LUIZ ANTONIO GIOIELLI

**Reação de esterificação entre glicerol e ácidos graxos
como subsídio para transesterificação de lipídeos**

**Dissertação apresentada ao Departamento
de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.**

Orientador:

Prof. Dr. Renato Baruffaldi

SÃO PAULO

- 1979 -

A meus pais

Raphael e Amélia

À Maria Lúcia

Ao Prof. Adjunto Dr. Renato Baruffaldi,
pela orientação e incentivo, que tor
naram possível o presente trabalho,
os nossos agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eugênio Aquarone, pelo convite para o ingresso na carreira universitária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP -, pelo auxílio concedido ao plano "Cinética de transesterificação", que possibilitou, em parte, a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Andrejus Korolkovas, pela revisão do texto.

À Leda Maria Brunelli, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao Prof. Dr. Bruno Carlos de Almeida Cunha e aos Colegas Michele Vitolo e Ricardo Schuch, pelo auxílio e sugestões.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

Pág.

I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Métodos de Modificação de Óleos e Gorduras.....	2
1.1.1. Fracionamento.....	2
1.1.2. Hidrogenação.....	3
1.1.3. Interesterificação.....	4
1.2. Esterificação.....	5
1.3. Técnicas Empregadas.....	11
II - OBJETIVOS.....	15
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Materiais.....	17
3.1.1. Reagentes, Solventes, Padrões.....	17
3.1.2. Equipamentos.....	17
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Índice de Acidez.....	18
3.2.2. Análise Quantitativa das Frações.....	18
3.2.3. Esterificação.....	18
3.2.4. Análises por Cromatografia em Fase Gasosa.....	19
3.2.5. Hidrólise Enzimática.....	20
IV - PARTE EXPERIMENTAL.....	21
4.1. Esterificação.....	21
4.2. Índice de Acidez.....	22
4.3. Avaliação Quantitativa das Frações.....	22
4.4. Técnicas Complementares.....	22

V - RESULTADOS.....	23
5.1. Características do Ácido Graxo.....	23
5.2. Cromatografia em Camada Delgada.....	23
5.3. Reação I.....	25
5.4. Reação II.....	25
5.5. Técnicas Complementares.....	26
VI - DISCUSSÃO.....	44
6.1. Análises por Cromatografia em Camada Delgada.....	44
6.2. Análises por Cromatografia em Fase Gasosa dos Ácidos Graxos.....	45
6.3. Técnicas Complementares.....	46
6.4. Cinética da Reação.....	48
6.5. Formação dos Intermediários e do Produto Final.....	60
VII - CONCLUSÕES.....	64
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

I - INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras desempenham importante papel na alimentação humana, quer pelo seu alto valor calórico, quer como fonte de vitaminas lipossolúveis ou de ácidos graxos essenciais, como os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico.

Comercialmente, são apresentados nas formas de óleos de mesa para tempero, óleos e gorduras para fritura, manteiga, margarina e gordura vegetal hidrogenada, além de serem incorporados na confecção de numerosos outros produtos, como pães, bolos, sorvetes, chocolates e maioneses.

A produção mundial de óleos e gorduras comestíveis apresenta crescimento regular nos últimos 30 anos, já tendo ultrapassado a casa dos 45 milhões de toneladas anuais¹⁰, sendo que aproximadamente 2/3 desse total são representados por produtos de origem vegetal²⁷.

As diferentes propriedades dos óleos e gorduras são determinadas, em grande parte, pelos seus ácidos graxos constituintes, que variam no comprimento da cadeia, número e posição das duplas ligações e disposição com relação ao glicerol.

Para atender às diferentes aplicações mencionadas, os óleos e gorduras devem respeitar exigências específicas para cada caso, que nem sempre podem ser satisfeitas por produtos obtidos da natureza ou por aqueles cujas fontes naturais são mal aproveitadas ou existem em pequena quantidade, sendo exemplos típicos a gordura de cacau e a manteiga.

Para suprir essas necessidades do mercado e para fornecer produtos uniformes a partir de matérias-primas variáveis, técnicas de modificação de óleos e gorduras, como o fracionamento, a hidrogenação e a interesterificação, permitem maior flexibilidade de escolha da matéria-prima e ajudam a equilibrar as tendências entre disponibilidade local e demanda.

No estágio atual, esses métodos estão tão firmemente estabelecidos e são aplicados em escala tão grande que seria praticamente impossível atender aos padrões de mercado sem o uso de técnicas de modificação⁹.

1.1. MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

Os métodos de modificação podem ser divididos em três tipos⁹:

a. representado pelo fracionamento. Compreende simplesmente separação física dos triglicérides, permanecendo inalterados tanto estes quanto seus ácidos graxos constituintes.

- b. representado pela hidrogenação. Compreende saturação das duplas ligações dos ácidos graxos, permanecendo inalteradas as ligações éster das moléculas triglicerídicas.

c. representado pela interesterificação. Compreende rearranjo dos ácidos graxos, que permanecem não modificados, nas posições do glicerol, resultando em novas estruturas glicerídicas.

Todas as técnicas produzem substâncias de comportamento modificado com relação à cristalização e à fusão, enquanto que a estabilidade contra a autoxidação só é alterada pela hidrogenação.

Em muitos casos, aplicam-se combinações de técnicas, a fim de conseguir resultado específico desejado.

1.1.1. FRACIONAMENTO

A operação de fracionamento é basicamente a separação de óleos e gorduras em duas ou mais frações com diferentes pontos de fusão.

O fracionamento, normalmente obtido através de cristalização parcial, nas operações de larga escala, é aplicado geralmente para eliminar, de uma gordura ou óleo, uma fração que é responsável por propriedades indesejáveis ou para se obter uma fração que apresente características convenientes.

Essa técnica de modificação tem grande aplicação na tecnologia de óleos e gorduras comestíveis, como no processo de desmargarinização de óleos vegetais, visando à eliminação de triglicérides de alto ponto de fusão para evitar a turvação em dias mais frios, ou na produção de sucedâneos da manteiga de cacau a partir de óleos de palma e de caroço de palma ou a partir de óleos de soja e algodão hidrogenados²⁶.

1.1.2. HIDROGENAÇÃO

Esse processo é empregado em larga escala nas indústrias de óleos e gorduras comestíveis, assim como no campo dos sabões e dos óleos industriais.

A hidrogenação visa a eliminar parte das duplas ligações dos ácidos graxos, uma vez que a completa saturação da maioria dos óleos resulta em produtos com pontos de fusão muito altos, inadequados para uso alimentício. Uma proporção significativa das duplas restantes é isomerizada por conversão cis-trans e mudança de posição na cadeia dos ácidos graxos.

Como resultado dessas transformações químicas, ocorre alteração em dois importantes aspectos de qualidade: a faixa de fusão é levada a temperaturas mais altas e é melhorada a estabilidade à oxidação e à mudança do aroma¹⁰.

A aplicação principal da hidrogenação é a conversão dos óleos líquidos, como os de algodão, soja e outros óleos vegetais, em gorduras plásticas, semi-sólidas, adequadas para a manufatura de gorduras vegetais ou margarinas, substitutos de gorduras animais originalmente mais caras e menos abundantes³³.

1.1.3. INTERESTERIFICAÇÃO

O termo interesterificação se refere ao processo em que os ésteres de ácidos graxos de gorduras e óleos reagem com outros ésteres, álcoois ou ácidos graxos para produzirem novos ésteres pelo intercâmbio de ácidos graxos.

Os tipos de interesterificação possíveis são:

a. intercâmbio entre uma gordura e ácidos graxos livres (acidólise), em que a reação mais importante é a introdução de ácidos de baixo peso molecular em uma gordura com ácidos graxos maiores.

b. intercâmbio entre uma gordura e um álcool (alcoólise), por exemplo, com glicerol, a fim de produzir emulsificantes como monoglicérides.

c. rearranjo de radicais ácido graxo em triglicérides, com reações intra ou intermoleculares, denominado transesterificação.

Desde 1950 a importância do processo de interesterificação tem aumentado continuamente e a transesterificação, principalmente, nos últimos anos tem assumido a mesma importância da hidrogenação ou fracionamento de óleos vegetais²³.

Nos óleos e gorduras naturais os grupos ácido graxo não estão usualmente distribuídos ao acaso entre as posições da molécula do glicerol, mas tornam-se assim pelo rearranjo³⁵.

Nos óleos vegetais, a posição central do glicerol é frequentemente ocupada de preferência por um ácido insaturado. Nas gorduras animais prevalecem outros tipos de desvio da distribuição estatística⁹.

As distintas propriedades físicas de gorduras e óleos naturais como o ponto de fusão, teor de gordura sólida, tendência à cristalização e textura podem ser mudadas dentro de certos limites pela transesterificação. Mais importante é a transesterificação de uma mistura de diferentes gorduras e óleos. Por exemplo, a combinação de hidrogenação e interesterificação permite a produção de gordura sólida com alto teor de ácido linoléico ou linolênico, utilizada na fabricação das chamadas margarinas ricas em ácidos polinsaturados⁴⁴.

O uso da interesterificação de misturas de gordura e óleo na indústria é muito importante e extremamente versátil. Uma vantagem principal da interesterificação é que o uso desse processo permite a combinação das propriedades de diferentes gorduras e óleos. Muitas dessas misturas de gorduras interesterificadas têm aplicação na fabricação de margarina, gordura vegetal hidrogenada e substitutos da manteiga de cacau²³.

1.2. ESTERIFICAÇÃO

Para que se possa montar uma linha de pesquisa dentro do campo das técnicas de modificação de óleos e gorduras, especialmente tratando das reações de interesterificação e, em particular, da transesterificação, que parece mais promissora, torna-se indispensável o desenvolvimento, de início, do estudo da reação de esterificação entre ácidos graxos e glicerol, uma vez que nesta primeira fase serão obtidos alguns parâmetros a serem aplicados nesse programa, como as características físico-químicas dos triglicérides e a identificação de picos cromatográficos.

Esterificação é a condensação entre um ácido e um álcool para formar um éster e água. A reação inversa é a hidrólise.

A esterificação de ácidos carboxílicos envolve a perda de água entre o grupo hidroxila do ácido e o hidrogênio do álcool:

Ácidos fortes como H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4 e ácido p-toluenossulfônico catalisam a esterificação. A reação é bimolecular, mas se é usado grande excesso de ácido ou álcool, ela se torna de pseudo-primeira ordem¹⁹.

A reação de esterificação entre glicerol e ácidos graxos, também chamada de re-esterificação, porque seus elementos são normalmente obtidos de fontes naturais, os triglicérides, componentes predominantes dos óleos e gorduras, é a mais importante dentre aquelas que ocorrem com álcoois poliídricos.

O processo de re-esterificação, conjugado com o fracionamento, é importante na modificação de óleos para fornecer produtos novos, de provável aplicação industrial¹⁸.

Dessa forma, há a possibilidade da formação de compostos em que todos os grupamentos hidroxílicos estão esterificados, os chamados triglicérides, e de compostos em que a esterificação é parcial, os mono e diglicérides.

Para a identificação dos isômeros, as posições do grupo glicerílico são designadas como segue³⁰:

A esterificação entre glicerol e ácidos graxos enquadra-se na classe das reações consecutivas competitivas²⁵.

Consecutiva porque o produto formado funciona como reagente de uma reação posterior. No caso, há dois produtos intermediários, o mono e o diglicéride, e um produto final, o triglicéride.

Competitiva porque tanto a substância inicial, o glicerol, como os intermediários disputam um reagente comum, os ácidos graxos.

Esquemáticamente, pode ser assim representada¹⁹:

* AG representa ácido graxo

Todas as fases apresentadas são reversíveis. Entretanto, a condição de reversibilidade pode ser descartada, uma vez que normalmente o processo é realizado em condições que permitem a eliminação da água formada do meio de reação, deslocando o equilíbrio no sentido indicado.

Conforme se pode ver, há tendência maior de formação de 1-monoglicéride e 1,3-diglicéride, visto que os grupos ácido graxo da posição 2 do glicerol tendem a migrar para as posições 1-3¹⁶.

Ao contrário das reações de esterificação que envolvem álcoois monoídricos, excesso de glicerol não se pode empregar quando se deseja esterificação completa, ou seja, formação de triglicérides em alta proporção, porque os grupos ácido graxo se distribuiriam entre todas as posições reativas produzindo teor maior de mono e diglicérides.

Desse modo, a preparação industrial de mono e diglicérides pode ser feita por esterificação de ácidos graxos com excesso de glicerol ou por alcoólise (glicerólise) de óleo ou gordura. O produto é mistura de mono, di e triglicérides com glicerol que não reagiu³¹.

Quando se emprega somente um tipo de ácido graxo na esterificação, pode-se formar apenas um triglicéride. Contudo, se forem utilizados dois ou mais ácidos, o produto da reação consistirá de mistura de ésteres em várias proporções, mistura essa que dependerá da concentração de cada ácido presente. Dessa forma, estabelece-se equilíbrio entre os vários glicérides possíveis, correspondendo à máxima heterogeneidade, isto é, distribuição ao acaso dos ácidos graxos entre as hidroxilas do glicerol³⁰.

A reação do glicerol com ácidos graxos em quantidades estequiométricas, ou equivalentes, para formar triglicérides, deve ser efetuada à temperatura elevada, mantendo-se o sistema em reação sob pressão reduzida ou usando-se outros meios para remover continuamente a água que é formada, como, por exemplo, borbulhando

gás inerte. Visto que os reagentes não são miscíveis em todas as proporções, deve-se agitar a mistura. Deve-se inserir um condensador parcial na linha de vácuo para condensar e fazer retornar os vapores do glicerol ao recipiente, enquanto permite o escape do vapor de água⁴⁵.

Aumentar a temperatura para elevar a velocidade de esterificação é técnica útil, mas a temperatura máxima não deve exceder cerca de 240°C ¹⁶, embora MARTINENGHI³² aconselhe não ultrapassar 190°C , a fim de se evitar ação térmica indesejável.

A velocidade da reação pode ser consideravelmente aumentada pelo uso de catalisadores, mas usualmente em detrimento da cor. Entre os catalisadores incluem-se materiais ácidos, como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácidos sulfônicos, ácido trifluoracético e trifluoreto de boro e metais, como chumbo, zinco e cálcio, além de outros, na forma de acetatos, alcóxidos, carbonatos, cloretos, fluoretos, hidróxidos e óxidos¹⁹.

Segundo FEUGE¹⁶, a esterificação catalisada do glicerol com ácidos graxos pode ser levada a um estágio onde nenhum no e uma proporção relativamente pequena de diglicérides permaneça. Para tal, deve-se empregar um dos melhores catalisadores, os ácidos graxos devem estar presentes em excesso de 5 a 20% e a reação deve ser realizada por 3 a 6 horas à temperatura de $180\text{--}230^{\circ}\text{C}$, sob pressão reduzida ou na presença de gás inerte.

Investigações sobre a esterificação do glicerol com misturas de ácidos graxos tem sido menos numerosas do que aquelas que empregam um ácido específico³⁰.

BHATTACHARYA e HILDITCH³ prepararam triglicérides a quecendo misturas de ácidos graxos (saturados e insaturados, em várias proporções) com 80 a 90% da quantidade teórica de glicerol puro e 0,5% de ácido β -naftalenossulfônico a $135\text{--}145^{\circ}\text{C}$ por 5 a 6 horas sob vácuo de cerca de 1 mmHg. Nestas condições, descobriu-se que a maior parte do glicerol combinado se encontrava na forma de triglicérides. Em alguns casos, as proporções encontradas nos

glicerídeos não eram as mesmas das misturas originais de ácidos graxos, mostrando diferentes velocidades de esterificação. A distribuição dos ácidos graxos entre as moléculas de glicerol parece ser indiscriminada, conforme se verifica pela formação de glicerídeos totalmente saturados.

FEUGE et al.¹⁸ investigaram a esterificação do glicerol e ácidos graxos do amendoim sob pressão reduzida, em diversas temperaturas, tanto na ausência quanto na presença de vários cloretos e óxidos metálicos como catalisadores. A reação não catalisada comportou-se como de segunda ordem, mas se processou em dois estágios sucessivos, com o último apresentando menor valor para a constante de velocidade. Dos diversos compostos testados, os cloretos de zinco e estanho apresentaram melhor atividade catalítica. A reação, quando catalisada por estes materiais, é complexa e não mais bimolecular.

O emprego de fluoretos como catalisadores da reação de esterificação entre glicerol e ácidos graxos foi verificado por WOCASEK e KOCH⁴⁹. Os melhores resultados foram obtidos com os fluoretos de zinco e cobalto. Nas reações não catalisadas, utilizadas como controle, a esterificação dos ácidos esteárico, oléico e linoléico ocorreu aproximadamente à mesma velocidade, embora tenha aumentado um pouco à medida que aumentava o grau de insaturação do ácido graxo.

HARTMAN²¹ estudou as velocidades de esterificação de oito ácidos graxos, a 180°C, usando quantidades equivalentes e equimolares de glicerol com e sem co-solvente. A esterificação com quantidade equivalente de glicerol sem co-solvente seguiu cinética de segunda ordem e se processou à velocidade similar para todos os ácidos examinados. As esterificações com quantidade equimolar de glicerol foram cineticamente complexas e suas velocidades dependiam da solubilidade do glicerol em cada ácido graxo particular.

Entretanto, BISWAS e GANGULY⁴ verificaram que a esterificação de vários ácidos graxos com quantidades equimolares de glicerol, a 180°C, catalisada por carbonato de potássio, ocorria

a velocidades consideravelmente diferentes. Os autores atribuíram essas variações às diferentes miscibilidades dos ácidos graxos individuais com o glicerol.

FEUGE e BAILEY¹⁷ investigaram a composição de misturas de mono, di e triglicérides formados pela reação de óleo de algodão hidrogenado com glicerol na presença de catalisador alcalino. A temperaturas abaixo de 200°C, ao atingir o equilíbrio, e dentro da faixa de concentração de glicerol em que o produto de reação se torna homogêneo, as proporções de glicerol livre e de mono, di e triglicérides seguiram aproximadamente um padrão de distribuição ao acaso, com respeito aos grupos hidroxila esterificados do glicerol.

As constantes de velocidade correspondentes às reações de esterificação do ácido oléico com quantidades equivalentes de diversos álcoois, de mono a poliídricos, a 180°C e catalisadas pelo acetato de zinco, foram determinadas por DUNLAP e HECKLES¹⁴. Dentre os vários álcoois utilizados, a reação com glicerol apresentou o menor valor para a constante de velocidade.

CHOUDHURY⁷ estudou a esterificação direta de vários ácidos graxos saturados e insaturados usando concentração de glicerol acima da teórica, a 180°C e tanto na presença quanto na ausência de catalisador. Os resultados mostraram que o teor máximo de monoglicéride obtido está na faixa de 50 a 60% do produto formado, ao se atingir o estado de equilíbrio da reação.

1.3. TÉCNICAS EMPREGADAS

Diversas técnicas de avaliação quantitativa vêm sendo empregadas na determinação dos produtos da esterificação entre glicerol e ácidos graxos.

Os métodos químicos mais usados são o índice de acidez^{4,7,14,18,21,49}, índice de iodo^{3,49}, índice de saponificação³,

índice de éster⁴⁹, determinação de monoglicérides e glicerol livre por oxidação pelo ácido periódico^{4,7,17,20,37}, teor de glicerol livre e combinado¹⁷ e índice de hidroxila^{7,14}.

Entretanto, esses métodos exigem grande quantidade de amostra. Ademais, alguns são muito trabalhosos e demorados, como, por exemplo, a determinação de monoglicérides e glicerol livre por oxidação pelo ácido periódico, além de evidentemente degradarem o produto em análise.

Técnicas cromatográficas de separação e quantificação apresentam grande aplicação no campo dos lípides.

QUINLIN e WEISER⁴⁰ propuseram uma técnica em que concentrados de monoglicérides eram quantitativamente separados nos componentes mono, di e triglicéride em colunas de sílica-gel por adsorção cromatográfica. Os glicérides separados eram determinados gravimetricamente, após evaporação do solvente. Contudo, cerca de oito horas eram necessárias para análise completa.

RAVIN et al.⁴¹ desenvolveram um procedimento para a separação de misturas de mono, di e triestearina contendo óleo mineral por eluição cromatográfica em coluna de sílica-gel, com a subsequente determinação dos componentes separados por métodos gravimétricos ou análises de saponificação.

Um método semelhante, para a determinação de misturas de ésteres de glicerol, etilenoglicol e polietilenoglicol, foi apresentado por PAPARIELLO et al.³⁶. O adsorvente usado era sílica-gel e, a fase móvel, uma série de solventes com polaridade crescente. As frações separadas eram determinadas por pesagem, após evaporação do eluente.

COLEMAN¹¹ hidrolisou amostras de banha e manteiga com lipase pancreática em vários tempos e os produtos foram separados por cromatografia em coluna e avaliados por via ponderal. A fração monoglicéride era posteriormente analisada por cromatografia de fase gasosa.

A cromatografia em camada delgada é da maior utilidade na análise de substâncias lipídicas^{28,29,38}.

As vantagens mais significativas deste método sobre as demais técnicas existentes de determinação de lípides são, segundo MANGOLD²⁹, a simplicidade, velocidade, eficiência, sensibilidade e capacidade.

PRIVETT et al.³⁹ descreveram análises de misturas de mono, di e triglicérides por destilação molecular e cromatografia em camada delgada. A determinação por esta última é rápida e simples, podendo ser efetuada em micro-escala com alto grau de exatidão e precisão, além de ser extremamente sensível. A avaliação é por densitometria: cada mancha na placa cromatográfica, após carbonização, dá um pico de densidade óptica cuja área é usada para a análise quantitativa.

RYBICKA⁴² usou a cromatografia em camada delgada com ácido silícico como adsorvente para seguir a reação de alcoólise do óleo de linhaça com glicerol, que foi realizada a 235°C. Amostras da mistura de reação eram retiradas a cada 5 ou 10 minutos, resfriadas, diluídas com acetona e analisadas por cromatografia. Após carbonização das manchas, os produtos da reação eram quantificados por densitometria em negativo fotográfico da placa.

BLANK et al.⁵ desenvolveram um procedimento para a análise quantitativa de lípides por cromatografia em camada delgada empregando densitometria. A precisão do método foi demonstrada em misturas modelo de mono, di e tripalmitina.

Um método para a análise de monoglicérides isômeros por cromatografia em camada delgada foi proposto por THOMAS et al.⁴⁷. A separação se dá em sílica-gel impregnada com ácido bórico, uma vez que os α e β -monoglicérides não podem ser separados apenas em sílica-gel. Os resultados são obtidos por densitometria.

SARACCO e GAY⁴³ descreveram um método para análises de rotina de misturas de mono, di e triglicérides, ácidos graxos e glicerol, baseado na separação por cromatografia em camada delgada seguida de carbonização e leitura direta na placa com um densitômetro. As amostras eram produtos da esterificação entre glicerol e ácido oléico, realizada em escala semi-industrial.

Uma combinação das técnicas cromatográficas em coluna e em camada delgada foi usada por VIOLANTE et al.⁴⁸ para avaliar a composição dos triglicérides, glicerídeos parciais e ácidos graxos livres da gordura da semente de Citrus aurantium L. durante o processo de maturação. Uma separação preliminar foi realizada em coluna cromatográfica e a quantificação dos mono, 1,2 e 1,3-di e triglicérides foi efetuada em camada delgada, por densitometria.

O processo de densitometria apresenta, entretanto, o inconveniente de degradar a amostra, não permitindo o uso de técnicas complementares de identificação, como a cromatografia em fase gasosa. Isto pode ser conseguido, todavia, com o emprego de indicadores não destrutivos, como a fluoresceína, 2,7-diclorofluoresceína e rodamina^{15,28}.

DUNPHY et al.¹⁵ provaram que a fluoresceína e a dicloro fluoresceína são de grande utilidade na detecção de lípides em camada delgada, mesmo com os que correm muito próximos, e permitem sua recuperação inalterados. Usando éter como solvente, retira-se da sílica uma quantidade desprezível do reagente fluorescente e isto não interfere com os espectros IV ou UV.

A avaliação quantitativa empregando gravimetria aliada à técnica de cromatografia em camada delgada foi utilizada por CATALANO⁶ na verificação do teor de ácidos graxos, mono, di e triglicérides em óleos de oliva brutos e refinados. As diversas frações eram extraídas da sílica empregando clorofórmio e determinadas por via ponderal após a evaporação do solvente.

II - OBJETIVOS

Apesar da extensa bibliografia concernente às reações de esterificação, pouco se tem encontrado a respeito da cinética do processo, no caso específico da reação entre glicerol e ácidos graxos, visando à obtenção de triglicérides.

As pesquisas até agora realizadas indicam que a reação entre glicerol e ácidos graxos se processa ao acaso e que segue cinética de segunda ordem quando os reagentes se encontram em proporções equivalentes, enquanto que a utilização de catalisadores ou de quantidades equimolares a tornam cineticamente complexa.

Contudo, há discordância com relação ao fato dos diversos ácidos graxos apresentarem ou não velocidades similares de esterificação.

Quanto às técnicas aplicadas no estudo dos produtos da reação entre glicerol e ácidos graxos, tem-se dado maior preferência ao processo de quantificação empregando a densitometria, ao passo que pouco tem sido utilizado o método de gravimetria acoplado à cromatografia em camada delgada.

Desta forma, os trabalhos desenvolvidos na presente pesquisa têm por finalidades:

- estudar o processo de esterificação entre glicerol e ácidos graxos através de acompanhamento cromatográfico da reação, utilizando técnicas em camada delgada e em fase gasosa;

- verificar se os diferentes ácidos graxos apresentam velocidades similares de esterificação nas diversas fases da reação;

- verificar se a reação se processa ao acaso, ou seja, se há distribuição estatística dos ácidos graxos com respeito às posições reativas do glicerol;

- verificar a aplicabilidade da técnica de avaliação quantitativa por gravimetria aliada à cromatografia em camada delgada, no estudo dos produtos da reação, seguida pela análise gás-cromatográfica;

- aplicar os dados obtidos à reação de modificação de triglicérides por transesterificação em escala de laboratório e, em seguida, passar para escala piloto.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. REAGENTES, SOLVENTES, PADRÕES

- ácido palmítico (Carlo Erba)
- glicerol p.a. (Reagen)
- eter etílico p.a. (Reagen)
- sílica-gel G (Merck)
- hexano p.a. (Carlo Erba)
- ácido fórmico p.a. (Merck)
- ácido sulfúrico p.a. (Merck)
- cloreto de amônio p.a. (Merck)
- álcool metílico p.a. (Carlo Erba)
- hidróxido de potássio p.a. (Carlo Erba)
- éter de petróleo 30-65°C p.a. (Reagen)
- padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Carlo Erba)
- lipase pancreática de porco, bruta (Sigma)
- sebo de ucuuba
- óleo de soja
- solução de NaOH 0,1 N
- solução de 2,7-diclorofluoresceína 0,05%
- solução saturada de NaCl
- solução alcoólica de fenolftaleína 1%
- tampão tris-hidroximetilaminometano 1 M, pH 8
- solução de colato de sódio 0,1%
- solução de cloreto de cálcio 22%
- solução de HCl 6 N
- solução de éter etílico - álcool etílico (2+1) neutra

3.1.2. EQUIPAMENTOS

- vidraria e materiais comuns de laboratório
- agitador magnético com aquecimento
- manta elétrica

- segue -

- centrífuga
- conjunto para cromatografia em camada delgada (Prodicil)
- chapa elétrica
- cromatógrafo de gás CG, modelo 37-D, equipado com detetor de ionização de chama e programador linear de temperatura

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez das amostras é determinado por via titulométrica, utilizando solução de hidróxido de sódio 0,1 N²⁴.

3.2.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS FRAÇÕES

Cada amostra é avaliada quantitativamente com relação às suas frações componentes (mono, di e triglicéride, além de ácido graxo).

A separação das frações é conseguida por cromatografia em camada delgada preparativa utilizando-se placas de sílica-gel G, 20x20 cm, de espessura 0,5 mm e como eluente uma mistura de hexano, éter etílico e ácido fórmico (70 : 30 : 1,2) v/v. Após revelação com 2,7-diclorofluoresceína e visualização sob luz UV, as frações são raspadas e recolhidas separadamente.

A extração de cada uma das frações é realizada por lavagens com éter etílico (5 a 10 ml, 12 a 15 vezes) e o filtrado recolhido em béqueres tarados de 50 ml. Evaporando-se o solvente sob corrente de CO₂ e pesando-se os béqueres obtém-se a massa de cada fração.

3.2.3. ESTERIFICAÇÃO

Cada amostra e suas respectivas frações são esterificadas²² de modo a se obter os ésteres metílicos de seus ácidos graxos componentes, visando a análise gás-cromatográfica.

O método, originalmente proposto para amostras de 200-500 mg, é adaptado para quantidades de até 5-10 mg, reduzindo-se os volumes empregados.

3.2.4. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

- Análise de ácidos graxos:

Coluna: em aço inoxidável, de comprimento 2,2 m e diâmetro 1/8 pol

Suporte: Chromosorb W, 80-100 mesh, ativado com ácido clorídrico

Fase estacionária: DEGS (succinato de dietilenglicólico) a 17%

Fluxo de nitrogênio: 30 ml/min

Fluxo de hidrogênio: 30 ml/min

Fluxo de ar sintético: 210 ml/min

Temperatura do detetor: 280°C

Temperatura do vaporizador: 280°C

Temperatura da coluna: 192°C

Velocidade do papel: 0,25 pol/min

A composição em ácidos graxos é determinada por comparação das distâncias de retenção dos picos com as dos respectivos padrões.

A composição quantitativa é determinada por triangulação, multiplicando a altura do pico por sua largura na base, relacionando a área de cada pico com a área total e expressando em porcentagem.

- Análise de triglicérides:

Coluna: em aço inoxidável, de comprimento 60 cm e diâmetro 3 mm

Suporte: Gascrom Q, 100-120 mesh

Fase estacionária: JXR (polímero de metil-siloxano) a 3%

Fluxo de nitrogênio: 120 ml/min

Fluxo de hidrogênio: 120 ml/min

Fluxo de ar sintético: 840 ml/min

Temperatura do detetor: 340°C

Temperatura do vaporizador: 330°C

- segue-

Temperatura da coluna: programada, de 246 a 330°C, com variação de 2,0°C/min

Velocidade do papel: 0,25 pol/min

A composição em triglicérides é determinada por comparação das distâncias de retenção dos picos com os componentes do sebo de ucuuba^{2,13}, utilizado como padrão.

A separação dos triglicérides é baseada no número de átomos de carbono de cada molécula, não importando o grau de insaturação dos ácidos graxos componentes.

A composição quantitativa é determinada por triangulação, usando o processo para picos pouco separados⁸, relacionando a área de cada pico com a área total e expressando em porcentagem.

3.2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática de triglicérides, visando à obtenção dos β -monoglicérides, é realizada por incubação a 40°C com lipase pancreática de porco¹².

Como modificações do método, os triglicérides são separados através de cromatografia em camada delgada preparativa e o tempo de hidrólise é aumentado para 15 minutos.

IV - PARTE EXPERIMENTAL

4.1. ESTERIFICAÇÃO

As reações foram realizadas em balão de 250 ml de três bocas, sob pressão reduzida (20-30 mm Hg) proporcionada por tromba d'água, em duas temperaturas diferentes, sob agitação magnética, com quantidades equivalentes de ácido palmítico e glicerol.

Em intervalos regulares eram retiradas amostras para o acompanhamento da reação, admitindo-se momentaneamente a entrada de ar no sistema.

Como método alternativo de esterificação foi experimentado o processo em atmosfera de CO_2 , através de seu borbulhamento na mistura de reação, que ao mesmo tempo proporcionava a agitação desejada⁴⁶. Entretanto, devido ao excessivo escurecimento das amostras, este método foi abandonado.

Os reagentes foram utilizados na proporção de 1 mol de glicerol para 3 moles de ácido palmítico, o que em massa corresponde a 6,0 g de glicerol para 50,0 g de ácido palmítico.

O ácido palmítico, já analisado, era fundido à temperatura de 65-70°C e, a seguir, adicionava-se, sob agitação, o glicerol, após o que aquecia-se a mistura até à temperatura de processo.

Na reação I, realizada a 160°C, foram retiradas amostras decorridas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas, enquanto que na reação II, efetuada a 185°C, foram retiradas amostras após 1/2, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas.

O tempo foi contado a partir do instante em que a mistura atingiu a temperatura de processo, em ambos os casos.

As amostras das reações, uma vez obtidas, foram conservadas em dessecador a vácuo, até a etapa de extração. Esta foi efetuada dissolvendo-se cada amostra, a quente, em 50-60 ml de éter etílico.

co, adicionando-se 50 ml de solução saturada de NaCl e extraíndo-se em funil de separação de 250 ml. Seguiam-se duas lavagens com 50 ml de água destilada e evaporação do solvente sob corrente de CO_2 .

Uma vez extraídas, as amostras eram conservadas em frascos fechados em atmosfera inerte para retardar a rancificação.

4.2. ÍNDICE DE ACIDEZ

Reação a 160°C : determinado após a extração das amostras com solvente orgânico.

Reação a 185°C : determinado tanto das amostras brutas como das obtidas por extração.

4.3. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS FRAÇÕES

Para a análise de cada amostra eram necessárias quatro placas preparativas, de modo a se transferirem 240-320 mg no total (60-80 mg/placa). Essa quantidade era suficiente para que, uma vez separadas as frações, essas pudessem ser esterificadas e resultassem em cromatogramas limpos, de picos bem definidos, a não ser que o teor da fração fosse excessivamente baixo.

4.4. TÉCNICAS COMPLEMENTARES

A fração triglicéride das amostras retiradas após 6 horas de processo, em ambas as reações efetuadas, foi também analisada através dos métodos de hidrólise enzimática, para identificação dos β -monoglicérides, e de cromatografia em fase gasosa, para identificação dos triglicérides como tal.

V - RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DO ÁCIDO GRAXO

O ácido palmítico empregado apresentou índice de acidez médio, determinado por via titulométrica, igual a 101,69 g de ácido palmítico por 100 g da amostra e a composição em ácidos graxos indicada na tabela I.

Com base na composição apresentada na tabela I, calcula-se um peso molecular médio de 255,5, ligeiramente inferior ao peso molecular teórico do ácido palmítico, que é de 256,4.

5.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As amostras, analisadas por cromatografia em camada delgada, apresentaram cinco bandas, correspondentes às seguintes frações, na ordem em que são eluídas:

monoglicéride	Rf = 0,08
1,2-diglicéride	Rf = 0,31
1,3-diglicéride	Rf = 0,36
ácido graxo	Rf = 0,62
triglicéride	Rf = 0,82

A identificação das bandas referentes ao ácido graxo e triglicéride foi conseguida por comparação com os Rf do ácido palmítico e óleo de soja, respectivamente, e, as demais, por dados e técnicas constantes da literatura^{1,39,47}.

Entretanto, como a distinção entre as bandas correspondentes ao 1,2 e 1,3-diglicéride não era muito nítida, optou-se por considerá-las como banda única, chamada genericamente de diglicéride. Cumpre observar que a banda superior, correspondente ao 1,3-diglicéride, é mais larga que a inferior, que representa o 1,2-diglicéride.

TABELA I

Percentual em ácidos graxos componentes do ácido palmítico utilizado, determinado por cromatografia em fase gasosa (GLC)

Ácido graxo	Percentual
C ₁₄ - mirístico	5,1
C ₁₄ - miristoléico	1,3
C ₁₅ - pentadecanóico	4,7
C ₁₅ - pentadecenóico	0,5
C ₁₆ - palmítico	80,8
C ₁₆ - palmitoléico	tr
C ₁₇ - heptadecanóico	0,9
C ₁₈ - esteárico	6,7

5.3. REAÇÃO I

Os resultados obtidos referentes à reação processada à temperatura de 160°C encontram-se nas tabelas de II a VII.

Os resultados das análises gravimétricas e do índice de acidez são também mostrados em gráfico, na figura I.

Os valores correspondentes ao índice de acidez e à análise quantitativa dos ácidos graxos representam a média de duas determinações.

Como porcentagem de recuperação é considerada a relação entre a somatória das massas obtidas das quatro frações analisadas e a massa de amostra transferida nas quatro placas preparativas.

A massa de cada fração é relacionada com a massa efetivamente recuperada em termos de porcentagem.

O peso molecular empregado nos cálculos do índice de acidez é o do ácido palmítico, igual a 256,4.

Com relação à figura I, como glicerol combinado considera-se a somatória das porcentagens em massa das frações mono, di e triglicéride.

5.4. REAÇÃO II

Os resultados obtidos referentes à reação processada à temperatura de 185°C encontram-se nas tabelas de VIII a XIV.

Os resultados das análises gravimétricas e do índice de acidez das amostras obtidas por extração são também mostrados em gráfico, na figura II.

Os valores correspondentes à análise quantitativa dos ácidos graxos representam a média de duas determinações.

As considerações já feitas com relação à porcentagem de recuperação, porcentagem em massa de cada fração e glicerol combinado continuam válidas.

5.5. TÉCNICAS COMPLEMENTARES

Os resultados das análises por hidrólise enzimática, para identificação dos β -monoglicérides, e de cromatografia em fase gasosa dos triglicérides encontram-se nas tabelas XV e XVI.

TABELA II

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 1 hora

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride *	Amostra total
Porcentagem em massa		67,18	8,82	18,00	6,00	
Porcentagem de recuperação						102,51
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					64,58
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	10,9	3,0	4,6	-	4,6
	C ₁₄ ⁻	1,1	1,4	1,5	-	1,6
	C ₁₅	3,8	2,5	3,3	-	3,6
	C ₁₅ ⁻	0,6	1,7	0,8	-	0,7
	C ₁₆	76,9	87,2	84,2	-	83,0
	C ₁₆ ⁻	tr	tr	tr	-	tr
	C ₁₇	0,8	-	0,9	-	0,8
	C ₁₈	5,9	4,2	4,7	-	5,7

* Não foi possível determinar a composição em ácidos graxos

TABELA III

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 2 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total*
Porcentagem em massa		54,92	3,25	22,93	18,90	
Porcentagem de recuperação						-
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					48,82
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,3	12,6	4,6	6,4	4,7
	C ₁₄ ⁻	1,1	tr	1,2	1,7	1,1
	C ₁₅	4,1	2,4	3,5	3,4	3,9
	C ₁₅ ⁻	0,5	0,9	0,4	0,7	0,5
	C ₁₆	82,4	79,7	84,1	82,7	83,2
	C ₁₆ ⁻	tr	tr	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,8	tr	0,7	tr	0,9
	C ₁₈	5,8	4,4	5,5	5,1	5,7

* Não foi possível determinar a porcentagem de recuperação

TABELA IV

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 3 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		43,25	1,81	17,95	36,99	
Porcentagem de recuperação						91,27
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					39,43
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,1	3,8	5,2	5,5	4,6
	C ₁₄ ⁻	0,8	2,4	0,9	0,9	0,8
	C ₁₅	3,8	2,9	4,1	3,3	3,7
	C ₁₅ ⁻	0,4	tr	0,2	0,4	0,3
	C ₁₆	82,8	84,0	82,0	84,7	84,0
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	-
	C ₁₇	0,8	tr	0,9	0,7	0,7
	C ₁₈	6,3	6,9	6,7	4,5	5,9

TABELA V

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 4 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride *	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		36,83	1,12	13,91	48,14	
Porcentagem de recuperação						84,92
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					34,17
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,8	-	4,4	5,6	4,5
	C ₁₄ ⁻	0,9	-	0,8	1,1	1,0
	C ₁₅	4,1	-	3,4	3,6	3,7
	C ₁₅ ⁻	0,2	-	0,2	0,4	0,3
	C ₁₆	81,5	-	85,1	84,0	84,4
	C ₁₆ ⁻	tr	-	-	-	tr
	C ₁₇	0,8	-	0,6	0,8	0,7
	C ₁₈	6,7	-	5,5	4,5	5,4

* Não foi possível determinar a composição em ácidos graxos

TABELA VI

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 5 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride *	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		36,20	-	11,37	52,43	
Porcentagem de recuperação						84,88
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					31,32
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	4,7	-	4,5	5,5	4,7
	C ₁₄ ⁻	0,9	-	0,8	1,2	0,9
	C ₁₅	4,0	-	3,3	4,1	3,8
	C ₁₅ ⁻	0,3	-	0,3	0,3	0,3
	C ₁₆	83,2	-	85,0	81,4	83,5
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,8	-	0,7	0,9	0,7
	C ₁₈	6,1	-	5,4	6,6	6,1

* Não houve visualização da banda correspondente sob luz UV

TABELA VII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Resultados da amostra retirada após 6 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride *	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		33,47	-	11,46	55,07	
Porcentagem de recuperação						94,64
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					
	amostra extraída					29,01
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	4,9	-	4,7	5,6	4,7
	C ₁₄ ⁻	0,8	-	0,8	1,1	0,9
	C ₁₅	3,5	-	3,4	3,9	3,8
	C ₁₅ ⁻	0,4	-	0,6	0,4	0,3
	C ₁₆	84,2	-	85,3	83,2	83,5
	C ₁₆ ⁻	-	-	-	tr	tr
	C ₁₇	0,7	-	tr	0,8	0,7
	C ₁₈	5,5	-	5,2	5,0	6,1

* Não houve visualização da banda correspondente sob luz UV

FIGURA I

Variações de concentração dos componentes durante a reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

TABELA VIII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 1/2 hora

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		54,54	16,84	22,87	5,75	
Porcentagem de recuperação						96,51
índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					52,58
	amostra extraída					54,17
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,2	4,6	4,9	6,2	4,6
	C ₁₄ ⁻	1,1	1,0	1,0	0,7	0,9
	C ₁₅	3,8	3,6	3,8	2,8	3,5
	C ₁₅ ⁻	0,5	0,4	0,4	0,5	0,2
	C ₁₆	82,6	84,1	83,1	84,1	84,1
	C ₁₆ ⁻	tr	tr	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,8	0,8	0,9	0,7	0,9
	C ₁₈	6,0	5,5	5,9	5,0	5,8

TABELA IX

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 1 hora

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		43,09	14,13	31,18	11,60	
Porcentagem de recuperação						91,34
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					42,12
	amostra extraída					42,37
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,6	4,8	5,2	5,0	5,6
	C ₁₄ ⁻	1,1	1,2	1,1	1,0	1,0
	C ₁₅	4,3	3,2	3,8	3,3	4,3
	C ₁₅ ⁻	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3
	C ₁₆	80,9	83,9	82,5	83,7	81,6
	C ₁₆ ⁻	tr	tr	tr	-	tr
	C ₁₇	0,9	0,6	0,8	0,7	0,9
	C ₁₈	6,9	5,8	6,3	5,9	6,3

TABELA X

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 2 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		31,07	7,79	36,48	24,66	
Porcentagem de recuperação						93,89
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					29,58
	amostra extraída					29,79
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	4,4	4,0	5,0	5,0	5,7
	C ₁₄ ⁻	0,7	0,7	0,9	1,0	1,1
	C ₁₅	3,3	2,6	4,0	3,5	4,4
	C ₁₅ ⁻	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2
	C ₁₆	83,7	80,6	83,0	83,5	81,1
	C ₁₆ ⁻	tr	tr	tr	tr	tr
	C ₁₇	1,0	1,3	0,8	0,9	0,9
	C ₁₈	6,5	10,4	6,0	5,7	6,6

TABELA XI

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 3 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		26,61	5,37	37,56	30,47	
Porcentagem de recuperação						89,19
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					23,44
	amostra extraída					23,69
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,1	4,5	5,4	6,5	4,5
	C ₁₄ ⁻	1,0	1,1	1,1	1,4	1,0
	C ₁₅	3,6	3,0	3,9	4,2	3,8
	C ₁₅ ⁻	0,5	tr	0,5	0,4	0,4
	C ₁₆	83,4	86,2	81,9	80,7	83,6
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,7	tr	0,9	0,8	0,8
	C ₁₈	5,7	5,2	6,3	6,0	5,9

TABELA XII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 4 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		23,19	4,54	34,47	37,80	
Porcentagem de recuperação						86,66
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					19,43
	amostra extraída					19,61
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	4,8	3,3	5,0	6,1	5,6
	C ₁₄ ⁻	0,9	tr	1,0	1,1	1,1
	C ₁₅	3,2	2,6	3,5	4,0	4,2
	C ₁₅ ⁻	0,6	tr	0,4	0,4	0,2
	C ₁₆	83,8	88,7	83,3	81,7	81,1
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,7	tr	0,8	0,7	0,9
	C ₁₈	6,0	5,4	6,0	6,0	6,9

TABELA XIII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C.

- Resultados da amostra retirada após 5 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		22,71	3,17	32,81	41,31	
Porcentagem de recuperação						84,38
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					16,35
	amostra extraída					16,50
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,1	3,6	4,9	6,6	5,8
	C ₁₄ ⁻	0,9	tr	1,0	1,4	1,2
	C ₁₅	3,7	3,1	3,8	4,2	4,7
	C ₁₅ ⁻	0,4	tr	0,4	0,7	0,3
	C ₁₆	82,6	87,7	82,3	79,7	79,8
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	tr
	C ₁₇	1,3	tr	1,8	0,8	1,0
	C ₁₈	6,0	5,6	5,8	6,6	7,2

TABELA XIV

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Resultados da amostra retirada após 6 horas

		Fração ácido graxo	Fração mono- glicéride*	Fração di- glicéride	Fração tri- glicéride	Amostra total
Porcentagem em massa		18,11	2,67	29,89	49,33	
Porcentagem de recuperação						86,18
Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	amostra bruta					14,43
	amostra extraída					14,47
Percentual em ácidos graxos (GLC)	C ₁₄	5,0	-	5,2	5,9	5,6
	C ₁₄ ⁻	0,8	-	1,1	1,1	1,1
	C ₁₅	3,2	-	3,7	3,6	4,3
	C ₁₅ ⁻	0,7	-	0,3	0,4	0,3
	C ₁₆	84,0	-	83,5	82,7	80,8
	C ₁₆ ⁻	tr	-	tr	tr	tr
	C ₁₇	0,8	-	0,8	0,7	0,9
	C ₁₈	5,5	-	5,4	5,6	7,0

* Não foi possível determinar a composição em ácidos graxos.

FIGURA II

Variações de concentração dos componentes durante a reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

Legenda

- fração monoglicéride
- fração diglicéride
- ▲ fração ácido graxo
- ▼ fração triglicéride
- glicerol combinado
- índice de acidez (amostra extraída)

TABELA XV

Percentual em ácidos graxos presentes na posição β da fração triglicéride das amostras retiradas após 6 horas de processo (GLC)

Ácido graxo	Reação I Percentual	Reação II Percentual
C ₁₄	4,1	4,3
C ₁₄ ⁻	0,9	0,9
C ₁₅	3,4	3,1
C ₁₅ ⁻	0,4	0,5
C ₁₆	84,8	85,3
C ₁₆ ⁻	-	tr
C ₁₇	1,0	0,7
C ₁₈	5,4	5,2

TABELA XVI

Percentual em triglicérides presentes na fração triglicéridica das amostras retiradas após 6 horas de processo (GLC)

Número de átomos de carbono*	Reação I Percentual	Reação II Percentual
C ₄₂	-	-
C ₄₄	tr	tr
C ₄₆	12,9	11,8
C ₄₈	75,2	76,7
C ₅₀	11,9	11,5
C ₅₂	tr	tr
C ₅₄	-	-

* Não foram considerados os átomos de carbono do glicerol

VI - DISCUSSÃO

6.1. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Com relação ao método em si, empregado nas análises gravimétricas, mostrou-se bem satisfatório, já que há boa concordância dos resultados obtidos pelo índice de acidez com a porcentagem em massa da fração ácido graxo, nas duas reações estudadas (tabelas de II a XIV).

Como pode ser observado, a análise gravimétrica sempre forneceu resultados maiores do que os obtidos por via titulométrica.

Inicialmente pensou-se que esta diferença pudesse ser devida ao peso molecular médio da amostra (ácido palmítico) empregado nos cálculos do índice de acidez. Entretanto, tal possibilidade mostrou-se errônea, uma vez que para cada amostra analisada o peso molecular a ser empregado deveria ser diferente, com tendência a aumentar à medida do progresso da reação.

A diferença entre os resultados obtidos poder ser explicada em virtude da menor solubilidade das frações mono, di e, principalmente, triglicéride em éter etílico. Como o tratamento a que foram submetidas as diversas porções de sílica-gel raspadas das placas era o mesmo, provavelmente a recuperação dos compostos menos solúveis era prejudicada, levando a superestimação do teor da fração ácido graxo, visto que os resultados são expressos em termos de porcentagem.

Nas amostras iniciais, como o teor de ácidos graxos livres é bem maior, há melhor concordância com o índice de acidez. À proporção que esse teor diminui, a discrepância entre as curvas aumenta, o que é verificado especialmente nos resultados da reação II (figura II).

Desse modo, o controle da eficiência deste método pode ser feito baseado em dois fatores: primeiro, o índice de acidez, já discutido; e segundo, a porcentagem de recuperação, que teve médias de 91,64 e 89,74, respectivamente, para as amostras das reações I e II.

Para que se tenha melhor porcentagem de recuperação, uma possibilidade é o emprego de solventes ou mistura de solventes mais adequados para cada fração^{36,40}, se bem que o éter etílico apresente a vantagem de possuir baixo ponto de ebulição, o que facilita em muito sua evaporação, etapa precedente à quantificação por gravimetria.

O método utilizado, além de usar pequena quantidade de amostra e pequeno volume de eluente, ainda tem a vantagem de permitir a análise gás-cromatográfica dos ácidos graxos de cada fração, uma vez que não degrada a amostra, inconveniente dos métodos químicos (que necessitam maior quantidade para a análise) e da densitometria. Uma separação das frações em coluna cromatográfica também seria viável, mas o volume de eluente gasto seria bem maior, assim como o tempo necessário.

6.2. ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA DOS ÁCIDOS GRAXOS

Quanto às análises gás-cromatográficas dos ácidos graxos pode ser observado, em ambas as reações estudadas (tabelas de II a XIV), que a porcentagem de cada ácido nas diversas frações é praticamente constante e que a flutuação verificada também ocorre na amostra total (que é composta pelas quatro frações), ou seja, provém do próprio método.

Isso mostra que os diferentes ácidos graxos apresentam velocidades similares de esterificação em todas as fases da reação.

Entretanto, a quase totalidade dos resultados das análises, tanto das amostras retiradas como das frações que as formavam, aponta composição em ácidos graxos diferente daquela da matéria-prima, o ácido palmítico. Como pode ser notado, o percentual em ácido palmítico é ligeiramente superior daquele da matéria-prima e, conseqüentemente, os teores dos demais ácidos presentes são um pouco inferiores.

Essa aparente anormalidade pode ser justificada caso seja considerado que, pelo efeito do aquecimento dos reagentes durante a esterificação, houve decomposição por igual de todos os ácidos presentes no sistema. Com isso, a porcentagem em ácido palmítico tende a ser aumentada, pelo fato de este se encontrar em maior proporção, enquanto que os teores dos demais ácidos graxos tendem a diminuir.

6.3. TÉCNICAS COMPLEMENTARES

As análises por hidrólise enzimática e de cromatografia em fase gasosa dos triglicérides tiveram por finalidade verificar se, nas reações efetuadas, é indiscriminada a distribuição dos ácidos graxos com relação aos grupos hidroxila do glicerol.

Desta forma, os resultados da composição em ácidos graxos dos β -monoglicérides formados pela ação da lipase pancreática sobre os triglicérides mostram que, em ambas as reações, a esterificação se processou ao acaso, uma vez que os teores encontrados dos diversos ácidos presentes na posição central do glicerol são próximos daqueles obtidos nas análises dos ácidos graxos componentes dos triglicérides estudados (tabelas VII e XIV).

A composição em termos de triglicérides de uma gordura re-esterificada pode ser derivada de considerações probabilísticas, considerando-se distribuição ao acaso dos ácidos graxos⁴⁵.

No presente estudo, levando-se em conta que as análises gás-cromatográficas dos triglicérides como tal são baseadas no número de átomos de carbono de cada molécula, não importando o grau de insaturação dos ácidos componentes, temos que, para fins de cálculo, cinco diferentes ácidos graxos estão distribuídos estatisticamente entre as três posições reativas do glicerol (C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} e C_{18}).

Isso implica em que são possíveis 35 diferentes combinações (combinação de 5 ácidos graxos, 3 a 3, com repetição), que correspondem a 13 picos prováveis na análise por cromatografia em fase gasosa dos triglicérides (de 42 a 54 átomos de carbono por molécula, não considerando os átomos de carbono do glicerol).

Assim sendo, as porcentagens calculadas⁴⁵ de cada pico provável são dadas a seguir, tomando como base o percentual em ácidos graxos da matéria-prima (ácido palmítico):

Número de átomos de carbono*	Percentual
C_{42}	0,0
C_{43}	0,1
C_{44}	1,0
C_{45}	1,6
C_{46}	13,3
C_{47}	10,6
C_{48}	55,1
C_{49}	3,5
C_{50}	13,3
C_{51}	0,4
C_{52}	1,1
C_{53}	0,0
C_{54}	0,0

* Não foram considerados os átomos de carbono do glicerol.

Evidentemente, o triglicéride predominante na mistura é aquele cuja molécula contém 48 átomos de carbono, visto que o ácido palmítico é o componente principal. Do total calculado para C_{48} (55,1%), a tripalmitina contribui com 52,8%, sendo os restantes 2,3% representados pelas demais combinações.

Os resultados obtidos nas análises por cromatografia em fase gasosa dos triglicérides (tabela XVI) mostram, contudo, teores de C_{48} superiores ao calculado. Considerando que os picos correspondentes aos triglicérides ímpares C_{47} e C_{49} não puderam ser observados nos cromatogramas, uma vez que a distinção entre os picos não é nítida, provavelmente estes foram absorvidos pelo do componente principal C_{48} . Dessa forma, nos cálculos por triangulação, a porcentagem em C_{48} deve ser representada pela composição de três picos vizinhos (C_{47} , C_{48} e C_{49}), que teoricamente compreendem 69,2% do total.

Portanto, os valores obtidos para o componente C_{48} mostram-se um pouco superiores ao esperado, levando-se em conta as presentes considerações.

6.4. CINÉTICA DA REAÇÃO

A reação entre glicerol e ácidos graxos, com quantidades equivalentes dos reagentes, é de segunda ordem, em dois estãgios¹⁸.

Nas reações bimoleculares, a representação gráfica do inverso da concentração residual de um reagente em função do tempo é dada por uma reta, sendo seu coeficiente angular igual à constante de velocidade (k) da reação, a uma determinada temperatura.

A equação correspondente a essa ordem é a seguinte:

$$k = \frac{1}{t} \frac{x}{a - x}$$

onde:

k = constante de velocidade

t = tempo

x = concentração do produto

a = concentração inicial

$a - x$ = concentração residual do reagente

Se o tempo (t) for expresso em horas e (a) e (x) em moles por 100 g da mistura, a constante de velocidade (k) terá as seguintes dimensões: $100 \text{ g. mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A concentração inicial de ácido graxo (a) é igual a 0,3482 moles/100 g, tomando como peso molecular o do ácido palmítico (256,4), que corresponde a um teor de ácidos graxos livres igual a 89,29 g/100 g (valores teóricos).

Desse modo, é possível calcular a constante de velocidade das reações efetuadas através do uso da fórmula citada ou pela inclinação da reta representativa em cada caso.

As tabelas XVII e XVIII e a figura III, complementares, exprimem os dados calculados da reação I.

As tabelas XIX, XX e XXI e as figuras IV e V, complementares, exprimem os dados calculados da reação II.

TABELA XVII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, determinada pelo índice de acidez das amostras obtidas por extração

Tempo (h)	Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	$1/a - x$ (mol ⁻¹ .100 g)
1	64,58	3,9703
2	48,82	5,2520
3	39,43	6,5027
4	34,17	7,5037
5	31,32	8,1865
6	29,01	8,8383

TABELA XVIII

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, determinada pela análise gravimétrica das amostras obtidas por extração*

Tempo (h)	Ácidos graxos livres Percentual	$1/a - x$ (mol ⁻¹ .100 g)
1	67,18	3,8166
2	53,0	4,8377
3	43,25	5,9283
4	36,83	6,9617
5	34,5	7,4319
6	33,47	7,6606

* Os pontos correspondentes a 2 e 5 horas foram corrigidos, tomando-se os valores da curva e não os obtidos experimentalmente.

FIGURA III

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 160°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo

TABELA XIX

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, determinada pelo índice de acidez das amostras obtidas por extração

Tempo (h)	Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	$1/a - x$ ($\text{mol}^{-1} \cdot 100 \text{ g}$)
1/2	54,17	4,7333
1	42,37	6,0515
2	29,79	8,6069
3	23,69	10,8231
4	19,61	13,0750
5	16,50	15,5394
6	14,47	17,7194

TABELA XX

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, determinada pela análise gravimétrica das amostras obtidas por extração*

Tempo (h)	Ácidos graxos livres Percentual	1/a - x (mol ⁻¹ .100 g)
1/2	54,54	4,7011
1	43,09	5,9503
2	31,07	8,2523
3	26,61	9,6355
4	23,19	11,0565
5	20,5	12,5073
6	19,0	13,4948

* Os pontos correspondentes a 5 e 6 horas foram corrigidos, tomando-se os valores da curva e não os obtidos experimentalmente

TABELA XXI

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, determinada pelo índice de acidez das amostras brutas

Tempo (h)	Índice de acidez (g ácido palmítico/100 g)	$1/a - x$ ($\text{mol}^{-1} \cdot 100 \text{ g}$)
1/2	52,58	4,8764
1	42,12	6,0874
2	29,58	8,6680
3	23,44	10,9386
4	19,43	13,1961
5	16,35	15,6820
6	14,43	17,7686

FIGURA IV

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo

FIGURA V

Reação de esterificação com quantidades equivalentes de glicerol e ácido palmítico a 185°C

- Inverso da concentração de ácidos graxos livres em função do tempo, segundo o índice de acidez das amostras brutas

Pelas figuras III, IV e V observa-se que a reação apresenta dois estágios, sendo o primeiro de maior velocidade (maior inclinação da reta).

Os valores obtidos para as constantes de velocidade dos dois estágios, expressos em $100 \text{ g. mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, através da inclinação das retas são os seguintes:

Reação I:

- segundo o índice de acidez (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 1,26$

2º estágio: $k = 0,68$

- segundo a análise gravimétrica (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 1,04$

2º estágio: $k = 0,36$

Reação II:

- segundo o índice de acidez (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 2,56$

2º estágio: $k = 2,26$

- segundo o índice de acidez (amostras brutas):

1º estágio: $k = 2,47$

2º estágio: $k = 2,30$

- segundo a análise gravimétrica (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 2,43$

2º estágio: $k = 1,30$

A intersecção das retas é considerada como ponto de mudança de um estágio para outro¹⁸.

Assim, na reação I, a passagem do primeiro para o segundo estágio ocorreu por volta de 3,5 horas, e, na reação II, por volta de 2 horas de processo.

Os valores obtidos para as médias das constantes de velocidade dos dois estágios, expressos em $100 \text{ g. mol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, através do uso da equação para reações de segunda ordem, são os seguintes:

Reação I:

- segundo o índice de acidez (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 1,17$

2º estágio: $k = 1,07$

- segundo a análise gravimétrica (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 0,99$

2º estágio: $k = 0,86$

Reação II:

- segundo o índice de acidez (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 3,26$

2º estágio: $k = 2,55$

- segundo o índice de acidez (amostras brutas):

1º estágio: $k = 3,38$

2º estágio: $k = 2,58$

- segundo a análise gravimétrica (amostras obtidas por extração):

1º estágio: $k = 3,14$

2º estágio: $k = 2,00$

Para a reação I, foram considerados do primeiro estágio os pontos correspondentes a 1, 2 e 3 horas e, do segundo estágio, os pontos correspondentes a 4, 5 e 6 horas de processo, com base na figura III.

Para a reação II, foram considerados do primeiro estágio os pontos correspondentes a 1/2, 1 e 2 horas e, do segundo estágio, os pontos correspondentes a 3, 4, 5 e 6 horas de processo, com base nas figuras IV e V.

Os presentes resultados mostram que os valores obtidos para as constantes de velocidade dos dois estágios, segundo a análise gravimétrica, são sempre inferiores aos obtidos segundo o índice de acidez. Isto já era esperado, visto que a análise gravimétrica das frações ácido graxo sempre forneceu valores superiores aos do índice de acidez das amostras.

Os valores obtidos para as constantes de velocidade dos dois estágios pela inclinação da reta e pelo emprego da equação apresentada mostram discrepância, na maior parte dos casos, provavelmente porque os resultados da constante pela aplicação da equação para reações de segunda ordem indicam tendência para mais ou para menos e não variação em torno da média, como seria esperado. Entretanto, o mesmo é observado em outros trabalhos experimentais^{18,49}.

No caso da reação II, verifica-se que os valores obtidos para as constantes de velocidade, segundo o índice de acidez das amostras brutas e daquelas obtidas por extração, tanto pelo método da inclinação da reta quanto pela aplicação da equação, estão em boa concordância. Isso vem confirmar que, para fins de determinação do valor da constante de velocidade, é desnecessária a fase de extração das amostras com solvente orgânico.

6.5. FORMAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS E DO PRODUTO FINAL

Pelas figuras I e II, que representam curvas características de reações consecutivas^{25,34}, verifica-se que a concentração dos intermediários, mono e diglicérides, cresce até um valor máximo e então cai assintoticamente a zero, enquanto que a do produto final, o triglicéride, aumenta gradualmente.

A fração ácido graxo é representada por duas curvas, uma obtida por titulometria (índice de acidez das amostras obtidas por extração) e outra por gravimetria, havendo boa concordância entre elas, sendo que o valor obtido pela análise gravimétrica foi sempre superior àquele do índice de acidez.

Na reação II também foi analisado o índice de acidez das amostras brutas, que revelou valores ligeiramente inferiores aos das amostras obtidas por extração, com tendência a se igularem com o progresso da reação. Isso porque, cada vez mais, a quantidade de glicerol livre diminui e, após 6 horas de processo, praticamente não há mais moléculas de glicerol totalmente não combinadas.

É importante notar que o teor máximo de monoglicérides é, nas duas reações, inferior ao de diglicérides e ocorre em tempo menor. Essa concentração máxima dos intermediários depende da temperatura, visto que, quanto maior a temperatura de reação, maior o seu valor.

Apesar de as bandas correspondentes aos 1,2 e 1,3-diglicérides terem sido quantificadas em conjunto, o fato de a banda superior, representativa do 1,3-diglicéride, ser mais larga que a inferior vem confirmar que a formação desse composto se dá em maior proporção.

Com relação à fração triglicéride, a curva respectiva apresenta aspecto sigmóide, especialmente verificado na figura I. No início da reação, sua velocidade de formação é baixa, uma vez que esta é a fase de formação em maior escala dos intermediários. Segue-se uma fase de velocidade mais alta, correspondendo praticamente ao teor máximo de diglicérides, ou início de sua queda, e uma terceira fase de velocidade menor, quando a concentração dos intermediários se encontra em franca diminuição. Tratando-se de curva sigmóide, apresenta ponto de inflexão, que, na figura I, ocorre por volta de 3 horas, e na figura II, por volta de 2 horas de processo.

O fato de a reação apresentar dois estágios pode ser explicado em função da formação dos intermediários e do produto final. No início da reação a velocidade de formação de triglicérides é baixa, mas os intermediários, mono e diglicérides, formam-se em grande quantidade (figuras I e II). Isso resulta em velocidade global maior, como pode ser verificado pelo consumo de ácidos graxos livres. Com o passar da reação, a concentração dos intermediários atinge um máximo e, em seguida, começa a cair, o que faz com que a

velocidade de formação de triglicérides, que havia sido maior, também principie a diminuir. Esse efeito combinado provoca velocidade de global menor, característica do segundo estágio.

É lógico supor que a passagem do primeiro para o segundo estágio não seja abrupta, mas sim gradual. Essa passagem, referida como sendo a intersecção das retas representativas dos dois estágios (figuras III, IV e V), apresenta, em cada reação estudada, boa concordância como o ponto de inflexão da curva correspondente ao triglicéride (figuras I e II), a partir do qual sua velocidade de formação diminui.

Cumprе observar que, na reação II, apesar de ter sido realizada a temperatura mais alta, o teor de triglicérides após 6 horas é um pouco inferior daquele obtido na reação I. Isso pode ser justificado pelo fato de a reação se processar em dois estágios. Na reação II, como ocorreu formação bem maior de mono e diglicérides no primeiro estágio, ao passar para o segundo, de velocidade de global menor, o sistema não tem a capacidade de consumir esses intermediários da mesma maneira, formando menos produto final e aumentando o teor de mono e diglicérides.

Além disso, na reação I, ao iniciar o segundo estágio, o teor de triglicérides era por volta de 40%, enquanto que na reação II, nesse ponto, seu teor era de apenas cerca de 25%, confirmando o que foi dito anteriormente.

Entretanto, com a continuação da reação a 185°C, o teor de triglicérides suplantará o da reação a 160°C, uma vez que a tendência da curva representativa da fração triglicéride na figura II é de subida, ao passo que na figura I a curva já se mostra assintótica.

As condições das reações efetuadas não permitiram a obtenção de teor alto em triglicérides, decorridas 6 horas de processo. A não observância de recomendações, como emprego de catalisador, excesso de ácidos graxos e mesmo temperaturas mais elevadas¹⁶, que possibilitam a formação de triglicérides em alto rendimento, te

ve por finalidade melhor acompanhamento da formação dos compostos intermediários e do produto final, bem como não interferir na cinética da reação, tornando-a mais complexa.

Curvas semelhantes às das figuras I e II foram obtidas por COLEMAN¹¹ ao estudar a hidrólise enzimática de amostras de banha e manteiga. Evidentemente, sendo a hidrólise o inverso da esterificação, os elementos representados em cada curva são outros. Assim, com o progresso da hidrólise, o teor de triglicérid^{es} cai e os teores de di e monoglicérid^{es} aumentam até um valor máximo e começam a diminuir, enquanto que a concentração de glic^{erol} livre aumenta.

VII - CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados e a discussão do presente trabalho, pode-se concluir que:

- A técnica de avaliação quantitativa por gravimetria aliada à cromatografia em camada delgada e seguida pela análise gás-cromatográfica mostrou-se bastante satisfatória no estudo dos produtos das reações efetuadas.

- O princípio das técnicas aplicadas pode ser empregado no estudo dos produtos da reação de transesterificação.

- Os diferentes ácidos graxos estudados apresentam velocidades dissimilares de esterificação em todas as fases de reação.

- A reação entre glicerol e ácidos graxos com quantidades equivalentes dos reagentes e na ausência de catalisador se processa ao acaso, seguindo padrão de distribuição estatística.

- O teor máximo dos compostos intermediários, mono e diglicérides, depende da temperatura do processo.

- O teor máximo de monoglicérides é inferior e ocorre após tempo menor de reação do que o teor máximo de diglicérides.

- O teor de triglicérides após 6 horas de reação a 185°C é inferior ao daquele obtido a 160°C , decorrido o mesmo tempo.

- O ponto de inflexão da curva representativa da fração triglicéride apresenta boa concordância com o início do segundo estágio da reação.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AVANCINI, D.; PEDRONI, G.; FRANCESCO, F. - Studio a tecniche cromatografiche concatenate sulla struttura dei gliceridi.
Riv. ital. Sost. grasse, Milano, 43:450-6, 1966.
2. BARUFFALDI, R. - Sebo de ucuuba: seu fracionamento e refinação. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1973. [Tese - livre docência]
3. BHATTACHARYA, R. & HILDITCH, T.P. - The structure of synthetic mixed triglycerides. Proc. roy. Soc. London, A 129: 468-76, 1930.
4. BISWAS, A.K. & GANGULY, D. - Esterification of fatty acids with glycerol. Nature, London, 188:56-7, 1960.
5. BLANK, M.L.; SCHMIT, J. A.; PRIVETT, O.S. - Quantitative analysis of lipids by thin-layer chromatography. J.Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 41:371-6, 1964.
6. CATALANO, M. - I gliceridi parziali degli oli di oliva grezzi e rettificati. Riv. Ital. Sost. grasse, Milano, 49:101-4, 1972.
7. CHOUDHURY, R.B.R. - The preparation and purification of monoglycerides. II. Direct esterification of fatty acids with glycerol. J.Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 39:345-7, 1962.
8. CIOLA, R. - Introdução à cromatografia em fase gasosa. São Paulo, Blucher, 1973. p.186-216.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com o WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3.ed., New York, 1961.

9. COENEN, J. W. E. - Modification of oils and fats. In: MORTON, I. & RHODES, D. N., ed. - The contribution of chemistry to food supplies. London, Butterworths, 1974. p.15-54.
10. COENEN, J. W. E. - Hydrogenation of edible oils. J.Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 53:382-9, 1976.
11. COLEMAN, M. H. - The pancreatic hydrolysis of natural fats. III. The influence on the extent of hydrolysis on monoglyceride composition. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 40:568-71, 1963.
12. COMMISSIONE TECNICA GOVERNATIVA (Italia) - Determinazione nei trigliceridi della percentuale di acidi grassi saturi in posizione 2 mediante lipasi pancreatica. In: Normi grassi e derivati. [s.l.p.], 1971. Ba IV:40.
13. CULP, T. W.; HARLOW, R. D.; LITCHFIELD, C.; REISER, R. - Analysis of triglycerides by consecutive chromatographic techniques. II. Ucuhuba kernel fat. J.Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 42:974-8, 1965.
14. DUNLAP, L.H. & HECKLES, J. S. - Catalyzed esterification of oleic acid. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 37:281-5, 1960.
15. DUNPHY, P. J.; WHITTLE, K. J.; PENNOCK, J. F. - On the use of fluorescein and dichlorofluorescein as non-destructive stains for lipids. Chem. and Ind., London, 27:1217-8, 1965.
16. FEUGE, R. O. - Derivatives of fats for use as foods. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 39:521-7, 1962.
17. FEUGE, R. O. & BAILEY, A. E. - Modification of vegetable oils. VI. The practical preparation of mono and diglycerides. Oil and Soap, Chicago, 23:259-64, 1946.

18. FEUGE, R. O.; KRAEMER, E. A.; BAILEY, A. E. - Modification of vegetable oils. IV. Reesterification of fatty acids with glycerol. Oil and Soap, Chicago, 22: 202-7, 1945.
19. FORMO, M. W. - Ester reactions of fatty materials. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 31:548-59, 1954.
20. HANDSCHUMAKER, E. & LINTERIS, L. - A modified method for the determination of monoglyceride in fats oils by oxidation with periodic acid. J.Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 24:143-5, 1947.
21. HARTMAN, L. - Esterification rates of some saturated and unsaturated fatty acids with glycerol. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 43:536-8, 1966.
22. HARTMAN, L. & LAGO, R. C. A. - Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Pract., London, 22:475-6; 494, 1973.
23. HUSTEDT, H. H. - Interesterification of edible oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 53:390-2, 1976.
24. INSTITUTO ADOLFO LUTZ - Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 2.ed. São Paulo, 1976. v.1, p.188-9
25. JUNGERS, J. C. - Cinétique chimique appliquée. Paris, Technip, 1958. p.165-96.
26. KREULEN, H.P. - Fractionation and winterization of edible fats and oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 53:393-6, 1976.
27. LANGSTRAAT, A. - Characteristics and composition of vegetable oil-bearing materials. J.Amer Oil Chem.Soc., Chicago, 53:241-7, 1976.

28. MALINS, D. C. - Recent developments in the thin-layer chromatography of lipids. In: HOLMAN, R.T., ed. -Progress in the chemistry of fats and other lipids. Oxford, Pergamon Press, 1966. v.VIII, pt.3, p.303-58.
29. MANGOLD, H. K. - Thin-layer chromatography of lipids. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 38:708-27, 1961.
30. MARKLEY, K. S. - Fatty acids: their chemistry, properties, production, and uses. 2.ed. New York, Interscience, 1961. pt.2, p.757-984.
31. MARKLEY, K. S. - Fatty acids: their chemistry, properties, production, and uses. 2.ed. New York, Interscience, 1968. pt.5, p.3469-560.
32. MARTINENGHI, G. B. - Tecnologia chimica industriale degli oli, grassi e derivati. 3.ed. Milano, Hoepli, 1963. p.767-86.
33. MATTIL, K. F. - Hydrogenation. In: SWERN, D., ed. - Bailey's industrial oil and fat products. 3.ed. New York, Interscience, 1964. p.793-896.
34. MOORE, W. J. - Físico-química. Rio de Janeiro, Livro Técnico; Editora da Universidade de S.Paulo, 1968. p. 311-3.
35. NORRIS, F. A. & MATTIL, K. F. - Interesterification reactions of triglycerides. Oil and Soap, Chicago, 23:289-91, 1946.
36. PAPARIELLO, G. J.; CHULKARATANA, S.; HIGUCHI, T.; MARTIN, J. E.; KUCESKI, V. P. - A general method for the chromatographic analysis of mono, di, and triglycerides and the mono and diesters of ethylene glycol and polyethylene glycol. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 37:396-9, 1960.

37. POHLE, W. D. & MEHLENBACHER, V. C. - A modification of the periodic acid method for the determination of monoglycerides and free glycerol in fats and oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 27:54-6, 1950.
38. PRIVETT, O. S.; BLANK, M.L.; CODDING, D.W.; NICKELL, E. C. - Lipid analysis by quantitative thin-layer chromatography J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 42:381-93, 1965.
39. PRIVETT, O. S.; BLANK, M. L.; LUNDBERG, W. O. - Determination of mono, di, and triglycerides by molecular distillation and thin-layer chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 38:312-6, 1961.
40. QUINLIN, P. & WEISER, H. J. - Separation and determination of mono, di, and triglycerides in monoglyceride concentrates. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 35:325-7, 1958.
41. RAVIN, L. J.; MEYER, R. J.; HIGUCHI, T. - Chromatographic analysis of mixtures of mono, di, and tries tearin containing mineral oil. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 34:261-3, 1957.
42. RYBICKA, S. M. - Use of thin-layer chromatography for following a glycerolysis reaction. Chem. and Ind., London, 45:1947-9, 1962.
43. SARACCO, G. B. & GAY, M. - Separazione di una miscela di gliceridi per TLC e determinazione quantitativa dei componenti per via densitometrica. Riv. ital. Sost. grasse, Milano, 48:319-23, 1971.
44. SREENIVASAN, B. - Interesterification of fats. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 55:796-805, 1978.

45. STIRTON, A. J. - Fat splitting, esterification, and interesterification. In: SWERN, D., ed. - Bailey's industrial oil and fat products. 3.ed. New York, Interscience, 1964. p.931-72.
46. SWICKLIK, L. J.; HOLLINGSWORTH, C. A.; DAUBERT, B.F. The kinetics of the hydrogenation of triglycerides. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 32:69-73, 1955.
47. THOMAS, A. E.; SCHAROUN, J. E.; RALSTON, H. - Quantitative estimation of isomeric monoglycerides by their thin-layer chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 42-789-92, 1965.
48. VIOLANTE, P.; VIOLANTE, A.; BASILE, G. - La struttura gliceridica della sostanza grassa dei semi di Citrus aurantium L. in momenti diversi del processo di maturazione. Riv. ital. Sost. grasse, Milano, 49:110-6, 1972.
49. WOCASEK, J. J. & KOCH, J. R. - Fluoride catalysis at 175°C of the reaction: glycerol plus fatty acids. J. Amer. Oil Chem. Soc., Chicago, 25:335-7, 1948.