2013). O consumo de AOEV está associado a menor incidência de doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos e cânceres (COVAS et al., 2006; NEWMARK, 2006). Seu sabor e aroma característicos devem-se a presença de aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e polifenóis (DHIFI et al., 2005; FRANKEL et al., 2013).

O processo de produção do AOEV é composto pelas etapas de colheita, lavagem, prensagem, malaxação da pasta de oliva, centrifugação, armazenagem e filtração. A prensagem, malaxação, armazenagem, e filtração são etapas críticas no tocante a preservação dos compostos fenólicos do AOEV (FRANKEL et al., 2013).

Como todo óleo vegetal, o AOEV é composto majoritariamente por triacilgliceróis (TAGs), que correspondem a cerca de 98% de sua composição. Como compostos minoritários o AOEV apresenta esteróis (destaque para o sitoesterol), hidrocarbonetos (destaque para o esqualeno), compostos voláteis, terpenos, água, glicerol livre, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) e mais de 20 espécies de compostos fenólicos (DAIS; HATZAKIS, 2013).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, relacionados à qualidade sensorial e nutricional dos alimentos de origem vegetal, que devido à sua ação anti radicais livres, previnem a auto-oxidação dos ácidos graxos insaturados do AOEV e prolongam sua vida de prateleira. (HASHIM et al., 2005). O perfil de compostos fenólicos do AOEV é influenciado pelo cultivar da oliveira, localização, condições ambientais, estágio de colheita e processo de extração do azeite (APARICIO; LUNA, 2002; MONASTERIO; FERNÁNDEZ; SILVA, 2013)

O AOEV também é rico em tocoferóis e tocotrienóis, biomoléculas conhecidas como vitamina E. Assim como os compostos fenólicos, essas moléculas possuem atividade anti-oxidante e previnem a rancidez oxidativa de óleos e gorduras (MONASTERIO; FERNÁNDEZ; SILVA, 2013).

Com relação a fração de TAGs, existem três parâmetros que permitem caracterizar o AOEV quanto ao seu estado de pureza e origem, incluindo cultivar, são eles: O perfil de ácidos graxos, a composição em função das diferentes moléculas de TAG que o

compõem e o perfil dos ácidos graxos esterificados na posição sn-2 da molécula de TAG (ARANDA et al., 2004). As Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4 mostram o perfil de ácidos graxos esterificados na posição sn-2 para amostras de AOEV oriundos de quatro cultivares.

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos do AOEV em porcentagem (média ± d.p.)

Ácido Graxo	Variedade			
	Cornicabra	Picual	Hojiblanca	Arbequina
(P) - C 16:0	9,22 ± 0,17	10,6 ± 0,78	9,68 ± 1,00	13,7 ± 0,99
(Po) - C 16:1	0,77 ± 0,11	0,91 ± 0,13	0,73 ± 0,15	1,92 ± 0,24
(S) - C 18:0	3,36 ± 0,29	3,49 ± 0,47	3,48 ± 0,21	2,03 ± 0,19
(O) - C 18:1	80,4 ± 0,96	78,9 ± 1,62	76,6 ± 1,54	70,6 ± 1,70
(Li) - C 18:2	4,46 ± 0,57	4,53 ± 1,14	7,51 ± 1,13	10,3 ± 0,87
(Ln) - C 18:3	0,62 ± 0,08	0,67 ± 0,03	0,75 ± 0,04	0,61 ± 0,05

Fonte: Aranda et al. (2004).

d.p., desvio padrão; P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; Li, linoleico; Ln, linolênico.

Tabela 3 – Composição percentual de TAGs do AOEV (média ± d.p.)

TAG	Variedade			
	Cornicabra	Picual	Hojiblanca	Arbequina
OOO	51,7 ± 1,84	48,5 ± 1,63	45,4 ± 2,94	35,5 ± 2,61
SOL + POO	20,8 ± 1,33	22,8 ± 1,37	20,1 ± 1,63	23,2 ± 0,89
OLO + LnPP	7,79 ± 0,91	7,16 ± 1,10	11,72 ± 1,6	13,93 ± 0,78
OLA+SOO	6,76 ± 0,58	6,87 ± 0,7	6,99 ± 0,53	3,42 ± 0,38
POL + SLL	2,69 ± 0,32	2,86 ± 0,43	4,26 ± 0,66	7,72 ± 0,78
PoOO	1,15 ± 0,2	1,38 ± 0,26	0,77 ± 0,32	1,49 ± 0,31

Fonte: Aranda et al. (2004).

d.p., desvio padrão; P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; Li, linoleico; Ln, linolênico.

Tabela 4 - Perfil dos ácidos graxos esterificados na posição sn-2 das moléculas de TAG do AOEV em porcentagem (média \pm DP)

Ácido Graxo	Variedade			
	Cornicabra	Picual	Hojiblanca	Arbequina
(P) - C 16:0	0,57 \pm 0,7	0,53 \pm 0,07	0,45 \pm 0,07	0,73 \pm 0,06
(Po) - C 16:1	0,53 \pm 0,9	0,67 \pm 0,12	0,42 \pm 0,15	1,17 \pm 0,29
(S) - C 18:0	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01
(O) - C 18:1	93,4 \pm 0,65	93,4 \pm 0,86	89,6 \pm 0,88	85,0 \pm 0,81
(Li) - C 18:2	4,96 \pm 0,68	4,82 \pm 1,01	8,71 \pm 0,87	12,1 \pm 0,74
(Ln) - C 18:3	0,34 \pm 0,06	0,33 \pm 0,01	0,51 \pm 0,06	0,53 \pm 0,09

Fonte: Aranda et al. (2004).

d.p., desvio padrão; P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; Li, linoleico; Ln, linolênico.

2.3. OS ACILGLICERÓIS

Os acilgliceróis, também conhecidos como glicerídeos, são ésteres de glicerol, principais constituintes dos óleos e gorduras e conforme o número de grupos acilas que possuem são denominados triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs) (IUPAC, 1997). Apesar de serem constituintes minoritários dos óleos e gorduras, os DAGs e MAGs são formados por uma porção apolar, a cadeia de ácido graxo, e uma porção polar, os grupos hidroxilas, razão pela qual possuem atividade superficial, e são considerados surfactantes não iônicos com propriedades emulsificantes. Portanto, a transformação de óleos e gorduras para obtenção de emulsificantes é um processo de grande interesse comercial.

Embora sejam moléculas superficialmente ativas, os DAGs apresentam poder emulsionante inferior aos MAGs, mas como são coprodutos do processo de obtenção de MAGs e devido aos custos de separação das duas frações, os DAGs são comumente comercializados em misturas conhecidas como Mono-diglicerídeos. Entretanto, a publicação de estudos que reportam a associação entre o consumo de óleos ricos em DAGs e a diminuição das taxas de triglicerídeos e do acúmulo de gordura corporal (KONDO et al., 2003; YUAN et al., 2010) impulsionou a pesquisa sobre a produção destes compostos via catálise enzimática (KRISTENSEN; XU; MU, 2005; WANG et al., 2011).

2.3.2. Os monoacilgliceróis

Dentre as três moléculas derivadas da acilação do glicerol, os MAGs, considerados emulsificantes hidrófobos (SZELAG, 1999), possuem maior atividade superficial. Os MAGs são funcionais apenas em sua forma cristalina α , atingida quando esse são aquecidos entre 5 e 10°C acima do seu ponto de fusão. Usualmente, a quantidade necessária de MAG para obtenção de uma emulsão estável é da ordem de 0,5% em massa (FELTES et al., 2013).

O método economicamente viável para a produção de MAGs e DAGs é através da glicerólise de óleos e gorduras, isto é, a transesterificação entre moléculas de TAGs e glicerol sob altas temperaturas e na presença de catalisadores alcalinos, resultando em uma mistura de DAGs e dos isômeros α e β MAGs, isto é, sn-1 e sn-2 MAGs na proporção de 9:1 respectivamente. Embora a estequiometria da reação prediga a proporção de 1:2 entre α e β monoacilgliceróis, devido a efeitos estéricos o grupo acila migra da posição β para a α . A fonte de TAGs utilizada na fabricação de MAGs pode ser de origem vegetal ou animal, e pode ter sido submetida a processos de hidrogenação ou fracionamento para se obter o nível desejado de saturação das cadeias de ácidos graxos. O tipo de TAG utilizado determina características do emulsificante tais como composição de ácidos graxos, índice de iodo, ponto de fusão etc. Através de um processo de destilação da mistura de MAGs e DAGs, são obtidos MAGs concentrados em até 90% (HASENHUETTL, 2008a; LEE et al., 2014).

Estes emulsificantes e seus derivados (MAGs etoxilados, ésteres acético, láctico, cítrico e diacetil tartárico de MAGs) são os mais utilizados na indústria alimentícia (SARNEY; VULFSON, 1995). De acordo com a FDA – *Food and Drug Administration-USA* - os MAGs possuem *status* de GRAS - *Generally Recognized as Safe* – pois não apresentam efeitos colaterais se ingeridos e não causam irritações cutâneas ao contrário de muitos emulsificantes aniônicos.

Na indústria de alimentos, os MAGs são utilizados em produtos de panificação para reforçar a estrutura do glúten e prolongar o frescor do produto (LEE et al., 2014). Também são adicionados a sorvetes como emulsionantes e estabilizantes, em margarinas, produtos lácteos, doces, molhos etc. Atuam como clarificadores de bebidas pois promovem a dispersão de partículas. Na indústria de cosméticos, são utilizados como agentes de texturização e para melhorar a consistência de cremes e loções. Devido às suas propriedades como lubrificantes e plastificantes são aplicados, na produção de plásticos e na formulação de

óleos lubrificantes para diferentes tipos de máquinas (KAHVECI et al., 2009) Na indústria farmacêutica, são empregados como ligantes em comprimidos e como emolientes para medicamentos de liberação transdérmica (FELTES et al., 2013; KAEWTHONG et al., 2005). A monooleína, por exemplo, um MAG cujo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) é igual a 3,8, é empregada na forma de partículas nanoestruturadas para a liberação de medicamentos, em biossensores, possui diversas aplicações em biotecnologia e ciências médicas, como a cristalização de membranas proteicas, em géis de eletroforeses para substâncias anfífilas e em complexos DNA/lipídio utilizados em terapias genéticas (KULKARNI et al., 2011)

MAGs e seus derivados também possuem atividade antimicrobiana. MAGs de arginina são surfactantes catiônicos que exibem baixa toxicidade e atividade antimicrobiana similar a de surfactantes catiônicos convencionais (PÉREZ et al., 2004). A monolaurina também possui excelente atividade antibiótica, mas não afeta a saúde do consumidor. Estudos determinaram a atividade inibitória mínima deste MAG de ácido láurico contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e constataram que a atividade antibacteriana da monolaurina é reduzida na presença de amidos e gorduras, mas mantém-se intacta na presença de proteínas (ZHANG et al., 2009).

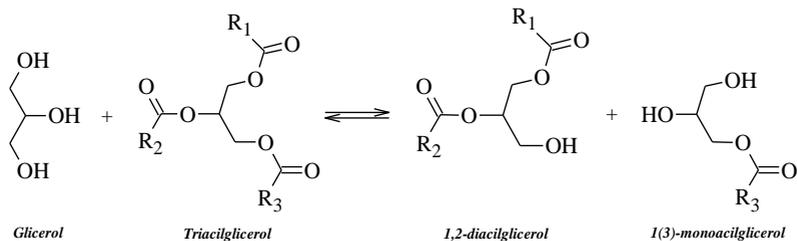
2.4. PRODUÇÃO DE MONO E DIACILGLICERÓIS POR CATÁLISE ENZIMÁTICA

Na glicerólise de óleos, ocorre uma reação de transesterificação na qual os grupos acilas da molécula de TAG substituem os grupos hidroxilas na molécula do glicerol produzindo uma molécula de MAG e outra de DAG, conforme representado na Figura 2. Porém, estudos relatam que quando catalisada por enzimas, o mecanismo da reação de glicerólise ocorre através da hidrólise das moléculas de TAG que libera ácido graxos para posterior formação da ligação éster entre o ácido graxo liberado e o glicerol (CORREIA; FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2011; FERREIRA-DIAS; DA FONSECA, 1995).

Um aspecto importante da glicerólise de óleos vegetais, frente a outros métodos para obtenção de MAGs e DAGs, é a possibilidade de selecionar-se a fonte de TAG com base em seu perfil de ácidos graxos. Haja vista que vários desses compostos possuem efeitos benéficos para a saúde, pode-se esperar que seus respectivos MAGs e DAGs apresentem propriedades funcionais. De fato, um estudo com MAGs derivados do ácido oleico, demonstrou que a monooleína possui

propriedades antioxidantes, antidiabéticas e antiaterogênica (CHO, 2010).

Figura 2 - Representação da reação de glicerólise de óleos e gorduras



Fonte: O autor.

R_1 , R_2 e R_3 representam a cadeia do ácido graxo.

Alguns óleos bastante estudados na literatura são os óleos de palma (H-KITTIKUN; KAEWTHONG; CHEIRSILP, 2008; JUNIOR et al., 2012; KAEWTHONG et al., 2005), soja (WANG et al., 2011) (LIU et al., 2012) (REMONATTO et al., 2015), oliva (FERREIRA-DIAS; DA FONSECA, 1995; ROSU et al., 1997; VOLL et al., 2011) e canola (KRISTENSEN; XU; MU, 2005; REZAEI; TEMELLI, 2000). Também têm sido explorados óleos não comestíveis, como o óleo de babaçu (TEIXEIRA et al., 2014), e alguns óleos típicos de certas regiões como o óleo de camélia (ZENG et al., 2010), planta muito cultivada no oriente para o preparo de chás.

Yamane e seu grupo foram os precursores da glicerólise enzimática, iniciando a publicação de diversos artigos em meados dos anos 80 e impulsionando muitos pesquisadores a estudar diversas estratégias que viabilizassem esta reação. Nos parágrafos seguintes são revistos alguns destes estudos.

Uma contribuição importante para a compreensão da reação de glicerólise catalisada por enzimas foi o estudo do efeito de peróxidos graxos durante a reação enzimática. Óleos contendo ácidos graxos polinsaturados são auto-oxidados quando expostos ao ar, formando peróxidos graxos. Para avaliar o efeito do grau de oxidação do composto lipídico no comportamento da reação de glicerólise, foram realizados experimentos com óleo de açafrão com diferentes graus de oxidação, utilizando lipase de *Pseudomonas fluorescens* como catalisador. Para reações em batelada verificou-se uma relação linear inversa entre a taxa

de reação inicial e o valor de peróxido do óleo (OHTA; YAMANE; SHIMIZU, 1989).

Ainda no início das investigações sobre a glicerólise enzimática, foram testadas algumas estratégias para incrementar o rendimento em MAG das reações: 1) seleção de diversas enzimas comercialmente disponíveis; 2) comparação entre o uso de misturas de lipases versus o uso de uma única lipase; 3) programação da temperatura de reação.

A programação de temperatura consiste em após algumas horas de reação, baixar a temperatura de forma que as moléculas de MAG já formadas solidifiquem-se, deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação do produto de interesse. Utilizando-se dessa técnica, foi possível obter uma concentração de 90% em massa de MAGs ao fim das reações de glicerólise de óleo de palma, estearina de palma e gordura bovina catalisadas por lipase de *Pseudomonas sp.*, porém o tempo de incubação a baixa temperatura foi de quatro dias. Verificou-se também que a lipase de *Penicillium camembertii* se mostrou inativa nas condições reacionais estudadas. Porém quando em conjunto com a lipase de *Thermomyces lanuginosus* agiu sinergicamente com esta. Vale ressaltar que o artigo menciona o uso de lipases em pó, mas não menciona que as lipases estejam imobilizadas. (MCNEILL; YAMANE, 1991).

Posteriormente, já empregando técnicas de imobilização, a lipase de *Pseudomonas sp* imobilizada em CaCO_3 permitiu a obtenção de 90% em massa de MAG, utilizando a estratégia de programação de temperatura, após 72 horas de reação, por até cinco ciclos de uso do biocatalisador (ROSU et al., 1997).

A fim de melhorar a miscibilidade entre o glicerol e a matéria lipídica, alguns estudos testaram a utilização de solventes como meio reacional (VOLL et al., 2011; WANG et al., 2011). O estudo do efeito de diversos solventes orgânicos sobre a reação de glicerólise da oleína de palma catalisada pela Lipase PS (uma lipase comercial de *Pseudomonas sp.* da Amano) imobilizada em polipropileno microporoso, encontrou a seguinte condição ótima para a produção de MAG: mistura de acetona/íso-octano 3:1 em volume, concentração de oleína de palma na mistura de solvente de 10% em massa/volume, razão molar glicerol/oleína 8:1, teor de água no glicerol igual a 10%, carga de enzima igual a 50% em massa de oleína e temperatura de 45 °C. Nestas condições ao fim de 24 h de reação, obteve-se 55,75% em massa de MAG e resíduo de 11,75% em massa de TAG (KAEWTHONG; H-KITTIKUN, 2004).

O uso de reatores operados em modo contínuo também foi abordado. A glicerólise da oleína de palma em meio livre de solvente, catalisada por lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em Accurel EP-10 foi conduzida em reatores contínuo de tanque agitado (CSTR) e de leito empacotado durante 96 h. Para o reator de leito empacotado, o rendimento médio em MAG na saída era de 14,01%, e obteve-se produtividade de $1,05 \times 10^{-2}$ gramas de $\text{MAG} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ com ligeira queda do rendimento no decorrer do tempo. Para o CSTR obteve-se rendimento médio em MAG de 14,34% e produtividade de $1,07 \times 10^{-2}$ gramas de $\text{MAG} \cdot \text{U}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Os autores não reportaram neste estudo a produtividade de um sistema em batelada equivalente, de forma que não foi possível concluir se para este caso a reação contínua é mais vantajosa (KAEWTHONG et al., 2005).

Outra linha de estudo no campo da glicerólise enzimática é a seleção de biocatalisadores para um determinado meio reacional. A lipase de *Candida rugosa*, e as preparações enzimáticas comerciais Lipozyme TL IM e Novozym 435 foram testadas para catalisar a glicerólise do óleo de canola sob vácuo. Constatou-se que após 6 h de reação, os preparados enzimáticos comerciais Lipozyme TL IM e Novozym 435 promoveram a formação de 40 e 50% em mol de DAG respectivamente, sendo que a partir de 3 h de reação o percentual de produto formado já era bem próximo destes valores. Em contrapartida, a lipase de *Candida rugosa* mostrou-se quase inativa (WEBER; MUKHERJEE, 2004).

O desempenho dos preparados enzimáticos Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435 foi avaliado durante a glicerólise óleo de girassol em meio de solvente orgânico. Os preparados Novozym 435 e Lipozyme TL IM promoveram a síntese de 71 e 67% em massa de MAG. Embora o biocatalisador Lipozyme TL IM tenha apresentado bom desempenho, a mistura reacional tornou-se um fluido semissólido que dificultou a recuperação da enzima. A razão para esse fenômeno foi atribuída ao caráter hidrófilo da matriz da enzima. Prosseguiu-se o estudo empregando o preparado enzimático Novozym 435. Na reação em batelada, atingiu-se o equilíbrio após 2 h de reação, com rendimento em MAG de 70% em massa e conversão quase total dos TAGs em produtos. Em reator de leito empacotado a reação foi mais rápida, atingido rendimento em MAG de 70% em massa para tempos de residência entre 30 e 40 minutos (YANG et al., 2005).

Freitas, L. (2009) pesquisou diferentes estratégias para produção de MAGs a partir do óleo de babaçu. Como catalisador utilizou a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz de polissiloxano álcool

polivinílico (SiO₂-PVA). Foram realizadas reações de glicerólise descontínuas em reator encamisado e de micro-ondas, e contínua em reator de leito fixo e fluidizado. A relevância do controle de formação de peróxidos foi analisada a partir do uso de atmosfera inerte e da adição de antioxidantes ao meio reacional. O reator descontínuo propiciou produtividades mais elevadas de MAG, 88 mg de MAG.g⁻¹ meio reacional. h⁻¹. O emprego de atmosfera inerte por injeção de N₂ mostrou-se fundamental para melhorar o rendimento da reação em MAGs. Quando utilizada na reação em reator de leito fixo incrementou em 25% a produtividade do sistema em relação ao meio isento de N₂ alcançando o valor de 52 mg de MAG.g⁻¹ meio reacional.h⁻¹. A condução da reação descontínua em reator de micro-ondas bem como a adição de antioxidantes ao meio reacional resultaram em maior formação de DAG do que de MAG.

Solventes orgânicos são produtos tóxicos, e os órgãos reguladores proíbem o uso da maioria desses compostos em produtos alimentares. Desta forma surgiu a tendência de buscar alternativas para melhorar a miscibilidade entre o glicerol e os óleos.

A fim de melhorar a transferência de massa entre os substratos, Valério et al. (2010) testaram diversos surfactantes de grau alimentício na glicerólise do óleo de oliva catalisada pela lipase imobilizada Novozym 435 sob condições e tempo de reação (2 h) pré-determinados. Foram selecionados Tween 65 e Triton X-100 como melhores surfactantes. Após a seleção de surfactantes, foi realizado um planejamento experimental para otimizar a produção de MAG e DAG. Foram fixadas a seguintes condições de reação: temperatura igual a 70 °C, agitação de 660 rpm e 2 h de reação. As variáveis de estudo foram: concentração de enzima, concentração de surfactante e razão molar glicerol/óleo. As condições ótimas estabelecidas foram as mesmas para ambos os surfactantes e levaram a quantidades de MAG e DAG de 43 e 37% em massa para o Tween 65 e Triton X-100 respectivamente.

Um resultado bastante interessante sobre o uso de surfactantes diz respeito a glicerólise do óleo de peixe catalisada pela lipase comercial Lipozyme RM IM na presença e ausência dos surfactantes Tween 65, 80 ou 85. Verificou-se que para as reações com Tween 65, 85 e de controle (sem surfactante) obteve-se cerca de 80% de conversão de TAGs e o equilíbrio foi atingido após 4 h de reação. Constatou-se também que o meio reacional com Tween 80 apresentou o maior nível de peróxidos, sendo o meio que apresentou menor velocidade de reação e cuja enzima após recuperação apresentou o maior percentual de perda de atividade.

Este resultado reitera a importância de prevenir a oxidação lipídica durante a reação de glicerólise (SANTOS et al., 2013).

A modelagem matemática também foi utilizada para elucidar a cinética da reação de glicerólise do óleo de oliva catalisada pela Novozym 435 em meio com solvente terc-butanol. O modelo considerou as reações de hidrólise e esterificação que podem ocorrer devido a presença de água no glicerol e mostrou-se bastante satisfatório quando comparado com dados experimentais. Obtiveram-se bons rendimentos em MAG e DAG, 60% e 50% em massa após 12 h de reação. O estudo demonstrou que maiores razões glicerol/óleo favorecem a formação de MAG, e menores razões glicerol/óleo favorecem a formação de DAG (VOLL et al., 2011).

O ultrassom também foi utilizado na tentativa de superar o problema da miscibilidade entre o glicerol e o óleo. Essa técnica ambientalmente benigna possui aplicações de interesse na química orgânica, na engenharia bioquímica e biotecnologia (FIAMETTI et al., 2012). A ação do ultrassom nos líquidos provoca o efeito de cavitação, isto é, o colapso de bolhas perto da fronteira de duas fases imiscíveis incrementando a transferência de massa entre os reagentes (REMONATTO et al., 2015).

Através do uso de uma fonte de ultrassom acoplada ao reator durante a reação de glicerólise do azeite de oliva e glicerol, catalisada pela lipase imobilizada Novozym 435, foi alcançado 70% de conversão de TAGs em MAGs e DAGs (FIAMETTI et al., 2012).

Durante as reações de glicerólise dos óleos de soja e canola catalisadas por Novozym 435, sob $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, razão molar glicerol/óleo de 0,8:1, concentração de enzima de 10% em massa e potência de ultrassom de 130 W, obteve-se 72% em massa de produtos (MAGs e DAGs) após 3 h de reação com o óleo de soja, e 75% em massa de produtos (MAGs e DAGs) após 2 h de reação com o óleo de canola (REMONATTO et al., 2015).

Diante do exposto acima, verifica-se que a pesquisa sobre glicerólise enzimática reporta diversos sistemas reacionais e estratégias para incrementar o rendimento da reação de glicerólise de óleos e gorduras. Contudo, nota-se uma lacuna no tocante a compreensão dos fenômenos de transferência de massa e a processos passíveis de aplicação industrial.

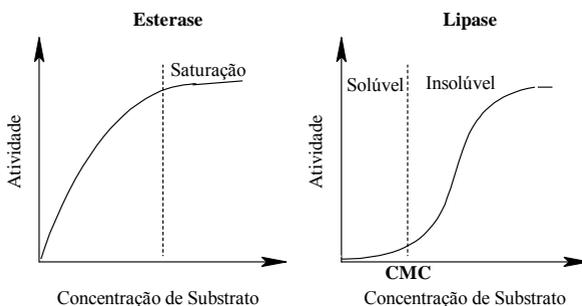
2.5.AS LIPASES

Dos trabalhos que investigam a glicerólise enzimática de óleos, quase sua totalidade emprega lipases. Estas enzimas são classificadas

como hidrolases (EC 3.1.1.3) que atuam sobre a ligação éster de vários compostos, dentre os quais destacam-se os acilgliceróis. São das enzimas mais importantes na indústria biotecnológica devido a sua estabilidade térmica e em presença de solventes orgânicos, por não requererem cofatores, por sua larga especificidade pelo substrato e por exibirem alta enantiosseletividade (CASTRO et al., 2004). Algumas lipases atuam randomicamente sobre as ligações entre o ácido graxo e o glicerol, outras possuem especificidade para algumas posições.

Embora essas macromoléculas possam hidrolisar e formar ligações do tipo éster, seu mecanismo de ação difere do das esterases conforme ilustrado na Figura 3. Enquanto as esterases apresentam uma cinética próxima a de Michaelis-Menten, as lipases não apresentam atividade apreciável enquanto o substrato está solúvel, mas possuem elevada atividade quando a concentração de substrato ultrapassa o limite de solubilidade formando uma fase lipídica (FABER, 2000).

Figura 3 – Comparação entre o comportamento cinético de esterases e lipases

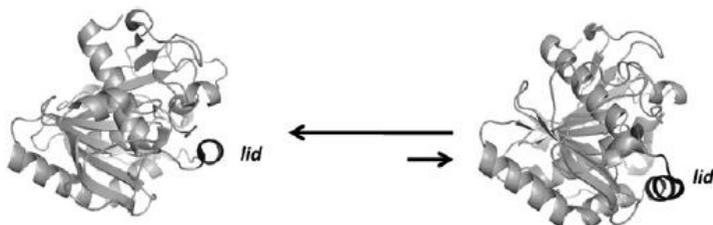


Fonte: Faber (2000).

CMC, concentração micelar crítica.

Tal fenômeno, denominado atividade interfacial, é explicado pelo rearranjo da enzima que em contato com a interface de um sistema bifásico abre uma de suas estruturas, denominada *lid* (tampa) e expõem o sítio ativo da enzima (FABER, 2000). A Figura 4 ilustra a estrutura da enzima de *Thermomyces lanuginosus*, utilizada no preparo do derivado enzimático comercial Lipozyme TL IM[®] e destaca o equilíbrio entre as formas inativas (com o *lid* em sua posição original) e ativa (com o *lid* aberto oferecendo acesso ao sítio ativo da enzima).

Figura 4 – Estrutura da enzima de *Thermomyces lanuginosus*



Fonte: Fernandez-Lafuente (2010).

Uma das razões para que o uso de enzimas como catalisadores de reações na indústria ainda seja limitado é seu custo elevado. Ademais, algumas enzimas apresentam baixa estabilidade em determinadas condições de operação, e sua separação do meio reacional pode resultar em sua inativação. A imobilização desses biocatalisadores viabiliza o seu reaproveitamento e permite melhorar sua estabilidade (ZANIN; MORAES, 2004).

Ao se trabalhar com lipases imobilizadas, deve-se levar em conta a transferência de massa do meio reacional para a superfície e/ou interior do complexo enzima/suporte, bem como a afinidade dos substratos pelo material do suporte. No caso de imobilizações por encapsulamento, maiores razões área/volume aumentam a eficiência da penetração dos substratos nos grânulos do derivado enzimático (CHEIRSILP; JEAMJOUNKHAW; H-KITTIKUN, 2009).

A literatura também reporta que a hidrofobicidade do material utilizado como suporte influencia o desempenho da reação. Brady et al. (1988 apud KAEWTHONG et al., 2005) mencionam que materiais microporosos como Accurel (polipropileno microporoso) melhoram a performance das lipases imobilizadas. Kimura et al. (1983 apud KAEWTHONG et al., 2005) imobilizaram lipases em diferentes suportes orgânicos e inorgânicos e verificaram que aquelas imobilizadas em matrizes hidrófobas apresentaram atividade mais elevada durante a hidrólise de óleo de oliva.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1. Substratos

Como reagentes foram utilizados glicerol da marca VETEC de grau analítico e azeite de oliva extra virgem, marca Andorinha, do qual foram adquiridos, em mercado local, 10 frascos de 500 ml, todos pertencentes ao número de lote 298AL3026923.

3.1.2. Derivado enzimático

Foi utilizado o derivado enzimático comercial Lipozyme TL IM[®] fabricado pela Novozymes. De acordo com a ficha de informações fornecida pelo fabricante, o produto apresenta como atividade característica a hidrólise de ligações ésteres de acilgliceróis, densidade de 0,42 g.ml⁻¹ e apresenta-se sob a forma de um granulado de coloração branca ligeiramente acastanhada. Sua composição é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição do derivado enzimático Lipozyme[®] TL IM

Ingrediente	% m/m
Dióxido de sílica (suporte)	74,6
Lipase	10
Maltodextrina	10
Água	4
Cloreto de sódio	1
Benzoato de sódio	0,2
Sorbato de potássio	0,2

Fonte: *Product data sheet* (Anexo A).

3.1.3 Padrões e derivatizantes para cromatografia

Todos os derivatizantes e padrões cromatográficos, utilizados neste trabalho, foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Para a síntese dos trimetilsililéteres de acilgliceróis foram utilizados os derivatizantes: Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS).

Os padrões cromatográficos utilizados para monooleína e dioleína foram respectivamente: 1-oleil-*rac*-glicerol (produto de código M7765) e dioleilglicerol - mistura dos isômeros 1,2- e 1,3-dioleato de

glicerol - (produto de código D8894). Como padrão interno utilizou-se n-tetradecano de grau analítico.

3.1.4. Gases para cromatografia

Como gás de arraste utilizou-se Hélio 5.0 - padrão G e para formação de chama empregou-se ar sintético 5.0 FID, ambos adquiridos da White Martins.

3.1.5. Outros reagentes

Os reagentes a seguir foram adquiridos de fornecedores diversos, porém sempre de grau analítico: clorofórmio, ácido acético, periodato de sódio, acetilacetona, acetato de amônio, piridina, etanol absoluto, ácido sulfúrico.

3.1.6. Aparato Experimental

O aparato experimental foi constituído por:

- Banho termocriostático com circulação de água Microquímica MQBMB-01;
- Agitador mecânico IKA RW 20;
- Reatores de vidro cilíndricos, encamisados de 40 e 400 ml.
- Espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Hitachi U-2900;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2010;
- Coluna capilar para cromatógrafo à gás modelo RTX-5, 60 m × 0,25 mm, de sílica fundida, com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano;
- Coluna capilar para cromatógrafo à gás modelo HP 88 de 100 m × 0,25 mm - espessura de filme igual a 0,20 µm.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Determinação do perfil de ácidos graxos do azeite de oliva

O perfil de ácidos graxos do azeite de oliva extra-virgem (AOEV) foi determinado conforme a metodologia AOCS Ce 1-62 (AOCS, 2003a), com modificação na etapa de derivatização das amostras que foi realizada conforme descrito por O'Fallon et al (2007). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar HP 88 de 100 m × 0,25 mm - espessura de filme igual a 0,20 µm – e operado sob as seguintes condições:

Split: 1:20;

Temperatura do injetor: 150 °C;

Temperatura inicial da coluna: 140 °C por 6 minutos;
Rampa de aquecimento: 4 °C.min⁻¹ até temperatura final de 240 °C com patamar de 6 minutos;
Temperatura do detector: 260 °C;
Gás de arraste: Hélio sob taxa de 0,92 ml.min⁻¹;
Gás auxiliar: Nitrogênio sob taxa de 0,92 ml.min⁻¹.

A amostra de AOEV foi derivatizada mediante a hidrólise de seus acilgliceróis e metilação dos ácidos graxos liberados conforme o procedimento a seguir: em um tubo de ensaio com rosca, foram adicionados 0,04 ml da amostra, 0,7 ml de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) 10 mol.l⁻¹ e 5,3 ml de metanol (CH₃OH). O tubo foi submetido a agitação e levado a um banho termostático configurado para temperatura igual a 55° C por 1,5 hora, sendo que, a cada 20 minutos o tubo era submetido a uma vigorosa agitação durante 5 segundos. Após a etapa de aquecimento, o tubo foi resfriado até atingir a temperatura ambiente em um banho de água fria. Após essa etapa, foram adicionados ao tubo 0,58 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 12 mol.l⁻¹, misturou-se o conteúdo por inversão e observou-se a formação de um precipitado de sulfato de potássio (K₂SO₄). O tubo foi novamente levado a um banho termostático configurado para temperatura igual a 55° C por 1,5 hora, sendo que, a cada 20 minutos o tubo foi submetido a agitação vigorosa durante 5 segundos. Após a etapa de aquecimento, o tubo foi resfriado até temperatura ambiente em um banho de água fria. Após essa etapa de resfriamento, foram adicionados ao tubo 3 ml de hexano. O tubo foi agitado em vórtex e centrifugado por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um *vial* e armazenado sob resfriamento até o momento da análise.

Com auxílio de uma micro-seringa, injetou-se 1 µL da amostra derivatizada no cromatógrafo a gás operado sob as condições já especificadas nesta secção.

Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção apresentados pelo padrão cromatográfico GLC 20-A. Para calcular o percentual de cada ácido graxo, assumiu-se que a soma dos picos era igual a 100% e fez-se uma relação entre a área do pico de interesse e a área total.

3.2.2 Ensaios cinéticos da reação de glicerólise

Foram realizados dois ensaios: com reações não destrutivas e com reações destrutivas. Para as duas situações, os substratos foram pesados em reatores de vidro encamisados acoplados a um agitador

mecânico e a um banho termostático com circulação de água. A Figura 5 mostra o aparato utilizado para a reação de glicerólise.

Figura 5 - Aparato utilizado para a reação de glicerólise.



Fonte: O autor.

O meio reacional foi mantido a 55 °C, temperatura ótima de operação para a Lipozyme TL IM[®] (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010); sob agitação mecânica de 600 rpm, velocidade reportada como adequada em diversos trabalhos sobre glicerólise de óleos (FIAMETTI et al., 2012; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2013; VALÉRIO et al., 2010). Utilizou-se razão molar azeite de oliva/glicerol igual a 2:1, razão já demonstrada como ótima para a reação de glicerólise catalisada pela Lipozyme TL IM[®] (BLANCO; DORS, 2015). As massas de AOEV utilizadas nas reações foram calculadas tomando como base o valor de 876, 86 g.mol⁻¹ para a massa molar média do AOEV (KRUGER, 2010). Após 20 minutos de agitação e aquecimento dos substratos, o derivado enzimático foi adicionado num percentual de 10% em relação a massa total de substratos.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2.1. Ensaio cinéticos com reações não destrutivas

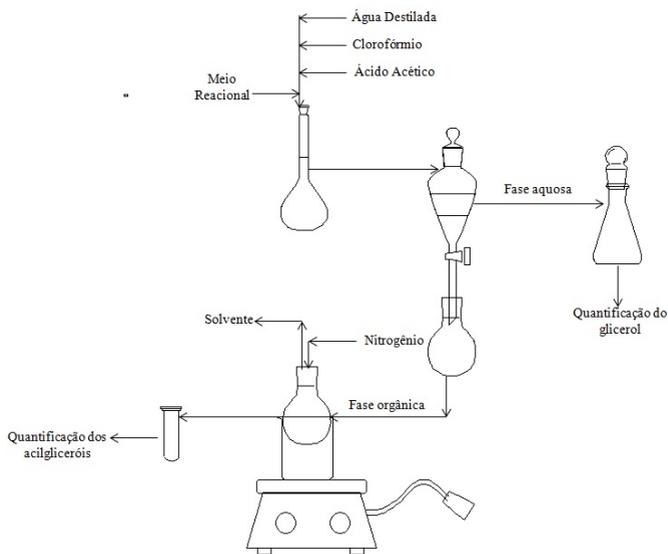
Estes ensaios foram divididos em duas reações conduzidas entre:

1) $t = 0$ hora e $t = 10$ h, da qual foram retiradas alíquotas para os seguintes instantes: $t = 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10$ h;

2) $t = 0$ hora e $t = 24$ h, da qual foram retiradas alíquotas para os seguintes instantes: $t = 12, 15, 18$ e 24 h.

Em um reator de 400 ml, pesaram-se cerca de 131,13 g de AOEV e 6,91 g de glicerol. O reator foi acoplado ao banho termostático e ao agitador, após 20 minutos adicionou-se o derivado enzimático e iniciou-se a cronometragem do tempo de reação.

Figura 6 – Fluxograma do preparo de amostras das reações não destrutivas



Fonte: O autor.

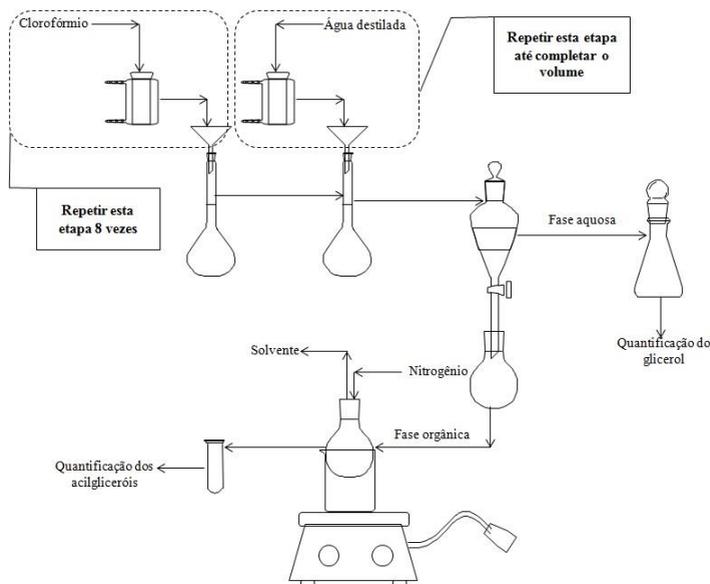
Após atingir-se o tempo de reação desejado, o agitador era desligado, aguardava-se a decantação da enzima por cerca de 1 minuto e três alíquotas de 500 μL eram retiradas da fase líquida do meio reacional, transferidas para balões volumétricos de 50 ml previamente pesados e a seguir, as massas das amostras eram medidas por diferença. Em cada balão foram adicionados 4,5 ml de clorofórmio, 1,25 ml de ácido acético e completou-se o volume com água destilada. O conteúdo do balão era transferido para um funil de separação de 60 ml e misturado gentilmente por inversão. Após a separação das fases, a fase orgânica era coletada em balão de fundo redondo e levada a banho-maria sob corrente de nitrogênio para evaporação do solvente. A fração lipídica e a fase aquosa foram armazenadas para posterior quantificação dos acilgliceróis e do glicerol. A Figura 6 apresenta o fluxograma do preparo das amostras e de extração do glicerol.

3.2.2.2. Ensaio com reações destrutivas

Conduziram-se reações individuais para cada intervalo de tempo da curva cinética: $t = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18$ e 24 h.

Em um reator de 40 ml pesaram-se cerca de 3,801 g de AOEV e 0,199 g de glicerol. O reator foi acoplado ao banho termostático e ao agitador, após 20 minutos adicionou-se o derivado enzimático e iniciou-se a cronometragem do tempo de reação.

Figura 7 - Fluxograma do preparo de amostras das reações destrutivas



Fonte: O autor.

Após atingir-se o tempo de reação, o reator era desacoplado do agitador e do banho termostático. A reação era interrompida através do seguinte procedimento cujo fluxograma é apresentado na Figura 7: foram adicionados ao meio reacional 5 ml de clorofórmio, após agitação, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500 ml com auxílio de um funil contendo papel filtro quantitativo. Esse procedimento foi repetido mais sete vezes perfazendo a adição de 40 ml de clorofórmio. A seguir, o reator foi lavado com água destilada sucessivas vezes, sendo a água de lavagem transferida para o balão através do funil forrado com papel filtro até completar-se o volume de 500 ml. Dessa forma, o material lipídico e o glicerol adsorvidos na superfície do catalisador e nas paredes do reator foram lavados e

transferidos para o balão. O conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação de 500 ml e misturado gentilmente por inversão. Após a separação das fases, a fase orgânica foi coletada em balão de fundo redondo e levada a banho-maria sob corrente de nitrogênio para evaporação do solvente. A fração lipídica e a fase aquosa foram armazenadas para posterior quantificação dos acilgliceróis e do glicerol.

3.2.3 Determinação da concentração de glicerol

O glicerol foi determinado por análise espectrofotométrica conforme adaptação de metodologia descrita na literatura (BONDIOLI; DELLA BELLA, 2005). O método baseia-se na reação de oxidação do glicerol por periodato de sódio que produz formaldeído, esse reage com o fluoral-p (4-amino-3-penteno-2-ona), um produto da reação entre acetilacetona (2-4-pentanodiona) com amônia (PURDY, 1980), formando o composto cromóforo 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, (ANDRADE et al., 2004) cuja máxima absorvância dá-se no comprimento de onda de 410 nm.

Para realizar a quantificação do glicerol foram empregadas as seguintes soluções de reagentes:

Solução aquosa de acetato de amônio 4 mol.l^{-1} ;

Solução aquosa de ácido acético $1,6 \text{ mol.l}^{-1}$;

Solução de periodato de sódio $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$, preparada em tampão (pH 5,5) de ácido acético e acetato de amônio 1:1 v/v. Primeiro solubilizou-se periodato de sódio na solução ácida, a seguir adicionou-se a solução de acetato de amônio;

Solução de acetilacetona $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$, preparada em tampão com de ácido acético e acetato de amônio 1:1 v/v e deixada em repouso por 2 h para formação do fluoral-p;

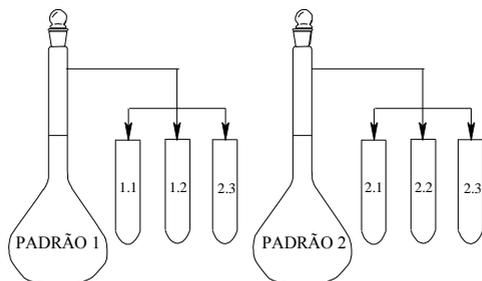
Solução estoque aquosa de glicerol 3 g.l^{-1} , reparada a partir do glicerol P.A. utilizado nas reações de glicerólise;

Solução de referência aquosa de glicerol $0,03 \text{ g.l}^{-1}$, preparada a partir da solução estoque.

3.2.3.1. Construção da Curva de Calibração

Em uma série de balões volumétricos de 10 ml foram adicionadas os seguintes volumes da solução de referência: 0; 1,25, 2,5, 3,75, 5,00, 6,25, 7,50, 8,75 e 10,00 ml. Completaram-se os volumes com água destilada. Para cada valor de concentração foram preparadas duas soluções padrão. De cada uma das soluções padrão foram retiradas três alíquotas de 2 ml e transferidas para uma série de tubos de ensaio, conforme ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquemática das réplicas utilizadas para construção da curva de calibração do glicerol.



Fonte: O autor.

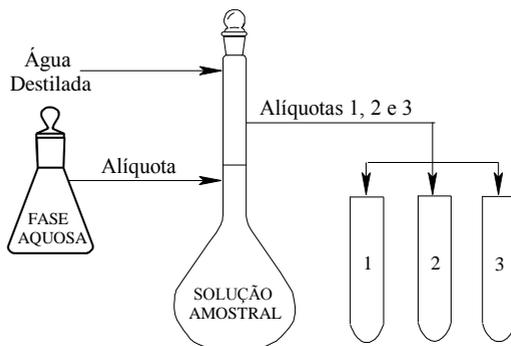
A seguir, adicionaram-se 1,2 ml da solução de periodato de sódio e os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos. Na sequência foram adicionados 1,2 ml da solução de acetilacetona, e os tubos foram imediatamente aquecidos em um banho com temperatura controlada à 70 °C por 60 segundos, e após o aquecimento imediatamente imersos em um banho de água fria (20 a 22 °C) por um minuto. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro de feixe duplo configurado para emitir comprimento de onda de 410 nm contra um branco preparado da mesma forma que as soluções padrão.

3.2.3.2 Análise de glicerol nas amostras

A partir de diluições apropriadas, para cada amostra de fase aquosa proveniente das reações de glicerólise foi preparada uma solução amostral. De cada uma dessas soluções foram retiradas 3 alíquotas de 2 ml e transferidas para uma série de tubos de ensaio conforme fluxograma da Figura 9.

Em cada tudo de ensaio foi adicionado 1,2 ml da solução de periodato de sódio, e a seguir os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos. A seguir, foram adicionados 1,2 ml da solução de periodato de sódio e os tubos foram agitados manualmente por 30 segundos. Na sequência foram adicionados 1,2 ml da solução de acetilacetona, e os tubos foram imediatamente aquecidos em um banho com temperatura controlada à 70 °C por 60 segundos, e após o aquecimento imediatamente imersos em um banho de água fria (20 a 22 °C) por um minuto. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro de feixe duplo configurado para emitir comprimento de onda de 410 nm contra um branco preparado da mesma forma que as soluções padrão.

Figura 9 - Preparo das soluções amostrais para quantificação do glicerol residual nas amostras provenientes das reações de glicerólise



Fonte: O autor.

3.2.4. Determinação dos acilgliceróis por cromatografia a gás

A análise do perfil de acilgliceróis foi realizada conforme adaptação da metodologia AOCS Cd11 b-91 que baseia-se conversão de MAGs e DAGs em seus trimetilsilíteres através da derivatização com BSTFA e TMCS.

O cromatógrafo à gás foi equipado com uma coluna capilar modelo RTX-5, 60 m × 0,25 mm, de sílica fundida, com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano e equipado sob as seguintes condições:

Split: 50:1;

Temperatura do injetor: 320 °C;

Temperatura inicial da coluna: 80 °C;

Rampa de aquecimento: 10 °C.min⁻¹ até temperatura final de 330 °C com patamar de 62,5 minutos;

Temperatura do detector: 350 °C;

Gás de arraste: Hélio sob taxa de 2 ml.min⁻¹.

Para o preparo da solução de padrão interno pesou-se aproximadamente 0,100 g de n-tetradecano em um balão volumétrico de 10ml e completou-se o volume com piridina.

As soluções de referência foram preparadas através da pesagem de massas apropriadas dos padrões de monooleína e dioleína em eppendorfs de 2,5 ml, aos quais foram adicionados 100 µL de piridina. Dessa solução estoque, alíquotas de 1, 2, 5, 10, 25 e 50 µL foram transferidas para uma série de eppendorfs de 2,5 ml, e adicionou-se piridina suficiente para completar 50 µL em cada um dos tubos.

3.2.4.1. Construção da curva de calibração

As soluções de referência foram derivatizadas da seguinte forma: A 50 μL da solução de referência foram adicionados 100 μL de BSTFA, 50 μL de TMCS e 50 μL da solução de padrão interno. Os ependorfs contendo a mistura foram devidamente fechados para impedir a entrada de umidade e levados a um banho termostático configurado para temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Finalizada a derivatização, com auxílio de uma microseringa, injetaram-se 2 μL da solução no cromatógrafo à gás.

Os cromatogramas foram analisados e as áreas dos picos foram integradas através do software GC solution. As curvas de calibração foram construídas conforme procedimento abaixo.

Durante o preparo da solução de referência para injeção, volumes conhecido dos derivatizantes e da solução de padrão interno são adicionados a solução de referência perfazendo um volume total V_{total} . Assim tem-se que a concentração da substância de referência na solução injetada é dada pela Equação (1):

$$C_{S.R.}^I = \frac{m_{S.R.}}{V_{\text{total}}} \quad (1)$$

Onde:

$C_{S.R.}^I$: concentração da substância de referência na solução injetada;

$m_{S.R.}$: massa da substância de referência na solução de referência;

V_{total} : volume total da solução de referência.

A Equação (1) pode ser reescrita para expressar a concentração de padrão interno na solução injetada conforme a Equação (2):

$$C_{P.I.}^I = \frac{m_{P.I.}}{V_{\text{total}}} \quad (2)$$

Onde:

$C_{P.I.}^I$: concentração do padrão interno na solução injetada;

$m_{P.I.}$: massa do padrão interno na solução de referência;

V_{total} : volume total da solução de referência.

Estabelecendo uma relação entre as Equações (1) e (2), obtém-se a Equação (3):

$$\frac{C_{S.R.}^I}{C_{P.I.}^I} = \frac{m_{S.R.}}{V_{\text{total}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{m_{P.I.}} \quad (3)$$

Da simplificação da Equação (3) decorre a Equação (4)

$$\frac{C_{S.R.}^I}{C_{P.I.}^I} = \frac{m_{S.R.}}{m_{P.I.}} \quad (4)$$

Após integração das áreas dos picos dos cromatogramas das soluções de referência, as curvas de calibração foram construídas plotando-se a relação entre as massas de padrão interno e substância de referência versus a relação entre as áreas do padrão interno e da substância de referência conforme a Equação 5.

$$\frac{m_{S.R.}}{m_{P.I.}} = \alpha \frac{A_{S.R.}}{A_{P.I.}} \quad (5)$$

Onde:

$m_{S.R.}$: massa da substância de referência;

$m_{P.I.}$: massa do padrão interno;

$A_{S.R.}$: área do pico correspondente à substância de referência;

$A_{P.I.}$: área do pico correspondente ao padrão interno;

α : coeficiente angular da curva.

3.2.4.2 Análise de acilgliceróis nas amostras

Em eppendorfs, pesaram-se aproximadamente 0,0250 g das frações lipídicas provenientes das reações de glicerólise. A essas amostras foram adicionados 100 μ L de BSTFA, 50 μ L de TMCS e 50 μ L da solução de padrão interno. Os eppendorfs foram devidamente fechados para impedir a entrada de umidade e levados a um banho termostático configurado para temperatura de 70 °C durante 20 minutos. Finalizada a derivatização, com auxílio de uma microseringa, injetaram-se 2 μ L da solução no cromatógrafo à gás.

Os cromatogramas foram analisados e as áreas dos picos foram integradas através do software GC solution. A quantificação da substância de interesse na amostra, foi calculado através da Equação 6:

$$m_{S.I.}^{am} = \alpha \times m_{P.I.}^{am} \times \frac{A_{S.I.}^{am}}{A_{P.I.}^{am}} \quad (6)$$

Onde:

$m_{S.I.}^{am}$: massa da substância de interesse na amostra;

$m_{P.I.}^{am}$: massa do padrão interno adicionada à amostra;

$A_{S.R.}^{am}$: área do pico correspondente à substância de referência;

$A_{P.I.}^{am}$: área do pico correspondente ao padrão interno;

α : coeficiente angular da curva de calibração.

3.2.5. Cálculo do rendimento em MAG da reação de glicerólise do óleo de oliva extra-virgem

O rendimento da reação em MAG é dado pela Equação 7:

$$\text{Rendimento}_{MAG} = \frac{m_{MAG\text{ experimental}}}{m_{MAG\text{ teórico}}} \quad (7)$$

Onde:

$m_{MAG\text{ experimental}}$: quantidade de MAG que foi obtida na reação experimental.

$m_{MAG\text{ teórico}}$: quantidade de MAG que se formaria na reação se todo o glicerol (reagente limitante) fosse consumido.

Como a fração mássica de MAG é dada pela Equação 8:

$$w_{MAG} = \frac{m_{MAG}}{m_{\text{total do meio}}} \quad (8)$$

Onde:

w_{MAG} : fração mássica de MAG;

m_{MAG} : massa de MAG formado;

$m_{\text{total do meio}}$: massa total do meio reacional.

A equação do Rendimento é então descrita em função das frações mássicas conforme Equação 9:

$$\text{Rendimento}_{MAG} = \frac{W_{MAG\text{ experimental}}}{W_{MAG\text{ teórico}}} \quad (9)$$

Onde:

$W_{MAG\text{ experimental}}$: fração mássica de MAG obtida na reação real;

$W_{MAG\text{ teórico}}$: fração mássica de MAG que seria obtida na reação se todo o glicerol (reagente limitante) fosse consumido.

O cálculo de $w_{MAG\text{ teórico}}$ foi realizado através da Equação 10:

$$w_{MAG\text{ teórico}} = \frac{c \cdot M_{MAG}}{a \cdot M_{TAG} + b \cdot M_{GLI}} \quad (10)$$

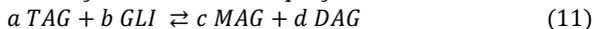
Onde:

M_{MAG} : massa molar do MAG;

M_{TAG} : massa molar do TAG;

M_{GLI} : massa molar do GLI;

a, b e c são os coeficientes estequiométricos das espécies químicas envolvidas na reação conforme a Equação 11:



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Entre os parâmetros necessários para a caracterização físico-química dos óleos e gorduras, o perfil de ácidos graxos permite detectar se a amostra sofreu adulterações e quais os principais produtos que serão gerados a partir da reação de glicerólise. Esse conhecimento é fundamental para uma correta interpretação dos cromatogramas referentes às reações de glicerólise e seleção dos padrões cromatográficos necessários para o monitoramento das reações.

A Tabela 6 apresenta um comparativo entre os resultados da análise do azeite de oliva utilizado neste trabalho e os valores preconizados pela legislação brasileira (ANVISA, 1999; MAPA, 2012).

Tabela 6 – Comparação entre o perfil de ácidos graxos da amostra do azeite de oliva e o estabelecido pela legislação brasileira (ANVISA, 1999; MAPA, 2012).

Ácido graxo	Fração mássica(%)	
	Amostra	Legislação *
(P) - C 16:0	12,38	7,5 - 20,0
(Po) - C 16:1	0,79	0,3 - 3,5
(S) - C 18:0	2,16	0,5 - 5,0
(O) - C 18:1	78,7	55,0 - 83,0
(Li) - C 18:2	5,95	3,5 - 21,0
(Ln) - C 18:3	-*	≤ 0,9

P, palmítico; Po, palmitoleico; S, esteárico; O, oleico; Li, linoleico; Ln, linolênico.

* não detectado.

O perfil de ácidos graxos do azeite de oliva extra-virgem (AOEV) utilizado neste trabalho está dentro do estipulado pela legislação. De acordo com os resultados obtidos, sabe-se que a reação de glicerólise renderá monooleína, como MAG majoritário, e teores significativos de monopalmitina.

Embora o fabricante não mencione quais variedades de azeitonas foram utilizadas na produção do AOEV empregado neste trabalho, observa-se que seu perfil de ácidos graxos é similar ao do AOEV extraído de olivas da variedade Picual, conforme já mencionado na literatura (ARANDA et al., 2004). Assim, para futuras considerações, neste trabalho, assumir-se-á que a composição dos TAGs e a distribuição dos ácidos graxos esterificados na posição sn-2 dos TAGs são similares às reportadas na literatura para o AOEV oriundo de olivas

Picual, cujos valores encontram-se nas Tabela 3Tabela 4.(ARANDA et al., 2004).

Considerando que AOEVs ricos em ácido oleico apresentam teores elevados de trioleína e outros TAGs que possuem dois radicais oleato em sua molécula, assume-se que para a finalidade deste trabalho, o monitoramento da reação em função dos oleatos é representativo.

4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO GLICEROL

De acordo com o reportado na literatura, observou-se que a totalidade dos trabalhos sobre glicerólise enzimática monitora as reações em função da formação de MAGs e DAGs e/ou consumo de TAGs, sendo a determinação desses acilgliceróis realizada através de técnicas cromatográficas (FIAMETTI et al., 2012; LIU et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014; WEBER; MUKHERJEE, 2004). Neste trabalho, propôs-se acompanhar a reação através do consumo de glicerol, e para este fim foi necessário desenvolver uma metodologia que requeresse equipamentos de fácil acesso e reagentes ordinários.

A literatura apresenta diversos procedimentos para determinação de glicerol em biodiesel, como por exemplo a norma ASTM D6584: 13e1 (ASTM, 2011), mas é escassa no tocante a métodos para determinação de glicerol em óleos, gorduras e emulsificantes. Uma metodologia disponível é a AOCS Ca 14-56 (AOCS, 2003b). Nesse método, o glicerol é oxidado por ácido periódico cujo excesso reage com iodeto formando iodo que é titulado com tiosulfato de sódio. Através da diferença entre as quantidades de tiosulfato utilizadas para neutralizar o branco e a amostra, determina-se o teor de glicerol na amostra. Além de ser trabalhoso, tal procedimento requer tempo e quantidades elevadas de reagentes caros.

Entre os métodos que a literatura apresenta para quantificação de glicerol em amostras de biodiesel, há um método espectrofotométrico que apresenta boa sensibilidade e emprega quantidades mínimas de reagentes (BONDIOLI; DELLA BELLA, 2005). O método baseia-se na reação de oxidação do glicerol por periodato de sódio que produz formaldeído, esse reage com o flural-p (4-amino-3-penteno-2-ona), um produto da reação entre acetilacetona (2-4-pentanodiona) com amônia (PURDY, 1980), formando o composto cromóforo 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina (ANDRADE et al., 2004) cuja máxima absorbância se dá no comprimento de onda de 410 nm.

Entretanto, esse método requereu modificações que o tornassem adequado para amostras provenientes de reações de glicerólise de óleos. Conforme a metodologia original, as etapas de extração e de preparo de soluções padrão e amostrais devem ser realizadas da seguinte forma:

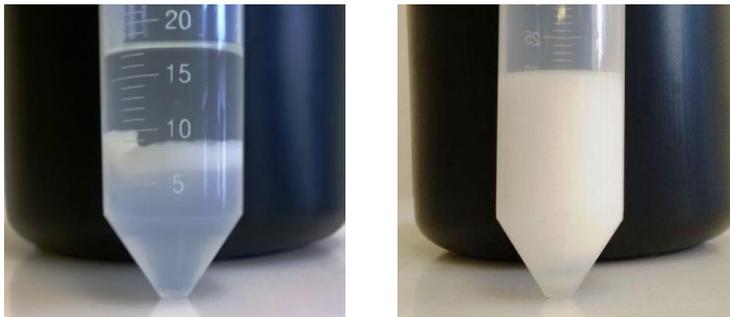
- extração do glicerol contido nas amostras através de um processo de extração líquido-líquido no qual hexano e solução solvente de água destilada/etanol absoluto 1:1 v/v são adicionados à amostra, essa é agitada em vórtex, e submetida a centrifugação para separação das fases orgânica e aquo-etanólica;
- preparo das soluções estoque, referência e padrão de glicerol em meio de água destilada/etanol absoluto 1:1 v/v (BONDIOLI; DELLA BELLA, 2005).

O processo para extração do glicerol, citado acima, mostrou-se inadequado para as amostras resultantes da reação de glicerólise, pois quando aplicado para tempos de reação igual ou superiores a 2 h, mesmo após a etapa de centrifugação, observava-se uma camada de emulsão entre as fases aquo-etanólica e orgânica que se tornava tanto maior quanto maior o tempo de reação, até o ponto em que todo o conteúdo do tubo se apresentasse como uma emulsão espessa, conforme observado na Figura 10. Isso é explicado pelo fato de as amostras das reações de glicerólise possuírem concentrações maiores de MAGs e DAGs quando comparadas com amostras de biodiesel que apresentam apenas traços desses emulsificantes.

Com relação, ao preparo das soluções de glicerol, observou-se que a absorbância do branco variava com o tempo, acarretando erro no estabelecimento da curva de calibração. Esse fenômeno é atribuído a um coproduto resultante da reação entre a acetilacetona e o etanol que absorve luz no mesmo comprimento de onda que a 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina conforme já relatado na literatura (RIBEIRO; ROCHA, 2013).

Para estabelecer um processo de extração de glicerol que fosse adequado para as amostras resultantes das reações de glicerólise, foram testados dois métodos: 1) a utilização de clorofórmio, ácido acético e água como solventes, conforme reportado em outros trabalhos sobre glicerólise que realizavam a extração do glicerol como tratamento prévio à cromatografia (FREITAS, 2009; TEIXEIRA et al., 2014); 2) utilizando apenas clorofórmio e água destilada como solventes de extração, conforme descrito na metodologia AOCS Ca 14-56 para quantificação de glicerol através da oxidação por ácido periódico e titulação indireta com tiosulfato de sódio (AOCS, 2003b).

Figura 10 – Emulsões formadas durante a etapa de extração do glicerol das amostras das reações de glicerólise ao se empregar a metodologia descrita por Bondioli; Della Bella (2005)



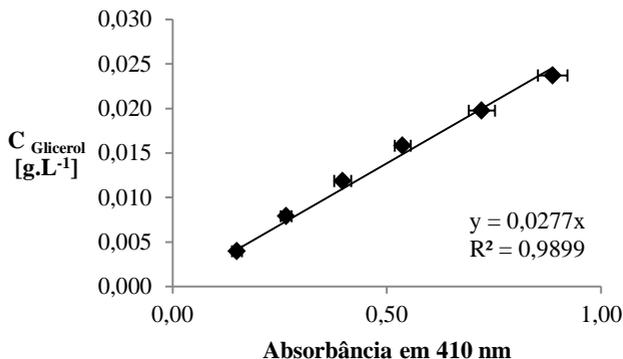
Fonte: O autor.

A fotografia à esquerda corresponde a uma amostra cujo tempo de reação foi igual a 3 h, observa-se a formação de uma fase intermediária com características de uma emulsão. A fotografia à direita corresponde a uma amostra cujo tempo de reação foi igual a 12 h, observa-se que durante a etapa de extração, todo o meio reacional se transformou em uma forte emulsão. **Condições de extração:** Diluição de 2 gramas de amostra em 8 ml de hexano e 8 ml de solução aquo-etanólica 1:1 v/v, seguida de agitação em vórtex por 5 minutos e centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos.

Durante a extração do glicerol contido nas amostras das reações destrutivas, verificou-se que, após a adição do ácido acético sobre o meio reacional, formava-se um de gel de cor branca. Esse fenômeno pode ser atribuído ao fato de que o ácido acético ataca a enzima desnaturando sua estrutura proteica (DE CASTRO; NAPOLEÃO; OLIVEIRA, 1998). Esse problema foi solucionado mediante o uso do sistema clorofórmio/água destilada (AOCS, 2003b) para extrair o glicerol contido nas amostras provenientes de reações destrutivas. A implementação destes métodos de extração do glicerol mitigou a formação de emulsões.

Utilizando o novo processo de extração, o glicerol foi extraído para a fase aquosa, e não mais a aquo-etanólica. Por isso, decidiu-se preparar as soluções estoque, de referência e padrão de glicerol em meio aquoso. Tal estratégia solucionou o problema da falta de estabilidade no sinal do branco e permitiu a construção da curva de calibração apresentada na Figura 11 bem como a quantificação do glicerol em testes realizados com misturas de óleo e glicerol de concentrações conhecidas.

Figura 11 – Curva de calibração para quantificação do glicerol através do método espectrofotométrico: Concentração de glicerol versus absorvância em 410 nm



Onde C_{Glicerol} é a concentração de glicerol nas soluções padrão de glicerol expressa em g.L^{-1} .

A curva de calibração apresentou um coeficiente de correlação cujo valor aproximado é 0,99 e valores de desvio padrão maiores para valores de concentração mais elevados. Para o propósito deste trabalho, que é estabelecer um perfil da concentração de glicerol ao longo do tempo, a curva foi considerada adequada.

4.3. IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ACILGLICERÓIS

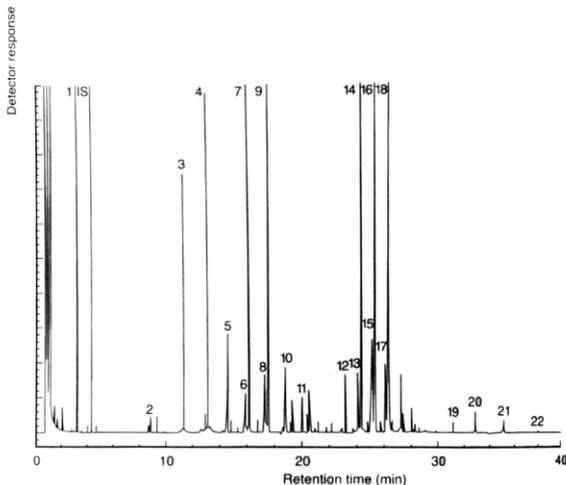
Para acompanhar o progresso das reações em função da concentração de acilgliceróis ao longo do tempo, foi necessário implementar um método cromatográfico que permitisse separar e quantificar as frações de MAGs, DAGs e TAGs.

Até o momento, as descrições metodológicas para determinação de MAGs, DAGs e TAGs, fornecidas pelos trabalhos sobre glicerólise de óleos, não abordam detalhes como a interpretação dos cromatogramas e etapa de cálculos. Por esse motivo, neste trabalho, optou-se por implementar a metodologia Cd 11b-91 da AOCS (American Oil Chemist's Society) (AOCS, 2003c).

De acordo com o documento oficial, a metodologia AOCS Cd 11b-91 é adequada para determinar MAGs e DAGs em amostras concentradas de emulsificantes comerciais e em óleos e gorduras, sendo que componentes como glicerol, ácidos graxos e esteróis, quando convertidos em derivados de trimetilsililéteres também podem ser

analisados pelo mesmo procedimento (AOCS, 2003c). Contudo, ressalta-se que neste trabalho as amostras utilizadas foram previamente submetidas a extração do glicerol.

Figura 12- Cromatograma típico de uma amostra de emulsificante de MAGs e DAGs



Fonte: AOCS (2003c).

Identificação dos picos: IS, padrão interno, 1, glicerol; 2, diglicerol; 3, Ácido hexadecanóico; 4, Ácido octadecanóico; 5, Glicerol 1-tetradecanoato; 6, Glicerol 2-hexadecanoato; 7, Glicerol 1-hexadecanoato; 8, Glicerol 2-octadecanoato; 9, Glicerol 1-octadecanoato; 10, Glicerol 1-icosanoato; 11, Glicerol 1-docosanoato; 12, Glicerol 1-tetradecanoato-3 hexadecanoato; 13, Glicerol 1,2-dihexadecanoato; 14, Glicerol 1,3-dihexadecanoato; 15, Glicerol 1-hexadecanoato-2-octadecanoato; 16, Glicerol 1-hexadecanoato-3-octadecanoato; 17, Glicerol 1,2-dioctadecanoato; 18, Glicerol 1,3-dioctadecanoato; 19, Triacilgliceróis C_{48} ; 20, Triacilgliceróis C_{50} ; 21, Triacilgliceróis C_{52} ; 22, Triacilgliceróis C_{54} . **Condições de operação:** Injetor a $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{i\text{coluna}} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_{f\text{coluna}} = 360\text{ }^{\circ}\text{C}$ com patamar por 15 min, detector à $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, Hélio como gás de arraste a $5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida, $25\text{ m} \times 0,31\text{ mm}$; espessura de filme de $17\text{ }\mu\text{m}$

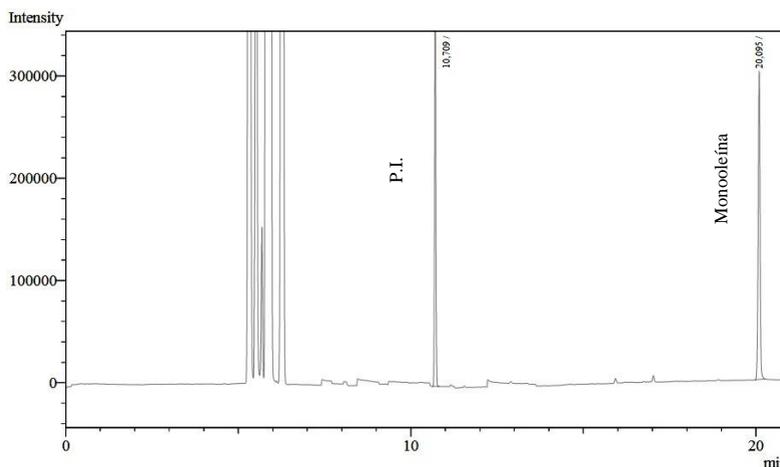
A Figura 12, extraída do documento da metodologia (AOCS, 2003c), apresenta o cromatograma para uma amostra de emulsificante comercial. Esse cromatograma demonstra que a metodologia possui resolução capaz de separar os isômeros de MAGs e DAGs quanto à posição que o ácido graxo ocupa na cadeia do glicerol: Os tempos de retenção para 1-MAGs e 1,2-DAGs são menores que para 2-MAGs e 1,3-DAGs. Contudo, os TAGs não são separados quanto à posição e tipos de cadeias de ácidos graxos presentes em sua estrutura, mas eluem

em grupos com mesmo número de carbonos. Isso acontece porque as reações de derivatização por sililação ocorrem através do deslocamento dos átomos de hidrogênio dos grupos OH, NH e SH (EVERSHED, 1993). Uma vez que as moléculas de TAG não possuem esses grupos, não são suscetíveis a derivatização, que os transformaria em compostos mais voláteis.

4.3.1. Estabelecimento das curvas de calibração para quantificação dos acilgliceróis

O cromatograma referente à monooleína, mostrado na Figura 13, apresenta apenas um pico cujo tempo de retenção é de 20 minutos, pois o padrão utilizado é composto apenas por 1-monooleína.

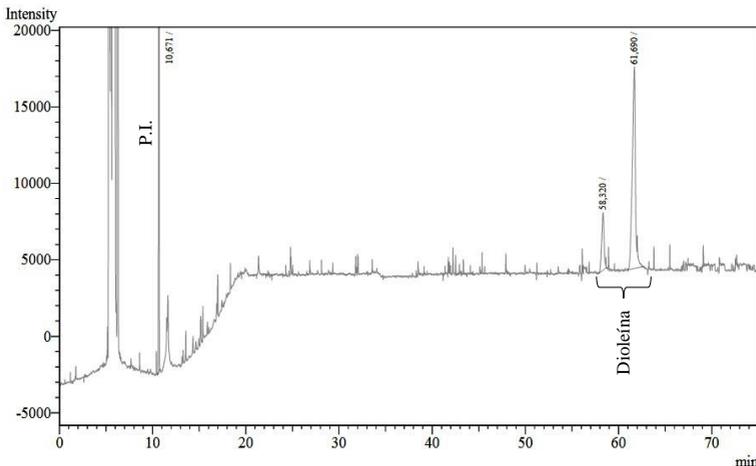
Figura 13 - Cromatograma relativo à substância de referência monooleína



Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{ coluna}} = 80$ °C, rampa de 10 °C.min⁻¹, $T_{f\text{ coluna}} = 330$ °C com patamar por 62 min, detector à 350 °C, Hélio como gás de arraste a 2 ml.min⁻¹. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, 60 m × 0,25 mm; modelo RTX-5.

O cromatograma referente a dioleína, Figura 14, apresenta dois picos, pois o padrão utilizado é constituído de uma mistura de isômeros de 1,2 e 1,3-dioleína. Conforme discutido anteriormente, é possível inferir que os picos com tempos de retenção de 58,3 e 61,7 minutos correspondem a 1,2 e 1,3-dioleína respectivamente.

Figura 14 – Cromatograma relativo à substância de referência dioleína

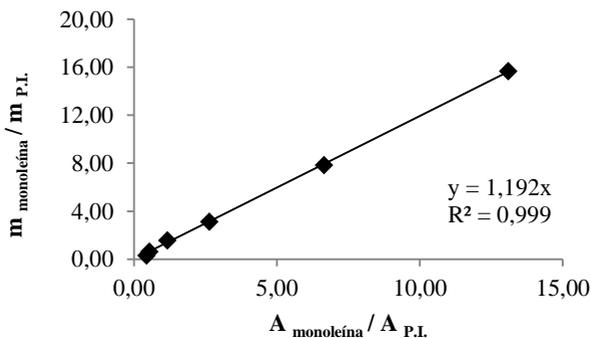


Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{ coluna}} = 80\text{ °C}$, rampa de $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_{f\text{ coluna}} = 330\text{ °C}$ com patamar por 62 min, detector à 350 °C, Hélio como gás de arraste a $2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$; modelo RTX-5.

As Figura 15 e Figura 16 mostram as curvas de calibração construídas para a monooleína e para a dioleína respectivamente. Dado que a cromatografia a gás é uma técnica de grande sensibilidade e suscetível a erros experimentais decorrentes de variáveis aleatórias, da dificuldade em reproduzir volumes iguais durante a utilização manual da micro-seringa e de perdas de amostra durante a injeção (ZIELINSKI, 1974), considera-se que ambas as curvas apresentaram excelente coeficiente de correlação linear, com valores próximos de 1, o que denota a importância da utilização do padrão interno.

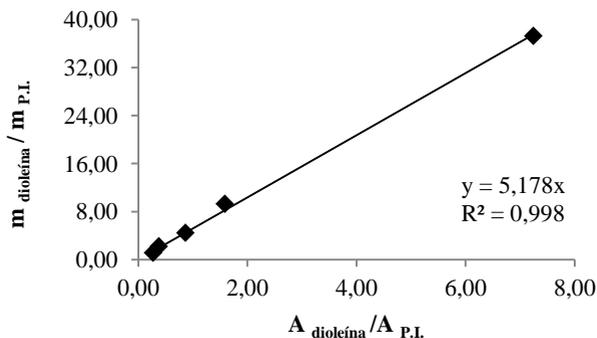
Os cromatogramas referentes à trioleína não apresentaram um pico claro e bem separado, mas sim uma região difusa de sinal instável em torno 67,8 minutos, Figura 17, portanto não foi possível construir uma curva de calibração para a para este analito.

Figura 15 - Curva de calibração para quantificação da monooleína por cromatografia a gás



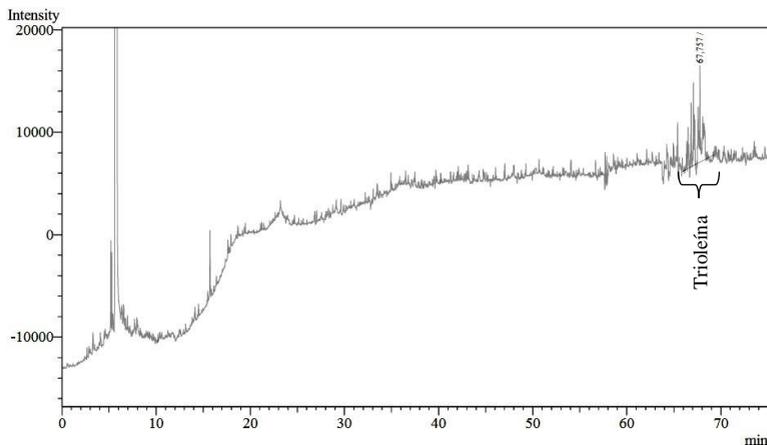
$m_{\text{monooleína}}$, massa do padrão de monooleína; $m_{\text{P.I.}}$, massa do padrão interno (tetradecano); $A_{\text{monooleína}}$, área do pico correspondente à monooleína; $A_{\text{P.I.}}$, área do pico correspondente ao padrão interno (tetradecano).

Figura 16 - Curva de calibração para quantificação da dioleína por cromatografia a gás



$m_{\text{dioleína}}$, massa do padrão de dioleína; $m_{\text{P.I.}}$, massa do padrão interno (tetradecano); $A_{\text{dioleína}}$, área do pico correspondente à dioleína; $A_{\text{P.I.}}$, área do pico correspondente ao padrão interno (tetradecano).

Figura 17 - Cromatograma referente à substância de referência trioléina



Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{coluna}} = 80$ °C, rampa de 10 °C.min⁻¹, $T_{f\text{coluna}} = 330$ °C com patamar por 62 min, detector à 350 °C, Hélio como gás de arraste a 2 ml.min⁻¹. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, 60 m × 0,25 mm; modelo RTX-5.

4.3.2. Interpretação dos cromatogramas referentes às amostras provenientes da reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem

A obtenção de resultados confiáveis depende da análise criteriosa dos cromatogramas obtidos. Durante a análise dos dados obtidos através da cromatografia, observou-se que os picos eluíam em grupos particulares, e que a distribuição e características desses grupos separavam a coletânea de cromatogramas em duas classes: a dos cromatogramas referentes a tempos de reação inferior a 1 hora, e a daqueles referentes a tempos de reação igual ou superiores a 1 hora. Portanto, para fins didáticos, a análise das informações cromatográficas será demonstrada tomando como exemplos os cromatogramas referentes às reações de tempo $t = 0$ h e $t = 12$ h, ambos mostrados na Figura 18.

Na Figura 18 observa-se que após eluição dos solventes, o primeiro pico que surge corresponde ao padrão interno de tetradecano, P.I, cujo tempo de retenção está ao redor de 10,8 minutos.

Figura 18 - Cromatogramas referentes a amostras proveniente de reações de glicrólise para tempos iguais a 0 e 12 horas

Figura 18-a - Cromatograma para amostra de reação com duração de $t = 0$ h

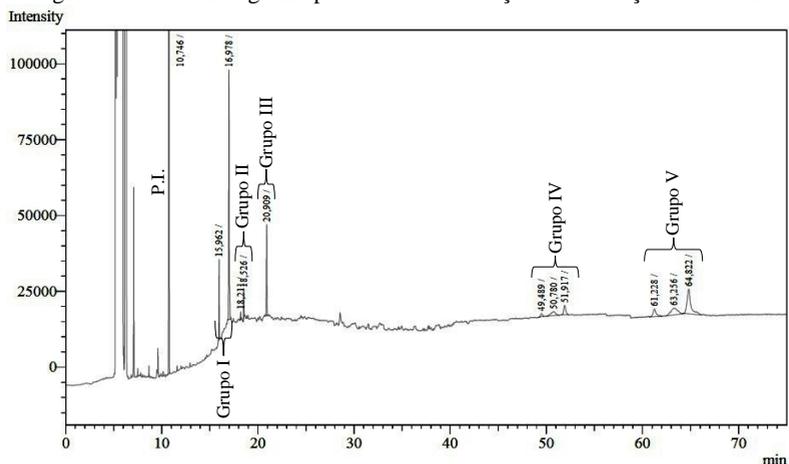
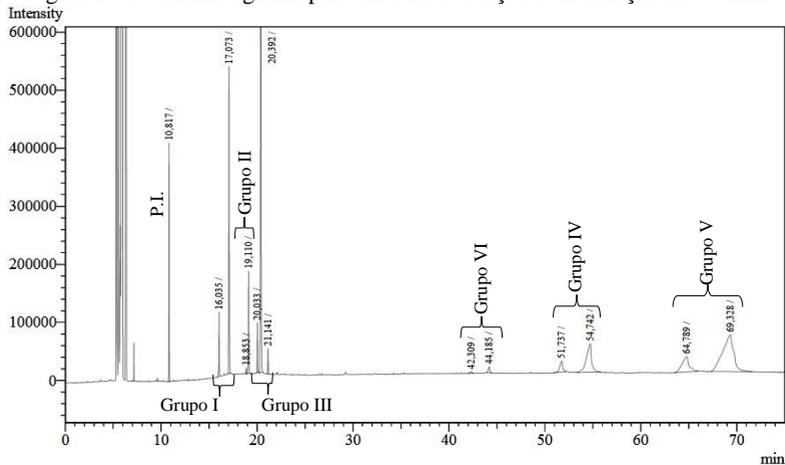


Figura 18-b - Cromatograma para amostra de reação com duração de $t = 12$ h

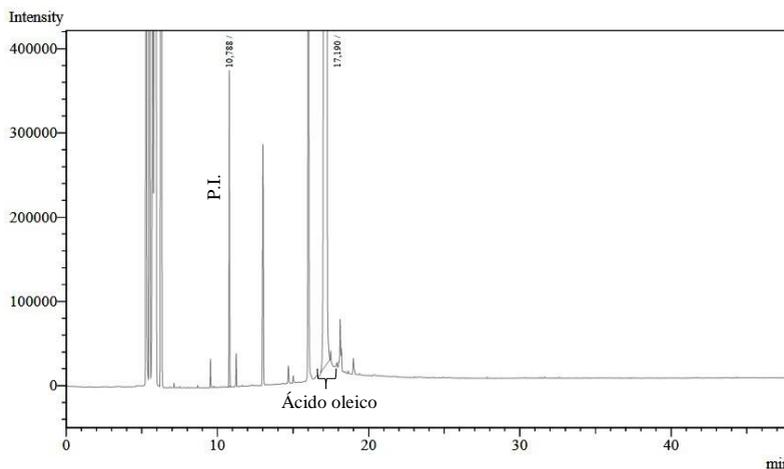


Condições de operação: Injetor a $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{i\text{ coluna}} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, rampa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_{f\text{ coluna}} = 330\text{ }^{\circ}\text{C}$ com patamar por 62 min, detector à $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, Hélio como gás de arraste a $2\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$; modelo RTX-5.

A seguir observa-se a formação de um conjunto de picos, denominado Grupo I, cujos tempos de retenção estão entre 15,9 e 16,9 minutos. Considerando que o cromatograma de uma amostra de ácido

oleico comercial, apresentado na Figura 19, apresentou um pico preponderante cujo tempo de retenção é igual a 17 minutos, há possibilidade de que o Grupo I possa ser formado por picos referentes a ácidos graxos livres. Observa-se que para o tempo de reação $t = 12$ h, Figura 18-b, houve um pequeno deslocamento positivo do tempo de retenção deste grupo.

Figura 19 - Cromatograma referente a uma amostra de ácido oleico comercial



Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{ coluna}} = 80$ °C, rampa de 10 °C.min⁻¹, $T_{f\text{ coluna}} = 330$ °C com patamar por 62 min, detector à 350 °C, Hélio como gás de arraste a 2 ml.min⁻¹. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, 60 m × 0,25 mm; modelo RTX-5.

O próximo grupo de picos, Grupo II, elui num intervalo de tempo entre 18,2 e 18,5 minutos. De acordo com os padrões disponíveis, não foi possível identificar estes picos. Para amostras referentes a tempos de reação iguais ou superiores a $t = 1$ h houve deslocamento positivo do tempo de retenção deste grupo.

Na Figura 18-a, cujo cromatograma se refere a amostra de uma reação cujo tempo é $t = 0$ h, observa-se um pico distinto que elui em 20,9 minutos, este é o pico correspondente à monooleína. Ao se analisarem os cromatogramas para tempos de reação superiores, como o cromatograma apresentado na Figura 18-b, constata-se o surgimento de mais dois picos próximos ao pico correspondente à monooleína. Neste trabalho, assumiu-se que o pico de maior área, eluído em T.R. = 20,4 corresponde a 1-monooleína, que o pico posterior corresponde a 2-monooleína, pois conforme já discutido anteriormente, de acordo com a metodologia 1-MAGs eluem antes de 2-MAGs. Quanto ao pico anterior,

tendo-se em conta que o segundo ácido graxo mais abundante no azeite de oliva utilizado neste trabalho é o ácido palmítico ($C_{16:0}$), pode-se inferir que este pico corresponde à monopalmitina. O conjunto destes picos foi denominado Grupo III.

A seguir, observa-se um grupo de picos denominado Grupo IV, cujas bases são largas e que eluem com tempos de retenção iguais a 49,5; 50,8 e 51,9 minutos. Para tempos de reação iguais ou superiores $t = 1$ h, houve deslocamento positivo do tempo de retenção deste grupo de picos e constatou-se o desaparecimento do pico central, conforme pode ser observado na Figura 18-b que mostra o cromatograma para amostra de uma reação de tempo $t = 12$ h. O desaparecimento do pico central indica que a substância à qual ele corresponde foi transformada durante a reação, porém, a partir dos padrões utilizados neste trabalho, não foi possível identificar as espécies químicas eluídas neste grupo.

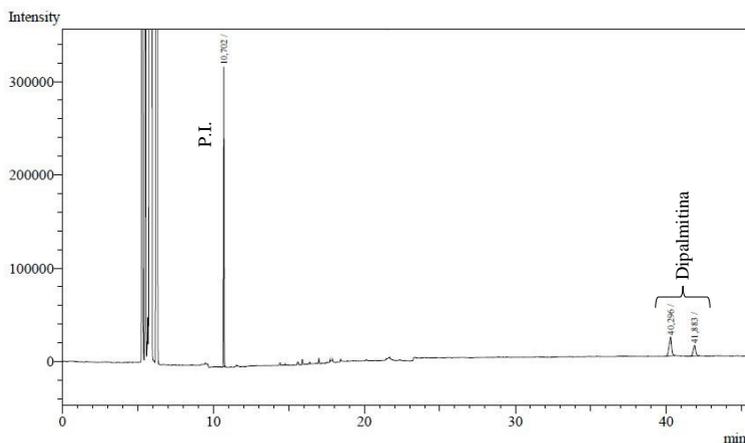
Os picos relativos às últimas substâncias a eluírem também são caracterizados por possuírem uma base larga e compõem o Grupo V. Os cromatogramas para tempos de reação inferiores a $t = 1$ h, Figura 18-a, apresentaram picos cujos tempos de retenção são 61,2; 63,3 e 64,8 minutos respectivamente. Nota-se que o tempo de retenção do primeiro pico está próximo do tempo de retenção da dioleína que é igual, 61,7 minutos (Figura 14). Contudo, para as diferentes amostras de reações de glicrólise, os tempos de eluição dos picos do Grupo V sofreram deslocamentos positivos ou negativos, sendo que em diversos cromatogramas não se observou nenhum pico na região entre 61 e 62 minutos, portanto, não se pode afirmar que este pico corresponda à dioleína. Ressalta-se também, que a fração de diacilgliceróis não é composta apenas por dioleína, mas sim por DAGs complexos cuja porção apolar pode ser composta de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia. Para tempos de reação iguais ou superiores a $t = 1$ h, Figura 18-b, observou-se o desaparecimento do pico central novamente, indicando a transformação das substâncias que compõem o pico. É interessante notar que os picos do Grupo V eluem próximo a região correspondente à trioleína, situada em torno de 67,8 minutos (Figura 17), sendo que para algumas amostras, o tempo de retenção do último pico deste grupo foi superior ao tempo de retenção da trioleína. Mais uma vez, este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que a fração de TAGs é composta por uma mistura complexa de acilgliceróis que apresentam diferentes cadeias de ácidos graxos ligadas a estrutura do glicerol.

A variação nos tempos de retenção dos Grupos IV e V também é um indício de que nas condições operacionais e para as amostras

utilizadas neste trabalho, o método não apresentou uma separação eficiente de DAGs e TAGs.

Examinando o cromatograma da Figura 18-b, referente a uma amostra cujo tempo de reação foi de $t = 12$ h, nota-se o surgimento de um grupo de picos cujos tempos de retenção são iguais a 42,3 e 44,2 minutos. Este grupo, denominado Grupo VI, é observado apenas nos cromatogramas para tempos de reação iguais ou superiores a $t = 1$ h (ver Figura 18). Como o segundo ácido graxo mais abundante no azeite de oliva é o ácido palmítico, no intuito de se investigar a natureza destes picos, foi construída uma curva de calibração para a dipalmitina. Conforme observa-se na Figura 20, o cromatograma apresentou picos para cada um dos dois isômeros da dipalmitina, cujos tempos de retenção são 40,3 e 41,9 minutos. Contudo, dadas as considerações já expostas sobre a quantificação da dioleína, neste trabalho optou-se por não acompanhar a reação em função da formação de DAGs.

Figura 20 - Cromatograma referente à substância de referência dipalmitina



Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{ coluna}} = 80$ °C, rampa de 10 °C.min⁻¹, $T_{f\text{ coluna}} = 330$ °C com patamar por 62 min, detector à 350 °C, Hélio como gás de arraste a 2 ml.min⁻¹. **Coluna:** coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, 60 m × 0,25 mm; modelo RTX-5.

4.4. ACOMPANHAMENTO DOS ENSAIOS CINÉTICOS DA GLICERÓLISE DO AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM

Após estabelecimento dos métodos para quantificação de glicerol e dos acilgliceróis de interesse, deu-se início a realização dos ensaios cinéticos.

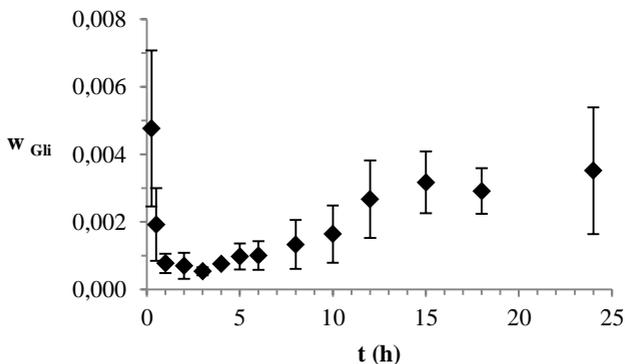
4.4.1. Acompanhamento dos ensaios cinéticos através da quantificação do glicerol residual

4.4.1.1. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos realizados com reações não destrutivas

A Figura 21 apresenta a variação de fração mássica do glicerol em função do tempo para o intervalo entre $t = 0,25$ e $t = 24$ h.

Considerando-se que a média das frações mássicas de glicerol no meio reacional no instante $t = 0$ é $w_{gli,t=0} = 0,049 \pm 0,000$, observa-se que seu valor é reduzido em dez vezes já nos primeiros 15 minutos de reação. Essa diminuição da concentração do glicerol continua até 1 h de reação, instante a partir do qual a concentração permanece praticamente constante até $t = 4$ h, a partir desse instante, há um aumento da concentração de glicerol na fase líquida do meio reacional até atingir-se o equilíbrio em $t = 12$ h.

Figura 21 - Variação da fração mássica de glicerol, w_{gli} , em função do tempo para ensaios com reações não destrutivas



As reações foram realizadas em triplicata. Em intervalos de tempo iguais a $t = 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,0; 8,00; 10,00; 12,00; 15,00; 18,00$ e $24,00$ h, a agitação era momentaneamente interrompida e, após decantação da enzima, eram retiradas três alíquotas da fase líquida do meio reacional. As fases lipídica e glicérica foram separadas por extração líquido/líquido com clorofórmio/ácido acético glacial/água destilada. De cada fase aquosa foram retiradas três alíquotas para quantificação do glicerol por espectrofotometria. **Condições reacionais:** razão molar azeite de oliva/glicerol igual a 2:1; $T = 55^{\circ}\text{C}$, velocidade de agitação igual a 600 rpm.

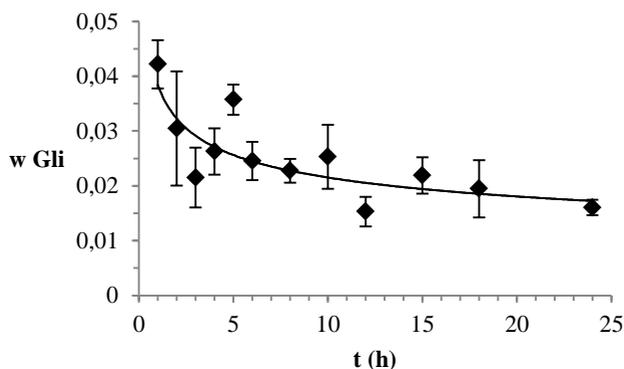
Tal comportamento não corresponde ao perfil de variação da concentração de um reagente durante uma reação. Porém, sabe-se que o suporte de sílica do derivado enzimático Lipozyme[®] TL IM é hidrófilo,

portanto o perfil de concentração de glicerol ao longo do tempo pode ser explicado pelos fenômenos de adsorção e dessorção do glicerol em relação à matriz de sílica do biocatalisador. Assim, entre $t = 0$ e $t = 1$ h, a velocidade de decaimento da concentração do glicerol pode ser explicada por sua adsorção na superfície do suporte do biocatalisador. A medida em que a reação avança, os MAGs e DAGs produzidos melhoram a miscibilidade do glicerol na fase líquida do meio reacional e promovem a dessorção do reagente hidrófilo.

4.4.1.2. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos com reações destrutivas

Para se verificar a hipótese de adsorção/dessorção do glicerol no suporte do biocatalisador, os ensaios cinéticos foram realizados através de reações destrutivas: ao fim de cada reação, todo o meio reacional, incluindo o biocatalisador, era filtrado e lavado com clorofórmio e água destilada, solventes para a fração e lipídica e glicerólica respectivamente. Esta metodologia permitiu obter a curva cinética mostrada na Figura 22.

Figura 22 – Variação da fração mássica de glicerol, w_{Gli} , em função do tempo para ensaio com reações destrutivas



As reações foram realizadas em triplicata. Findado o tempo de reação ($t = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 18$ e 24 h), o meio reacional foi filtrado e lavado. As fases lipídica e glicerólica foram separadas por extração líquido/líquido com clorofórmio/água destilada. De cada fase aquosa foram retiradas três alíquotas para quantificação do glicerol por espectrofotometria. **Condições reacionais:** razão molar azeite de oliva/glicerol igual a 2:1; $T = 55$ °C, velocidade de agitação igual a 600 rpm.

Embora os valores de fração w_{Gli} apresentem-se de forma dispersa, especialmente na região entre $t = 3$ h e $t = 5$ h, é possível

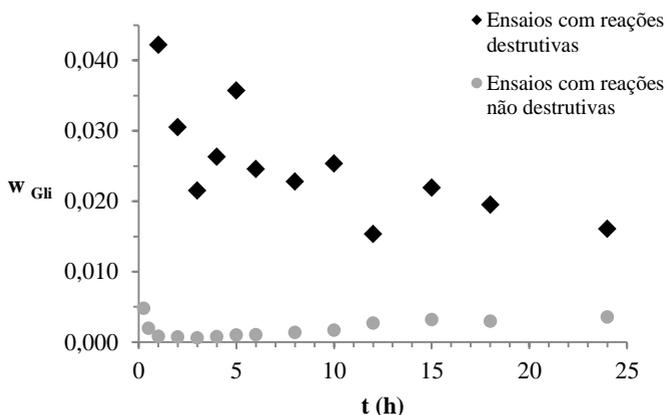
observar a formação de um perfil de consumo desse reagente. A dispersão dos dados pode ser atribuída a erros experimentais decorrentes das etapas de filtração do meio reacional e lavagem da enzima.

Diferentemente do observado para o estudo com ensaio não destrutivo, após 1 h de reação, o valor da fração mássica do glicerol atingiu o valor de $w_{gli,t=1h} = 0,042 \pm 0,004$, o que representa 84% do valor inicial ($w_{gli,t=0} = 0,050 \pm 0,000$). Devido a dispersão dos pontos, não se pode analisar em qual intervalo de tempo o consumo de glicerol ocorre com velocidade constante, mas observa-se que a partir de $t = 12$ h a reação tende ao equilíbrio e o valor mínimo de glicerol residual é $w_{Gli_{mínimo}} = 0,018 \pm 0,003$, isto é, 64% da massa inicial de glicerol foi consumida.

4.4.1.3. Comparação entre os resultados fornecidos pelos ensaios cinéticos com reações não destrutivas e destrutivas em função do consumo de glicerol

A Figura 23 explicita a comparação entre os resultados obtidos para os ensaios com reações não destrutivas e para reações destrutiva. A diferença entre os perfis de concentração mássica corrobora a hipótese de adsorção/dessorção do glicerol na superfície do derivado enzimático.

Figura 23 - Comparação entre a variação da fração mássica de glicerol, w_{Gli} , em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas e não destrutivas

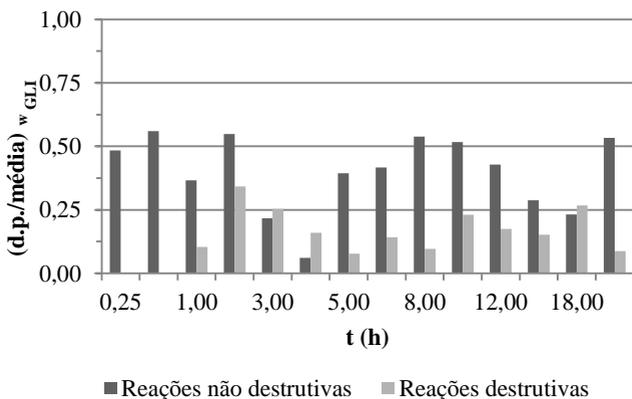


Dessa forma, a curva apresentada na Figura 21 deve ser interpretada como uma curva de dispersão do glicerol na fase líquida do meio reacional, cujo valor mínimo de fração mássica observado é

$w = 0,0005 \pm 0,0001$ para $t = 3$ h. Para se calcular o valor máximo observado, fez-se a média dos valores de w_{GLI} para o período em que a dessorção do glicerol atinge o equilíbrio, isto é, entre $t = 12$ e $t = 24$ h, e obteve-se $w_{GLI} = 0,0031 \pm 0,0004$.

A adsorção do glicerol nas partículas de derivados enzimáticos cujos suportes são hidrófilos já é reportada na literatura (KAEWTHONG et al., 2005; KRISTENSEN; XU; MU, 2005). Um estudo sobre o efeito inibitório do glicerol utilizou como modelo a reação de etanólise de óleo de canola, conduzida sem agitação, e uma técnica de tingimento para visualização desse poliálcool *in situ* e acompanhamento de sua partição e acúmulo durante a reação. Verificou-se que nas reações catalisadas pela Lipozyme TL IM, o glicerol produzido formou uma camada sobre a superfície do biocatalisador e o meio reacional permaneceu límpido sem vestígios de glicerol, enquanto nas reações catalisadas pela Novozym 435 e pela Lipozyme TL HC, observou-se que parte do glicerol permanecia na superfície do biocatalisador enquanto outra era liberada para a fase líquida do meio reacional na forma de gotículas (XU et al., 2011).

Figura 24 – Gráfico comparativo dos valores $(d.p./média)_{w_{GLI}}$ para os ensaios com reações não destrutivas e destrutivas



$(d.p./média)_{w_{GLI}}$ é a razão entre o desvio padrão (d.p.) e o valor médio de w_{GLI} para cada ponto das curvas cinéticas exibidas nas Figura 21 e Figura 22; t (h) é o tempo em horas.

Os gráficos expostos nas Figura 21 e Figura 22 também merecem atenção no tocante aos valores assumidos pelos desvios padrão. A Figura 24 apresenta a razão entre o desvio padrão e a média, $(d.p.) /$

média, referente aos valores de fração mássica de glicerol, w_{Gli} , para os ensaios com reações destrutivas e não destrutivas.

A razão $(d.p./média)_{w_{GLI}}$ assume valores maiores para os ensaios com reações não destrutivas, ultrapassando o valor de 0,5 para $t = 0,5; 2; 8; 10$ e 24 h. Essa elevada dispersão dos valores em torno do valor médio pode ser atribuída ao fato de que a fase líquida do meio reacional não é perfeitamente homogênea, o que acarreta em falhas de amostragem. No intuito de minimizar este erro, para cada tempo da curva cinética, foram retiradas três alíquotas de regiões espaciais diferentes.

Os ensaios com reações destrutivas forneceram valores menores para a razão $(d.p./média)_{w_{GLI}}$ quando comparados aos destrutivos, atingido o valor máximo de 0,34 em $t = 2$ h. Esta diminuição da dispersão dos valores de w_{Gli} em torno de seu valor médio pode ser atribuída a eliminação da etapa de amostragem, uma vez que nesse caso o glicerol era extraído de todo o meio reacional e não apenas de uma alíquota de sua fase líquida.

Uma vez que a curva de calibração apresentou desvios padrão baixos para os valores de absorvância, infere-se que o erro experimental não está na etapa de preparo das soluções amostrais e detecção, mas sim nas etapas de preparo da amostra.

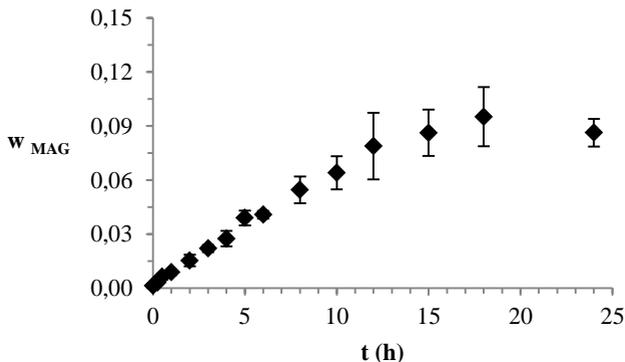
4.4.2. Acompanhamento dos ensaios cinéticos através da quantificação dos acilgliceróis

4.4.2.1. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos realizados com reações não destrutivas

A variação de w_{MAG} em função do tempo para o ensaio cinético com reações não destrutivas pode ser observada no gráfico da Figura 25. Entre os tempos $t = 0$ e $t = 12$ h, a concentração de MAG, w_{MAG} , na fase líquida do meio reacional, cresce com velocidade constante. A partir de $t = 12$ h a velocidade decresce e pode-se considerar que o equilíbrio é atingido a partir de $t = 15$ h.

A velocidade inicial de liberação de MAG para a fase líquida do meio reacional foi calculada a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear entre $t = 0$ e $t = 12$ h, obtendo-se $v_{i_{MAG}}^D = 0,0064 g_{MAG} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$. O valor máximo de w_{MAG} foi obtido pelo cálculo da média dos valores para $t = 15, 18$ e 24 h, obtendo-se $w_{MAG} = 0,089 \pm 0,005$.

Figura 25 - Variação da fração mássica de MAGs, w_{MAG} , em função do tempo para ensaio com reações não destrutivas

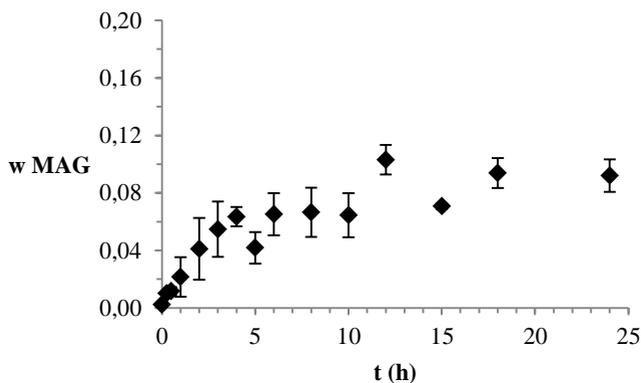


As reações foram realizadas em triplicata. Em intervalos de tempo iguais a $t = 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 15,00; 18,00$ e $24,00$ h, a agitação era e interrompida e após decantação da enzima, eram retiradas três alíquotas da fase líquida do meio reacional. As fases lipídica e glicérica foram separadas por extração líquido/líquido com clorofórmio/ácido acético glacial/água destilada. A fase orgânica era submetida a evaporação do solvente, e a fase lipídica congelada até análise cromatográfica. **Condições reacionais:** razão molar azeite de oliva/glicerol igual a 2:1; $T = 55$ °C, velocidade de agitação igual a 600 rpm.

4.4.2.2. Resultados obtidos para os ensaios cinéticos com reações destrutivas

A Figura 26 exibe um perfil bem definido de formação de MAGs até o tempo $t = 10$ h, com exceção do ponto $t = 5$ h. Observa-se que a produção de MAG processa-se com velocidade constante até o tempo $t = 3$ h, instante a partir do qual há um decréscimo da velocidade inicial de formação de MAG, $v_{i_{MAG}}$, até que a reação alcance o equilíbrio em $t = 6$ h. A literatura reporta o tempo de 5 h para que a reação de glicerólise atingisse o equilíbrio em meios reacionais livres de solvente e sem auxílio de ultrassom (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2013; TEIXEIRA et al., 2014). Outros trabalhos reportam tempos menores, porém utilizam solventes (NAIK; NAIK; MOHANTY, 2014; VOLL et al., 2011) ou ultrassom (FIAMETTI et al., 2012; REMONATTO et al., 2015) para incrementar a miscibilidade entre o glicerol e os TAGs.

Figura 26 – Variação da fração mássica de MAGs, w_{MAG} , em função do tempo para ensaio com reações destrutivas



As reações foram realizadas em triplicata. Findado o tempo de reação ($t = 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 8,10,00; 12,00; 15,00; 18,00$ e $24,00$ h), o meio reacional foi filtrado e lavado. As fases lipídica e glicérica foram separadas por extração líquido/líquido com clorofórmio/água destilada. A fase orgânica era submetida a evaporação do solvente, e a fase lipídica congelada até análise cromatográfica. **Condições reacionais:** razão molar azeite de oliva/glicerol igual a 2:1; $T = 55$ °C, velocidade de agitação igual a 600 rpm.

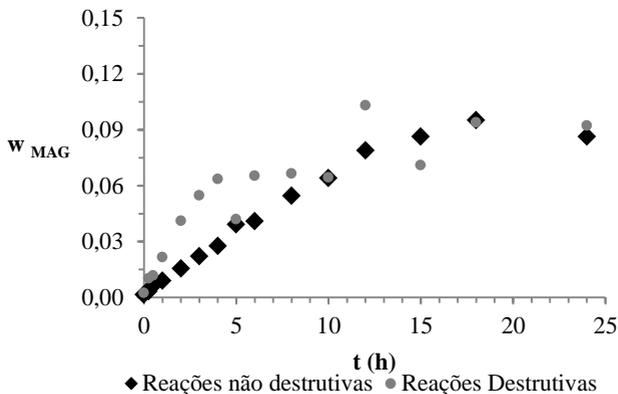
A velocidade inicial de formação de MAG foi calculada a partir da inclinação da reta obtida através da regressão linear entre os tempos $t = 0$ e $t = 3$ h, obtendo-se a velocidade inicial de formação de MAG $v_{i_{MAG}} = 0,0174 \text{ g}_{MAG} \cdot \text{g}_{meio}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. O valor máximo de w_{MAG} foi obtido através do cálculo da média dos valores para $t = 6, 8, 10, 12, 15, 18$ e 24 h, obtendo-se $w_{MAG_{máximo}} = 0,090 \pm 0,010$.

4.4.2.3. Comparação entre os resultados obtidos para ensaios com reações não destrutivas e ensaios com reações destrutivas em função da quantificação dos acilgliceróis

Conforme apresentado na Figura 27, a curva para os ensaios com reações destrutivas apresenta maior velocidade inicial que a curva para ensaios com reações não destrutivas. Isso demonstra que o acompanhamento da reação através da realização de reações não destrutivas, com retiradas de alíquotas do meio reacional não permite quantificar o produto formado em um dado momento, mas sim a quantidade de produto que foi transferida da superfície do biocatalisador para a fase líquida do meio reacional. Isso explica-se pelo fato de que

em sistemas heterogêneos, a concentração de produtos ou substrato na fase sólida (biocatalisador) e na fase líquida (substratos) está sujeita aos efeitos de partição e de transferência de massa. O efeito de partição é responsável pela descontinuidade do perfil de concentração na interface meio-biocatalisador, enquanto a transferência de massa produz um perfil de concentração na vizinhança da superfície e no interior do suporte do biocatalisador (ILLANES et al., 2008). Entretanto, alguns trabalhos utilizam a retirada de alíquotas do próprio meio reacional para acompanhar a reação de glicerólise (FREITAS et al., 2007, 2010).

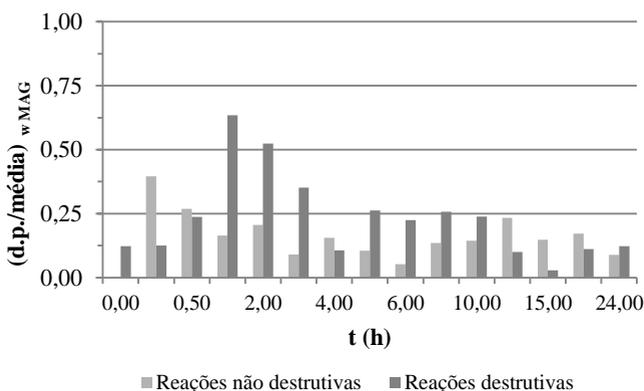
Figura 27 – Comparação entre a variação da fração mássica de MAG, w_{MAG} , em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas e não destrutivas



No tocante aos desvios padrão, os valores da razão $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ para ensaios com reações destrutivas ultrapassou os valores para ensaios com reações não destrutivas em nove dos 15 pontos da curva cinética conforme se verifica na Figura 28.

De forma geral, a razão $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ assumiu valores menores para os ensaios não destrutivos, inclusivamente, assumiu o valor mínimo de $(d.p./média)_{w_{MAG}} = 0,002$ para o tempo $t = 0$. Em contrapartida, para os ensaios destrutivos a razão $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ ultrapassou o valor de 0,5 para os tempos $t = 1$ e $t = 2$ h, assumindo o valor máximo de $(d.p./média)_{w_{MAG}} = 0,635$ para $t = 1$ h. A Tabela 7 sumariza a distribuição dos valores da razão $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ para ambos ensaios cinéticos.

Figura 28 - Gráfico comparativo dos valores $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ para os ensaios com reações não destrutivas e destrutivas



$(d.p./média)_{w_{MAG}}$ é a razão entre o desvio padrão (d.p.) e o valor médio da fração mássica de MAG, w_{MAG} , para cada ponto das curvas cinéticas exibidas na Figura 25 Figura 26; t (h) é o tempo em horas.

Tabela 7 – Distribuição dos valores da razão $(d.p./média)_{w_{MAG}}$ para os ensaios cinéticos com reações não destrutivas e destrutivas

Intervalos para os valores de $(d.p./média)_{w_{MAG}}$	Número de pontos da curva cinética dentro do intervalo para:	
	Reações destrutivas	Reações não destrutivas
$0 \leq (d.p./média)_{w_{MAG}} \leq 0,25$	10	13
$0,25 < (d.p./média)_{w_{MAG}} \leq 0,50$	3	2
$0,50 < (d.p./média)_{w_{MAG}} \leq 0,75$	2	0

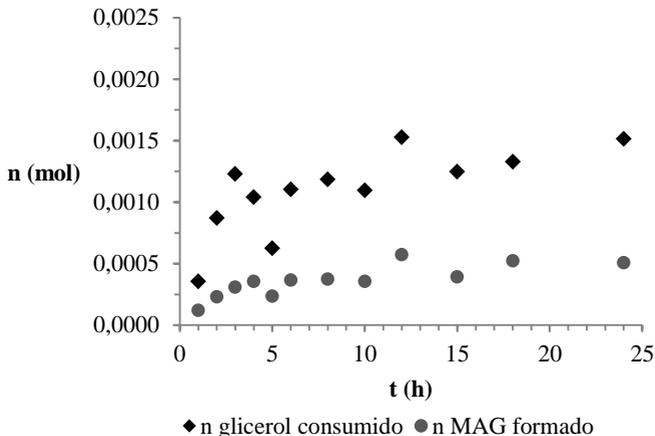
Fonte: O autor

4.4.3. Comparação entre os resultados obtidos por meio do acompanhamento da reação através da quantificação de glicerol consumido e de MAGs formados

A comparação entre as quantidades de glicerol consumido e de MAGs produzidos será discutida apenas para os ensaios realizados com reações destrutivas, uma vez que, conforme discutido anteriormente, o acompanhamento da reação através de reações não destrutivas fornece

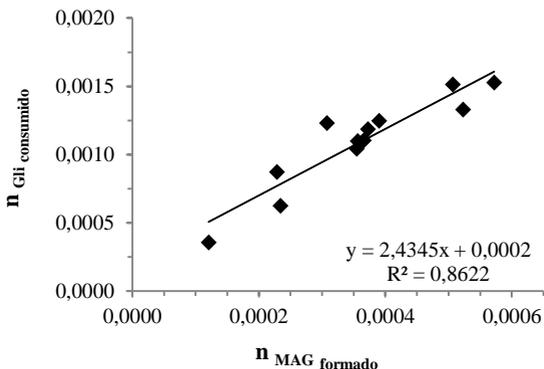
apenas a velocidade de transferência dos substratos e produtos da superfície do biocatalisador para a fase líquida do meio reacional.

Figura 29 - Comparação entre a variação do número de moles de glicerol consumido e de MAG formado em função do tempo para os ensaios com reações destrutivas



n (mol), número de moles; t (h), tempo em horas.

Figura 30 – Relação entre o consumo de glicerol e a formação de MAG



$n_{Gli\ consumido}$ e $n_{MAG\ formado}$, número de moles de glicerol consumido e de MAG formado.

Como o volume do meio reacional é constante, é adequado confrontar os resultados pela comparação entre os valores do número de moles de glicerol consumido e do número de moles de MAGs produzido

durante a reação. A Figura 29 demonstra que o perfil de consumo de glicerol acompanha o perfil de formação de MAGs, inclusive nos pontos mais discrepantes da linha de tendência, como para $t = 5$ e $t = 12$ h.

Para facilitar a visualização da relação entre o consumo de glicerol e formação de MAG, foi traçado um gráfico do número de moles de glicerol consumido versus o número de moles de MAG formado, $n_{Glicerol\ consumido} \times n_{MAG\ formado}$ que encontra-se na Figura 30. Através da equação obtida por regressão linear, chega-se a seguinte relação entre o consumo de glicerol e a formação de MAG representado pela Equação 12.

$$n_{Gli}/n_{MAG} = 2,44 \quad (12)$$

Onde:

n_{Gli} : número de moles de glicerol;

n_{MAG} : número de moles de MAG.

Conforme será discutido na próxima secção, o maior valor possível para a relação n_{Gli}/n_{MAG} é 1,50. Portanto o valor obtido na Equação 1 indica a existência de perdas de glicerol durante as etapas de filtração e lavagem do meio reacional e enzima, bem como durante a etapa de extração.

4.5. ANÁLISE DO RENDIMENTO REAL DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE DO AZEITE DE OLIVA EXTRA-VIRGEM EM FUNÇÃO DA FORMAÇÃO DE MAG

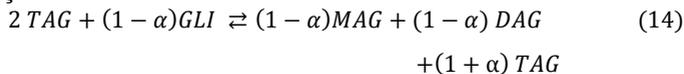
Conforme apresentado na secção 3.2.4 deste trabalho, o rendimento da reação de glicerólise do azeite de oliva pode ser expresso como a razão entre $w_{MAG\ real}$ e $w_{MAG\ teórico}$.

Para se calcular $w_{MAG\ teórico}$ são necessárias algumas considerações teóricas sobre a reação de glicerólise de óleos. De acordo com a estequiometria utilizada neste trabalho - razão molar azeite de oliva/glicerol de 2:1 - considerando que todas as moléculas de glicerol reajam apenas com outras moléculas de TAG, a reação de glicerólise de TAGs é descrita pela Equação 13:

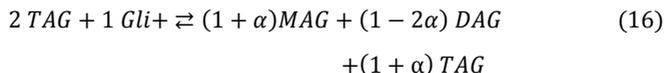


Todavia, a partir do momento que moléculas de DAG são geradas, essas podem reagir com o glicerol do meio reacional. Considerando que uma certa quantidade α de moles de glicerol presente no meio reacional reaja com α moles de DAG gerado, a reação global de glicerólise poderá ser descrita como a soma de duas reação parciais.

A primeira reação, descrita na Equação 14 é aquela que ocorre entre glicerol e TAG formando MAG e DAG. A segunda reação, descrita na Equação 15, processa-se entre o glicerol e o DAG gerado na primeira reação.



Somando-se as Equações 14 e 15, obtém-se Equação 16 para a reação global:



O valor mínimo de α ocorrerá quando a segunda reação não se processar, isto é, $\alpha_{\text{mínimo}} = 0$, nesse caso a equação global se reduzirá à Equação 13. O valor máximo de α será aquele que anulará a geração líquida de DAG, isto é, quando $1 - 2\alpha = 0$, portanto $\alpha_{\text{máximo}} = 0,5$. Portanto, o rendimento máximo teórico assumirá valores distintos para os dois cenários possíveis:

- 1) quando a segunda reação não se processa ($\alpha_{\text{mínimo}} = 0$);
- 2) quando a segunda reação se processa numa extensão tal que $\alpha = \alpha_{\text{máximo}} = 0,5$.

Como os resultados deste trabalho não permitem identificar o mecanismo através do qual a reação de glicerólise do azeite de oliva se processou, o rendimento teórico será expresso como um intervalo de valores entre cada um dos cenários anteriormente mencionados. O cálculo do rendimento foi realizado apenas para os ensaios com reações destrutivas, pois conforme já discutido anteriormente, essa é a modalidade de ensaio mais adequada para o acompanhamento da reação.

Tabela 8 - Massas molares das espécies químicas envolvidas na reação de glicerólise do azeite de oliva extra-virgem

Espécie química	Massa molar (g.mol ⁻¹)
Trioleína	885,43
Monooleína	356,54
Dioléina	620,99
Glicerol	92,09

Para efeitos de cálculo, assumiu-se que o azeite de oliva é composto apenas por trioleína, de modo que a reação de glicerólise renderá mono e dioléina. As massas molares dos reagentes e produtos estão listados na Tabela 8.

Utilizando a Equação 11, descrita na secção 3.2.4, tem-se os seguintes valores de $w_{MAG\ te\acute{o}rico}$ para os casos 1 e 2:

- 1) se $\alpha_{m\acute{m}imo} = 0$, $w_{MAG\ te\acute{o}rico} = 0,19$;
- 2) se $\alpha = \alpha_{m\acute{a}ximo} = 0,5$; $w_{MAG\ te\acute{o}rico} = 0,29$.

Como $w_{MAG\ m\acute{a}ximo} = 0,0900 \pm 0,0136$, o rendimento em MAG assumirá os seguintes valores para os casos 1 e 2:

- 1) se $\alpha_{m\acute{m}imo} = 0$, $Rendimento_{MAG} = 0,47$;
- 2) se $\alpha = \alpha_{m\acute{a}ximo} = 0,5$; $Rendimento_{MAG} = 0,31$.

Portanto o rendimento em MAG, pode ser expresso da seguinte forma: $0,31 \leq Rendimento_{MAG} \leq 0,47$.

Através da metodologia de superfície de resposta para otimizar e reação de glicerólise de azeite de oliva catalisada por lipase de *Candida rugosa*, com razão molar glicerol/azeite de oliva de 3:2, obteve-se, após 5 horas de reação, fração mássica final de MAG (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2013). Fazendo os cálculos, para uma razão molar glicerol/óleo igual a 3:2, o valor máximo de $w_{MAG\ te\acute{o}rico}$ seria aproximadamente 0,7, portanto o rendimento obtido nestas condições foi de 0,55.

A reação de glicerólise, catalisada pela Lipozyme TL IM[®] em meio livre de solvente, utilizou a razão molar glicerol/óleo de soja de 4:1, e após 24 horas de reação, obteve-se fração mássica de MAG de aproximadamente 0,20; que para a estequiometria utilizada representa um rendimento de 0,23 (FREGOLENTE et al., 2008).

Em relação ao uso de excesso molar de TAGs como estratégia para prevenir a aglomeração do derivado enzimático, a reação de glicerólise do óleo de soja utilizando razão molar óleo/glicerol de 5:4, catalisada pela lipase imobilizada Novozym 435[®], forneceu, após três horas de reação, um valor de fração mássica de MAG igual a 0,31; o que equivale a rendimento igual a 0,69 (REMONATTO et al., 2015). Entretanto, ressalta-se que nesse trabalho foi feito uso de uma fonte de ultrassom como forma de melhorar a miscibilidade entre os reagentes e de biocatalisador de custo elevado, cujo suporte é uma resina hidrófoba, e consolidado por exibir ótima atividade em reações de glicerólise de óleos e gorduras (FELTES et al., 2013; KRISTENSEN; XU; MU, 2005; NAIK; NAIK; MOHANTY, 2014)

Contudo, para se empregar o derivado enzimático Lipozyme TL IM em uma reação de glicerólise é necessário utilizar excesso molar de TAG, pois quantidades maiores de glicerol provocam a formação de grânulos de biocatalisador, o que impede o acesso das moléculas de TAG ao sítio ativo da enzima. Porém, sabe-se que o excesso molar de glicerol é fundamental para se deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação de MAGs (HASENHUETTL, 2008b; SONNTAG, 1982). Diante dessas considerações, os resultados obtidos neste trabalho são considerados bons e abrem caminhos para o emprego de uma enzima comercial de baixo custo para produção de emulsificantes.

5. CONCLUSÃO

- O conhecimento do perfil de ácido graxos do azeite empregado foi importante para conhecer quais serão os principais monoacilgliceróis que serão formados durante a reação de glicerólise e para uma interpretação criteriosa dos cromatogramas.
- A metodologia desenvolvida para a quantificação do glicerol por espectrofotometria permitiu acompanhar a reação em função da concentração em fração mássica, w_{GLI} , deste reagente, porém requer um aprofundamento e modificações nas etapas de lavagem do meio reacional e extração líquido/líquido a fim de reduzir os desvios padrão.
- A metodologia implementada para quantificação dos acilgliceróis, Cd 11b-91 (AOCS, 2003c), permitiu o acompanhamento da reação em função da formação de monoacilgliceróis (MAGs).
- O acompanhamento da reação de glicerólise através de ensaios cinéticos com reações não destrutivas não fornece valores reais da concentração de reagentes consumidos e produtos formados ao longo da reação, apenas permite conhecer o perfil de dispersão de reagentes e produtos transferidos da partícula do biocatalisador para a fase líquida do meio reacional. Isso fica mais claro ao se comparar o valor da velocidade inicial de dispersão de reagentes e produtos transferidos da partícula do biocatalisador para a fase líquida do meio reacional obtido através dos ensaios com reações não destrutivas, $v_{iMAG}^D = 0,0064 g_{MAG} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$, é 2,7 vezes menor que o valor de velocidade inicial de formação de MAG $v_{iMAG} = 0,0174 g_{MAG} \cdot g_{meio}^{-1} \cdot h^{-1}$
- O glicerol possui elevada afinidade com o suporte do biocatalisador e uma fração considerável deste reagente permanece adsorvida na superfície do derivado enzimático durante todo o tempo de reação, conforme verifica-se ao se observar que o valor de fração mássica máxima de glicerol obtido para os ensaios com reações não destrutivas, $w_{GLI_{máximo}} = 0,003$ é 5,8 vezes menor que o valor mínimo da fração mássica de glicerol obtido para os ensaios com reações destrutivas, $w_{GLI_{mínimo}} = 0,018$.

- Como não foi possível identificar através de qual mecanismo a reação de glicerólise se processou, foi estabelecido que o rendimento da reação em MAG situa-se entre 31 e 47%. Esse intervalo foi considerado bom, dado que a reação de glicerólise foi conduzida com excesso molar do óleo e sem o auxílio de surfactantes e ultrassom.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aprimorar as técnicas de extração do glicerol, bem como as etapas de lavagem e filtração do meio reacional a fim de tornar a quantificação do glicerol por espectrofotometria adequada para o acompanhamento de reações de glicerólise.
- A partir do valor de velocidade inicial de formação de MAGs, projetar um reator operado em modo de batelada alimentada em relação ao glicerol no intuito de incrementar a produção de MAGs.
- Aprofundar-se no estudo da adsorção do glicerol no suporte do derivado enzimático Lipozyme TL IM ®.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999.**

ANVISA. Brasília: D.O.U. - Diário Oficial da União 1999.

ANDRADE, D.; PINHEIRO, H. L. C.; VALE, M.; et al.

Spectrofluorimetric determination of formaldehyde in air after collection onto silica cartridges coated with Fluoral P. **Microchemical Journal**, v. 78, p. 15–20, 2004.

AOCS. Official Method Ce 1-62: Fatty Acid Composition by Gas Chromatography. In: FIRESTONE, D. (Ed.). . **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th. ed. Champaign: AOCS Press, 2003a.

AOCS. Official Method Ca 14-56: Total, Free and Combined Glycerol - Iodometric - Periodic Acid Method. In: FIRESTONE, D. (Ed.). . **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th. ed. Champaign: AOCS Press, 2003b.

AOCS. Official Method Cd 11b-91: Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography. In: FIRESTONE, D. (Ed.). . **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 5th. ed. Champaign: AOCS Press, 2003c.

APARICIO, R.; LUNA, G. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 9-10, p. 614–627, 2002.

ARANDA, F. et al. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. **Food Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 485–492, 2004.

ASTM. Standard Test Method for Determination of Total Monoglycerides , Total Diglycerides , Total Triglycerides , and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography 1. **Annual Book of ASTM Standards**, n. C, p. 1–9, 2011.

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 3, p. 153–157, 2005.

CASTRO, H. F. D. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CHEIRSILP, B.; JEAMJOUNKHAW, P.; H-KITTIKUN, A. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 206–211, jul. 2009.

CHO, K. H.; HONG, J. H.; LEE, K. T. Monoacylglycerol (MAG)-Oleic Acid Has Stronger Antioxidant, Anti-Atherosclerotic, and Protein Glycation Inhibitory Activities than MAG-Palmitic Acid. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 99-107, Feb 2010.

CORREIA, A. C.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Produção de Emulsionantes através da Glicerólise de Óleo de Bagaço de Azeitona Catalisada pela Lipase da *Candida Rugosa* Imobilizada em Espumas de Poliuretano. **Millenium**, v. 41, p. 7–15, 2011.

COVAS, M.-I. et al. Minor Components of Olive Oil: Evidence to Date of Health Benefits in Humans. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 10, p. s20–s30, 2006.

DAIS, P.; HATZAKIS, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 1–27, 2013.

DE CASTRO, H. F.; NAPOLEÃO, D. A.; OLIVEIRA, P. C. Production of citronellyl acetate in a fed-batch system using immobilized lipase. Scientific note. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 70-72, p. 667–75, 1998.

DHIFI, W. et al. Virgin olive oil aroma: Characterization of some Tunisian cultivars. **Food Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 697–701, 2005.

- DÍAZ-ÁLVAREZ, A. E. et al. Glycerol and derived solvents: new sustainable reaction media for organic synthesis. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6208, 2011.
- EVERSHED, R. P. Advances in Silylation. In: BLAU, K.; HALKET, J. M. (Eds.). . **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 1993. p. 52.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 4^o ed. Berlin: Springer, 2000.
- FELTES, M. M.; CAMINO; OLIVEIRA, D. DE; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L. The Production , Benefits , and Applications of Monoacylglycerols and Diacylglycerols of Nutritional Interest. **Food Bioprocess Technology**, , n. 6, p. 17–35, 2013.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, Mar 2010.
- FERREIRA-DIAS, S.; DA FONSECA, M. M. R. Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases: Effect of the water activity. **Bioprocess Engineering**, v. 12, n. 6, p. 327–337, 1995.
- FIAMETTI, K. G. et al. Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 440–451, maio 2012.
- FRANKEL, E. et al. Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 22, p. 5179–5188, 2013.
- FREGOLENTE, P. B. L. et al. Monoglycerides and Diglycerides Synthesis in a Solvent-Free System by Lipase-Catalyzed Glycerolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 165–172, 2008.

FREITAS, L. et al. Enzymatic synthesis of glyceride esters in solvent-free system: Influence of the molar ratio, lipase source and functional activating agent of the support. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p. 1360–1366, 2007.

FREITAS, L. **Estratégias para desenvolvimento de um sistema operacional eficiente para produção enzimática de monoglicérides**. 2009. 154 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

FREITAS, L. et al. Enzymatic synthesis of monoglycerides by esterification reaction using *Penicillium camembertii* lipase immobilized on epoxy SiO₂-PVA composite. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 87–90, 2010.

HASENHUETTL, G. L. Analysis of food emulsifiers. **Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition**, p. 39–62, 2008a.

HASENHUETTL, G. L. Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. **Food Emulsifiers and Their Applications: Second Edition**, p. 11–37, 2008b.

HASHIM, Y. Z. H. Y. et al. Components of olive oil and chemoprevention of colorectal cancer. **Nutrition reviews**, v. 63, n. 11, p. 374–386, 2005.

H-KITTIKUN, A.; KAEWTHONG, W.; CHEIRSILP, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 116–120, maio 2008.

ILLANES, A. et al. Heterogeneous Enzyme Kinetics. In: **Enzyme Biocatalysis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. p. 155–203.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology. Gold Book**. MCNAUGHT, A. D. e WILKINSON, A. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1997.

JUNIOR, I. I. et al. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. **“Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic”**, v. 77, p. 53–58, 2012.

KAEWTHONG, W. et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525–1530, abr. 2005.

KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN, A. Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 218–222, ago. 2004.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 82, n. 5, p. 329–334, 2005.

KRUGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2010. 132 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

KULKARNI, C. V et al. Monoolein: a magic lipid? **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 13, n. 8, p. 3004–3021, 2011.

LEE, L. Y. et al. Saturated Distilled Monoglycerides Variants in Gel-form Cake Emulsifiers. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 191–198, 2014.

LEN, C.; LUQUE, R. Continuous flow transformations of glycerol to valuable products: an overview. **Sustainable Chemical Processes**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

LIU, N. et al. Immobilisation of lecithase?? ultra for production of diacylglycerols by glycerolysis of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 301–307, set. 2012.

MATAR, S.; HATCH, L. F. Chemicals Based on Propylene. In: **Chemistry of Petrochemical Processes**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 213–237.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 1, de 30 de janeiro de 2012**. MAPA. Brasília: D.O.U. – Diário Oficial da União, 01 de fevereiro de 2012.

MCNEILL, G. P.; YAMANE, T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 68, n. 1, p. 6–10, 1991.

MONASTERIO, R. P.; FERNÁNDEZ, M. D. L. Á.; SILVA, M. F. Olive oil by capillary electrophoresis: Characterization and genuineness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4477–4496, 2013.

NAIK, M. K.; NAIK, S. N.; MOHANTY, S. Enzymatic glycerolysis for conversion of sunflower oil to food based emulsifiers. **Catalysis Today**, v. 237, p. 145–149, 2014.

NEWMARK, H. L. Squalene , Olive Oil , and Cancer Risk. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 193–203, 2006.

NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W. D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1865–1875, 2012.

O’FALLON, J. V. et al. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1511–1521, 2007.

OHTA, Y.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Inhibition and Inactivation of Lipase by Fat Peroxide in the Course of Batch and Continuous Glycerolyses of Fat by Lipase1 containing on enzyme inactivation during lipase-catalyzed Analytical procedures. v. 53, n. 7, p. 1885–1890, 1989.

PÉREZ, L. et al. Monoglyceride surfactants from arginine: synthesis and biological properties. **New Journal of Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1326, 2004.

PURDY, C. Fluoral-P, a member of a selective family of reagents for aldehydes. **Analytica Chimica Acta**, v. 119, p. 349–357, 1980.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475–493, 2013.

REMONATTO, D. et al. Lipase-Catalyzed Glycerolysis of Soybean and Canola Oils in a Free Organic Solvent System Assisted by Ultrasound. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 850–862, 2015.

REZAEI, K.; TEMELLI, F. Lipase catalysed hydrolysis of canola oil in supercritical CO₂. **Journal American Oil Chemistry Society**, v. 77, n. 8, p. 903–909, 2000.

RIBEIRO, M. S.; ROCHA, F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 23–26, 2013.

ROSU, R. et al. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 445–450, 1997.

SANTOS, J. S. et al. Glycerolysis of fish oil catalyzed by a commercial lipase from *Rhizomucor miehei* in reaction media containing food grade surfactant. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 46–51, 2013.

SARNEY, D. B.; VULFSON, E. N. Application of Enzymes to the Synthesis of Surfactants. *Trends in Biotechnology*, v. 13, n. 5, p. 164–172, May 1995.

SINGH, K.; MUKHOPADHYAY, M. Response surface methodology for optimizing the glycerolysis reaction of olive oil by *Candida rugosa* lipase. **Chemical Industry and Chemical ...**, v. 20, n. 1, p. 1–20, 2013.

SONNTAG, N. O. V. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters - Status, Review and Critique. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, n. 10, p. 795–802, 1982.

SZELAG, H.; ZWIERZYKOWSKI, W. The behaviour of modified monoacylglycerol emulsifiers in emulsion systems. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 155, n. 2-3, p. 349-357, Sep 1999.

TAN, H. W.; ABDUL AZIZ, A. R.; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118–127, 2013.

TEIXEIRA, L. F. et al. Effect of natural antioxidants on the lipase activity in the course of batch and continuous glycerolysis of babassu oil. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1–9, 2014.

VALÉRIO, A. et al. Optimization of mono and diacylglycerols production from enzymatic glycerolysis in solvent-free systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 7, p. 805–812, set. 2010.

VOLL, F. et al. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 107–115, out. 2011.

WANG, W. et al. Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 2, p. 192–196, 10 jul. 2011.

WEBER, N.; MUKHERJEE, K. D. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diacylglycerols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5347–5353, 2004.

XU, Y. et al. In situ visualization and effect of glycerol in lipase-catalyzed ethanolysis of rapeseed oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 213–219, 2011.

YANG, T. et al. Enzymatic production of monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1475–1481, 2005.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. D. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S. e PIETRO, R. C. L. R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1°. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4, p.35-36.

ZENG, F. K. et al. Enzymatic Production of Monoacylglycerols with Camellia Oil by the Glycerolysis Reaction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 87, n. 5, p. 531-537, May 2010.

ZHANG, H. et al. Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, 2009.

ZIELINSKI, W. L. Evaluation of the Internal Standard Method for the Quantitative Estimation of Oil Polymer Content by Gas Chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 41, n. 4, p. 249–251, 1974.

ANEXO A – Product data sheet (ficha de informação de produto) do derivado enzimático Lipozyme TL IM

Product Data Sheet



1 of 1

Valid from 2012-11-27

Lipozyme® TL IM

In this product the key enzyme activity is provided by lipase that hydrolyzes esterbonds in glycerides

PRODUCT CHARACTERISTICS/PROPERTIES

Declared enzyme	Lipase
Declared activity	250 IU/N/g
Color	Off-white
Physical form	Immobilized Granulate
Approximate density (g/ml)	0.42

Color can vary from batch to batch. Color intensity is not an indication of enzyme activity.

PRODUCT SPECIFICATION

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Interesterification unit IUN	250		/g
Loss on drying 105 C	-	8	%
Laser diffraction >1180 micron	-	15	%
Laser diffraction <250 micron	-	10	%
Total viable count	-	50000	/g
Coffform bacteria	-	30	/g
E.coli	Not Detected		25 g
Salmonella	Not Detected		25 g
Heavy metals		Max. 30	mg/kg
Lead		Max. 5	mg/kg
Arsenic		Max. 3	mg/kg
Cadmium		Max. 0.5	mg/kg
Mercury		Max. 0.5	mg/kg

The enzyme analytical method is available from the Customer Center or sales representative.

COMPOSITION

Ingredients	Appr. % (w/w)
Silicon Dioxide, carrier, CAS no. 7631-86-9	74.60
Lipase, CAS no. 9001-62-1*	10
Maltodextrin, CAS no. 9050-36-6	10
Water, CAS no. 7732-18-5	4
Sodium chloride, CAS no. 7647-14-5	1
Sodium benzoate, CAS no. 532-32-1	0.20
Potassium sorbate, CAS no. 24634-61-5	0.20

*Defined as enzyme conc. (dry matter basis)

PRODUCTION ORGANISM

Produced by submerged fermentation of a genetically modified micro organism. The enzyme protein, which in itself is not genetically modified, is separated and purified from the production organism.

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2860 Søborg
Denmark

Tel. +45 4446 0000
Fax +45 4446 9999

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S

STORAGE CONDITION

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance if stored at 0–10 °C/32–50 °F and used prior to the best-before date. If stored at max. 25 °C/77 °F, the product should be used within 3 months after delivery.

SAFETY AND HANDLING PRECAUTIONS

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spill.

COMPLIANCE

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.