UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada

Sara Anunciação Braga Guebara

Dissertação para a obtenção do título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof^a. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada

Sara Anunciação Braga Guebara

Versão Original

Dissertação para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof^a. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G924r	<p>Guebara, Sara Anunciação Braga</p> <p>Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada / Sara Anunciação Braga Guebara. -- São Paulo, 2016. 99p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Vitolo, Michele Co-orientador: Ract, Juliana Neves Rodrigues</p> <p>1. Enzimologia 2. Biotecnologia 3. Tecnologia da fermentação 4. Bioquímica industrial I. T. II. Vitolo, Michele, orientador. III. Ract, Juliana Neves Rodrigues, co-orientador.</p> <p>660.63e CDD</p>
-------	---

Sara Anunciação Braga Guebara

Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof Dr. Michele Vitolo

FCF/USP

Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Dedico este trabalho aos meus maiores amores,
Maria e William, com profundo carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita graça e amor. Sem Ele nada seria possível.

À minha família, especialmente minha mãe, Maria, por ter sido meu maior exemplo e por ter me criado com carinho, amor e dedicação.

Ao meu marido, William, que sempre me transmitiu paz, amor e me encheu de incentivo. Toda minha admiração por você.

Aos queridos orientadores Prof. Dr. Michele Vitolo e Profa. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract. Levarei seus ensinamentos por toda minha vida e me lembrarei com carinho de nossas conversas. Obrigada pela oportunidade que me concederam.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli pelos ensinamentos e disponibilidade para orientar este trabalho.

Às amigas de laboratório Clara e Thalita pelos bons momentos que vivenciamos juntas, pela alegria e pelo apoio.

Aos meus amigos de infância Paula, Luana e Kauê. A vida é doce ao lado de vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, Miriam, Alexandre, Ivani, Nilton, Tânia e Elza.

Às Professoras Dra. Heizir de Castro e Dra. Larissa de Freitas da Escola de Engenharia de Lorena por me terem recebido e contribuído com as análises.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“E eu irei por aí

Sabendo que se eu venho e vou

“Num só lugar estou

Guardado em Teu amor”

Laura Souguellis

RESUMO

GUEBARA, S.A.B. **Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada.** 2016. 99p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016

O glicerol é um dos resíduos mais abundantes na produção do biodiesel e sua disponibilidade está atrelada diretamente à intensidade de produção do biocombustível. Apesar da diversidade de aplicações industriais para o glicerol, a procura de novos usos é estimulada pela crescente disponibilidade e forte diminuição do seu custo. Desta forma, este trabalho procurou contribuir com uma nova alternativa para a aplicação do excesso deste poliálcool, propondo sua esterificação com o ácido caprílico – um antimicrobiano natural. A produção de monocaprilina, dicaprilina e tricaprilina a partir da esterificação do glicerol com ácidos graxos utilizando a lipase imobilizada Lipozyme RM IM *sn-1,3* específica teve seu rendimento otimizado por um planejamento experimental do tipo DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional. Assim, dois fatores foram considerados no planejamento experimental: temperatura e proporção molar de ácido caprílico. Estas variáveis foram estabelecidas em dois níveis nos seguintes intervalos: a temperatura variou de 30 a 70°C e a proporção molar (ácido caprílico:glicerol) de 2:1 a 6:1, resultando em 11 experimentos. O tempo foi fixado em 6 horas. A porcentagem total de acilgliceróis pode ser obtida tanto por titulação quanto por cromatografia gasosa. O planejamento experimental demonstrou ser eficiente, pois, obteve-se alto rendimento em produtos na maioria dos experimentos, onde se pôde notar que a melhor condição para produção de caprilinas ocorreu quando se combinou baixa temperatura e baixa proporção molar de ácido caprílico no substrato glicerol. As análises quantitativas revelaram que o melhor rendimento resultou em 87,8% de caprilinas. Adicionalmente, a síntese de caprilinas foi estudada em dois tipos de reatores descontínuos: munido ou não de membrana de microfiltração, para avaliar a possibilidade de reuso do biocatalisador. As reações ocorreram na melhor condição experimental do planejamento proposto e em três ciclos de bateladas sucessivas. A membrana de microfiltração aliada à enzima imobilizada demonstrou ser um instrumento importante para diminuir o custo da reação visto que, com seu uso a enzima reteve 82,7% de sua atividade inicial.

Palavras-chaves: acilgliceróis, biodiesel, caprilinas, glicerol, imobilização, lipase.

ABSTRACT

GUEBARA, S.A.B. **Reaction between glycerol and caprylic acid catalyzed by immobilized lipase.** 2016. 99p. Dissertation (Master of Science) School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

Glycerol is one of the most abundant residues in biodiesel production and its availability is directly linked to the intensity of biofuel production. Despite the diversity of industrial applications for glycerol, the demand for new uses is stimulated by increasing the availability and strong decrease of its cost. Thus, this study intended to propose a new alternative for using this polyalcohol, through its esterification with caprylic acid - a natural antimicrobial. The reaction was catalyzed by immobilized lipase (Lipozyme RM IM, sn-1-3 specific[®]) resulting mono, di and tricaprylin. The reactions were designed by using the statistical method called "Delineation Central Composite Rotational (DCCR)". Taking into account the variation of two parameters, i.e., temperature (from 30°C to 70°C) and molar ratio caprylic acid/glycerol (from 2:1 to 6:1) the DCCR pointed to the realization of eleven tests. The time was set at 6 hours. The total percentage of acylglycerols were obtained either by titration or by gas chromatography. The experimental design showed to be efficient because a high yield was achieved in most of the experiments, and the best condition for caprylins production occurred when low temperature and low caprylic acid/glycerol molar ratio were combined. Quantitative analysis revealed that the best yield resulted in 87.8% of caprylins. Additionally, caprylins synthesis was studied by using a batch reactor coupled or not with microfiltration membrane. The reactions were performed under the best experimental condition pointed out by the DCCR and the enzyme reutilized threefold through successive batches. After that the enzyme retained about 83% of its original activity.

Keywords: acylglycerols, biodiesel, caprylins, glycerol, immobilization, lipase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Tipos de imobilização (Fonte: FISCHER, 2010 apud CABRAL et al., 2012).....27

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curvas de DSC mostrando as curvas fusão de MC (a) e DC (b) e TC (c).....41

Figura 2. Curvas de DSC mostrando as curvas cristalização de MC (a) e DC (b) e TC (c)...42

Figura 3. Curvas fusão de misturas binárias de MC/DC nas proporções de 1:1 (a), 1:2 (b) e 2:1 (c).....43

Figura 4. Curvas de cristalização de misturas binárias de MC/DC nas proporções de 1:1 (a), 1:2 (b) e 2:1 (c).....44

Figura 5. Estruturas moleculares de caprilinas: 1-MC (a), 2-MC (b), 1,3-DC (c), 2,3-DC (d), TC (e), glicerol (f). Símbolos R representam o radical heptil $[-(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3]$ e as ligações éster são indicadas em cinza.....47

Figura 6. Exemplos de projeções de Newman para glicerol e caprilinas. A, B, C, D, E e F representam as conformações alternadas enquanto que A1, B1, C1, D1, E1 e F1 representam as conformações eclipsadas, respectivamente, para glicerol, MC, DC e TC. O átomo de oxigênio foi realçado em cinza, cinza escuro e cinza claro a fim de mostrar em qual átomo de carbono no esqueleto de glicerol (veja Figura 5) o grupo hidroxila e/ou ligação éster estão unidos, isto é, C1, C2 e C3, respectivamente.....49

CAPÍTULO 3

Figura 1. Fluxograma de extração de caprilinas.....60

Figura 2. (a) reator descontínuo munido de membrana de microfiltração (b) reator descontínuo convencional.....63

Figura 3. Efeito da temperatura sobre o rendimento de esterificação64

Figura 4. Efeito do tempo sobre o rendimento.....65

Figura 5. Estabilidade operacional da Lipozyme RM IM após sucessivas bateladas. (●) representa as reações em bateladas conduzidas em reator descontínuo convencional. (□) representa as reações em batelada realizadas em reator munido de membrana de microfiltração. Os resultados representam a média das duplicatas.....66

Figura 6. Superfície de Resposta demonstrando a influência da temperatura e proporções entre reagentes sobre o rendimento em caprilinas.....71

Figura 7. Valores preditos versus valores obtidos pelo modelo estatístico utilizado.....71

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Demanda mundial de lipases, expressa em US\$ milhões (Adaptado de SÁ-PEREIRA, et al., 2008).....24

Tabela 2. Temperatura ótima e pH ótimo para atividade de algumas lipases microbianas (Adaptada de GODFREY, WEST, 1996; SHAHANI, 1975).....26

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Entalpia expressa em Jg^{-1} , associado a cada pico (1 a 7) indicado nas Figuras 3 e 4. Proporções de MD/DC foram 2:1, 1:2 e 1:1.....43

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Planejamento Experimental e resultados por DCCR.....61

Tabela 2. Níveis e variáveis avaliadas no Planejamento Experimental.....62

Tabela 3. Efeitos para os fatores e os erros padrão correspondentes para o rendimento.....68

Tabela 4. Análise de Variância do modelo.....69

Tabela 5. Rendimento total de acilgliceróis de acordo com os experimentos que compõem o planejamento experimental.....72

Tabela 6. Porcentagens de mono, di e tricaprilina obtidas em diferentes condições de temperatura e proporção molar ácido caprílico/glicerol. O tempo total de reação foi fixado em 6h.....73

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA – Análise de Variância

CA – Ácido Caprílico

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

DAG – Diacilglicerol

DC – Dicaprilina

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

DSC - *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria Exploratória Diferencial)

FAO – *Food and Agriculture Organization of United Nations*

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS - *Generally Recognized as Safe*

MAG – Monoacilglicerol

MC – Monocaprilina

MQ_R – Média Quadrática da Regressão

MQ_r – Média Quadrática Residual

MSR – Metodologia de Superfície de Resposta

PUFAs – *Polyunsaturated fatty acids*

SQ_{EP} – Soma Quadrática devido ao erro puro

SQ_{FA} – Soma Quadrática devido a falta de ajuste

SQ_R – Soma Quadrática da Regressão

SQ_r – Soma Quadrática Residual

SQ_T – Soma quadrática Total

TAG – Triacilglicerol

TC – Tricaprilina

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
CAPÍTULO 1.....	17
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
1.1 Glicerol	18
1.2 Ácido Caprílico.....	19
1.3 Lipase.....	21
1.4 Acilgliceróis.....	28
2. REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2.....	35
Estudo da Calorimetria Exploratória Diferencial	36
RESUMO	36
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. CONCLUSÃO	50
5. REFERÊNCIAS.....	50
CAPÍTULO 3.....	54
Síntese de acilgliceróis de ácido caprílico em reator descontínuo munido ou não de membrana de microfiltração utilizando lipase imobilizada de <i>Rhizomucor miehei</i> como biocatalisador	55
RESUMO	55
ABSTRACT.....	56
1.INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1 Material.....	59
2.2 Reação de esterificação e análise dos produtos	59
2.3 Planejamento Experimental.....	61
2.4 Recuperação da enzima em bateladas sucessivas	62
2.5 Porcentagem total de acilgliceróis por cromatografia gasosa.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 Efeito da temperatura de reação.....	63
3.2 Efeito do tempo de reação	64
3.3 Reuso da enzima.....	66
3.4 Planejamento Experimental	67
3.5 Porcentagem de acilgliceróis resultantes da reação de esterificação	72
4. CONCLUSÃO	73
5. PERSPECTIVAS	74
6. REFERÊNCIAS.....	74
CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO	78
ANEXOS	79

APRESENTAÇÃO

Biocombustíveis constituem uma fonte de energia sustentável e substituta de combustíveis fósseis. Desempenham um papel importante no avanço da tecnologia, pois sua produção quando comparada à de outros combustíveis libera menor quantidade de gases nocivos à saúde humana e ambiental. Dentro destes novos biocombustíveis, o biodiesel se destaca. Trata-se de um combustível líquido que pode ser obtido a partir de lipídios naturais como óleos vegetais ou gordura animal utilizando processos industriais como transesterificação e esterificação (QUISPE, CORONADO, CARVALHO JR, 2013). Apesar de suas grandes vantagens como ser biodegradável, uma fonte energética renovável e não tóxica, sua crescente produção tem gerado grandes quantidades de seu principal subproduto: o glicerol. Geralmente, 10 -20% do volume total de produção de biodiesel são constituídos de glicerol bruto, com pureza de 50-55%. Sendo assim, o glicerol em sua forma bruta tem baixo valor de mercado devido à sua baixa pureza, a qual limita sua aplicação industrial. Desta forma, no decorrer dos anos diversas técnicas têm sido empregadas com o objetivo de purificar o glicerol bruto, tornando possível sua conversão em produtos de alto valor agregado. As técnicas principais de purificação baseiam-se na combinação de duas operações unitárias, a saber, destilação e adsorção em resinas de troca iônica ou em carvão ativo (TAN, AZIZ, AROUA, 2013).

A biocatálise tem sido empregada em diversos segmentos da atividade humana, promovendo avanços na medicina, na produção de alimentos, na proteção e recuperação ambiental, entre outros. A biocatálise utiliza catalisadores naturais como células, enzimas ou anticorpos catalíticos, os quais permitem executar sínteses com alto grau de especificidade. Além disso, quando comparados aos catalisadores químicos convencionais, os biocatalisadores se sobressaem por ser atóxicos, promoverem reações de alto rendimento, consumirem pouca energia e gerarem produtos mais puros. Este último aspecto simplifica o protocolo de “downstream”, uma vez que o produto principal da reação não se encontra contaminado por produtos colaterais indesejados (TUDORACHE et al., 2014).

Nas diversas reações que empregavam catalisadores químicos e passaram a empregar biocatalisadores podemos citar a reação de esterificação. Originalmente a reação de esterificação foi estabelecida usando um ácido inorgânico como agente catalítico. Porém, a partir da segunda metade do século passado foi demonstrada a viabilidade do uso da lipase como catalisador da reação, sobretudo na forma imobilizada (MINOVSKA et al., 2005).

Dessa maneira, consegue-se aumentar a estabilidade da enzima frente ao pH, à temperatura, à presença de solventes e de agentes desnaturantes; utilizar a atividade catalítica por um maior período de tempo; reutilizar a mesma quantidade de catalisador sem decréscimo significativo da atividade enzimática; facilitar a separação do produto final do meio reacional; interromper a reação em um momento pré-estabelecido executada em reator tipo batelada pela remoção da enzima; e reduzir o custo do processo devido ao aumento da vida útil da enzima (PORAJ-KOBIELSKA, et al., 2015; CABRAL, et al., 2012).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa ao estudo da reação do glicerol com ácido caprílico, esterificação em processo descontínuo, utilizando lipase imobilizada como biocatalisador, para obter mono, di e tricaprilina, derivados de interesse econômico, devido ao grande uso como emulsificantes nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Desta forma, com a rota biocatalítica apresentada seria possível converter um subproduto abundante sem grande valor econômico em produtos de alto valor agregado e ampla aplicação industrial.

Sendo assim, os objetivos gerais do presente trabalho foram:

Geral: Sintetizar caprilinas, através da esterificação do glicerol com o ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada, em reator descontínuo munido de membrana de ultrafiltração e em reator descontínuo convencional.

Específicos:

- (i) Determinar o melhor planejamento experimental para obtenção de máximo rendimento em caprilinas;
- (ii) Comparar os reatores descontínuo convencional e reator descontínuo com membrana de ultrafiltração na melhor condição do planejamento experimental
- (iii) Verificar a cinética da reação na melhor condição do planejamento experimental;
- (iv) Utilizar a Metodologia de Superfície de Resposta para avaliar a influência das variáveis sobre o rendimento em caprilinas.

Para esse fim, a presente Dissertação de Mestrado foi dividida em 3 capítulos distintos, a saber:

Capítulo 1: Apresenta o embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho.

Capítulo 2: Estudo de Calorimetria Exploratória Diferencial de caprilinas

Este artigo teve como objetivo propor o uso de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) como uma ferramenta para acompanhar o processo de síntese de caprilinas.

Capítulo 3: Síntese de acilgliceróis de ácido caprílico em reator do tipo batelada munido ou não de membrana de microfiltração utilizando lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* como biocatalisador

Esta seção teve como objetivo sintetizar caprilinas em reator descontínuo convencional. A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para otimizar a reação. Na melhor condição experimental, foi realizado o reciclo da enzima em dois tipos de reatores descontínuos munidos ou não de membrana de microfiltração.

Após as referências do capítulo 3, encontram-se as conclusões gerais do presente trabalho.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Glicerol

O glicerol é um poliálcool de amplo uso industrial, sendo encontrado no comércio desde o final do século XIX. Quando tiver grau de pureza não inferior a 95% constitui a glicerina, nome pelo qual é popularmente conhecido.

O glicerol é um líquido xaroposo, incolor, quase inodoro, de sabor adocicado e higroscópico. Miscível com água e álcool em qualquer proporção e imiscível em benzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono, dentre outros solventes apolares. Algumas de suas propriedades físico-químicas: PF = 17,8 °C, PE^{760mmHg} = 290 °C, ρ = 1,261 g/cm³, Flash Point = 176 °C (recipiente aberto), Freezing Point (solução aquosa 10% p/p) = - 1,6°C e $\eta_{5\%}$ = 1,143 cps.

Até 1950 o glicerol disponível no mercado provinha da indústria do sabão, da qual era um subproduto. Nos anos seguintes começou a ser sintetizado a partir de derivados do petróleo, mas a disponibilização em grandes quantidades deu-se no início do presente século em decorrência da expansão mundial da indústria do biodiesel (STOYTCHIEVA, et al., 2011). De acordo com VASCONCELOS (2012), para cada mil quilos de biodiesel produzido resultam 100 quilos de glicerol residual. Considerando que em 2011 somente o Brasil produziu 2,6 bilhões de litros de biodiesel, a quantidade de glicerol residual foi de 260 mil toneladas. Em termos planetários a oferta atual de glicerol anda por volta de 1,5 milhão de toneladas. Segundo o autor citado, a disponibilidade de glicerol tende a crescer, uma vez que é estimada para 2020 uma produção nacional da ordem de 14,3 bilhões de litros de biodiesel.

Como matéria-prima, o glicerol é empregado tradicionalmente em medicamentos (componente da formulação de especialidades farmacêuticas - ungentos, pomadas, por exemplo - e como componente de embalagens para acondicionar as formas farmacêuticas), em alimentos (como umectante nas formulações, devido a sua alta higroscopicidade), em cosméticos (inibe o ressecamento de cremes, loções e sabonetes), no amaciamento e elasticidade de fibras têxteis, como plastificante para aumentar a resistência e a maleabilidade do papel, na fabricação de nitroglicerina, no aumento da resistência e na proteção ao ressecamento das folhas do tabaco, como lubrificante em geral e como ingrediente de tintas, vernizes e detergentes. Entretanto, novas aplicações vêm sendo preconizadas para esta substância, com destaque na alimentação animal (componente de rações para porcos, frangos e bovinos), na agregação de material particulado evitando sua suspensão no ar (caso do

transporte de minério de ferro em vagões abertos), na queima em caldeiras (geração de vapor e eletricidade) e como reagente na obtenção de etilenoglicol (anticongelante de fluidos usados em radiadores), etanol combustível, propanodiol, bioaditivos (anticongelantes e antioxidantes para gasolina e diesel), propeno, dentre mais de uma centena de aplicações preconizadas (ROSSI, et al., 2012; ALBARELLI, et al., 2011; MEDEIROS, et al., 2012; MERCK INDEX, 1996).

Embora os usos para o glicerol sejam muito diversificados na atualidade, a quantidade resultante da indústria do biodiesel garante um excesso quase que permanente desta matéria-prima, obrigando o setor acadêmico-tecnológico-empresarial a um constante desbravamento de novas tecnologias para o aproveitamento deste resíduo, agregando-lhe valor de mercado significativo. O direcionamento do glicerol para a síntese de compostos de maior valor agregado (ésteres de ácidos graxos, polímeros do propeno, 3-hidroxipropionaldeído, 1,3-propanodiol, etc.) pode ser uma das alternativas procuradas, levando, inclusive, a uma possível intersecção com o setor petroquímico e sucroalcooleiro, justamente através de insumos químicos (propeno, propanodiol, etc.) que possibilitam, por exemplo, a obtenção de plásticos e resinas, hoje provenientes na maior parte do processamento do petróleo. Esta tendência de associação (etanol-biodiesel-derivados do petróleo) conduzirá à implantação de complexos industriais multifacetados – as chamadas biorrefinarias, que, segundo estimativas, suprirão no futuro próximo 65% de todos os produtos químicos, podendo alcançar 100% nos próximos 50 anos (ADEODATO, 2013). Como boa parte das reações para a conversão do glicerol em derivados são processos catalisados (VASCONCELOS, 2012), o emprego de enzimas - biocatalisadores altamente específicos, atuam em condições brandas de reação, atóxicos e ambientalmente inofensivos -, apresenta enorme potencialidade. Por conseguinte, neste projeto propõe-se a obtenção de acilgliceróis a partir de glicerol e ácido graxo intermediado pela ação da lipase (EC 3.1.1.3).

1.2 Ácido Caprílico

O termo ácido caprílico é o nome usual do ácido octanóico, que é um ácido graxo saturado de ocorrência natural (leite de mamíferos, sobretudo leite de cabra, e nos óleos de coco, babaçu e palma). No leite de mamíferos e em óleos vegetais de diferentes origens o teor total de ácido caprílico não ultrapassa o valor de 8%. No entanto, nas sementes das espécies

Cuphea hookerina e *Cuphea painteri* ocorre em teores da ordem de 70% (GADOTTI, NELSON, DIEZ-GONZALES, 2014; MILLER, et al., 1967).

O ácido caprílico é um líquido oleoso com sabor ligeiramente rançoso, pouco solúvel em água (0,068 g/100g; 20°C), mas miscível com álcool, clorofórmio, éter, dissulfeto de carbono, éter de petróleo e ácido acético glacial. Algumas de suas propriedades físico-químicas: PF = 16,7°C; PE = 240°C; d₂₀ = 0,910 g/cm³; Flash Point = 130°C.

O ácido caprílico é classificado pelo FDA como GRAS (Generally Recognized as Safe). Assim como a monocaprilina, este ácido graxo é reconhecido por sua propriedade antimicrobiana, visto que tem a capacidade de inativar diversos patógenos como *Streptococcus* do grupo B, *Haemophilus influenzae* e patógenos transmitidos por alimentos como *E. coli*, *Bacillus cereus* e *L. monocytogenes*, além de bactérias Gram-positivos e Gram-negativos por um mecanismo que envolve , provavelmente, a interrupção ou desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa (CHANG et al.,2010; HULANKOVA et al.,2013). De acordo com o comitê de especialistas da FAO/WHO em aditivos alimentares, este ácido é considerado seguro, quando utilizado como flavorizante e, nos Estados Unidos, este ácido é aprovado para ser utilizado na superfície de carnes por possuir a capacidade de inativar micro-organismos patogênicos (HULANKOVA et al.,2013). Nos últimos anos, as pesquisas intensificaram-se no propósito de se descobrir antimicrobianos naturais, assim como o ácido caprílico, que aumentassem a vida de prateleira de diversos alimentos, reduzindo assim o uso dos antimicrobianos sintéticos (HULANKOVA et al.,2013).

O ácido caprílico tem ação antifúngica contra *Candida albicans*, um fungo responsável por diversas infecções de pele e intestino. Seu mecanismo de ação não foi totalmente elucidado, mas supõe-se que este ácido graxo tem a capacidade de dissolver a membrana celular do fungo, causando mudanças nos fluidos e na permeabilidade celular, levando a sua destruição. Pode ser obtido através da hidrólise de alguns óleos vegetais, sendo, a seguir, separado da mistura de ácidos graxos por destilação fracionada a vácuo. Além da via extrativa, este composto pode ser obtido a partir do 1-hepteno ou da oxidação do octanol (MERCK INDEX, 1996). Este ácido tem aplicação na indústria de cosméticos para formulação de cremes, shampoos, visto que ao reagir com a glicerina forma um composto com propriedades emolientes e lubrificantes. Já quando reage com álcoois forma ésteres que são amplamente utilizados na síntese de perfumes.

Outras propriedades farmacológicas importantes deste ácido são: capacidade intrínseca de produzir efeito anticonvulsivante agudo, além de servir como substrato metabólico para produção de corpos cetônicos, os quais também atuam como anticonvulsivantes agudos; quando administrado em dose ineficaz, tem a capacidade de potencializar o efeito anticonvulsivante da droga valproato (WLAZ et al., 2012); capacidade de interferir no controle do balanço energético corpóreo, via estímulo do apetite, uma vez que se liga ao hormônio grelina através da esterificação da hidroxila de uma serina, um dos 28 aminoácidos formadores do peptídeo.

1.3 Lipase

As lipases (EC.3.1.1.3) são enzimas encontradas em seres procarióticos e eucarióticos, que catalisam modificações estruturais dos componentes de materiais oleosos e gordurosos. A atividade lipolítica no organismo está associada ao anabolismo e ao catabolismo das gorduras. Essas enzimas vêm sendo estudadas desde 1846, quando a atividade lipolítica do pâncreas foi detectada. Em 1871 foi detectada, também, em sementes de vegetais. A partir dos anos cinquenta e sessenta do século passado começaram a ser isoladas e purificadas, respectivamente, a partir de órgãos animais e de micro-organismos – por exemplo, *Geotrichum candidum* (1965), *Staphylococcus aureus* (1967) e *Achromobacter lipolyticum* (1967).

As reações catalisadas por esta categoria de enzimas sempre envolvem a modificação de algum éster através de três mecanismos distintos, a saber, hidrólise, esterificação e transesterificação. Enquanto a transesterificação compreende quatro tipos diferentes de reações unidirecionais, a hidrólise e a esterificação conectam-se através de um mecanismo de equilíbrio, cujo deslocamento para a direita (ocorre em meio aquoso) ou para a esquerda (ocorre em meio não aquoso) estará na dependência da atividade de água do meio reacional.

O equilíbrio entre a hidrólise e a esterificação pode ser esquematizado como segue:

As quatro reações diferentes, que constituem o mecanismo lipásico denominado de transesterificação são:

ACIDÓLISE (reação entre um éster e um ácido graxo):

ALCOÓLISE (reação entre um éster e um álcool):

INTERESTERIFICAÇÃO (reação entre ésteres de ácidos graxos):

AMINÓLISE (reação entre um éster e uma amina):

Considerando os tipos de reações citadas, fica clara a versatilidade catalítica das lipases, explicando, inclusive, o amplo uso delas em processos biocatalíticos industriais – na interesterificação de gorduras, hidrólise de ésteres, transesterificação e acilação, desde 1979 (FREIRE, CASTILHO, 2008). Por conseguinte, são vários os segmentos industriais nos quais as lipases desempenham papel fundamental nos processos executados, a saber, **alimentos** (liberação de ácidos graxos a partir de óleos e/ou gorduras presentes nas matérias-primas para alimentos, introduzindo via de regra modificações organolépticas, físico-químicas e nutricionais desejáveis nos produtos finais; melhoramento da textura da massa em panificação; encurtamento do período de maturação de embutidos (como salsichas, por exemplo); desenvolvimento de aromas, sabores, hidrólise da gordura do leite e na aceleração da maturação de queijos curados), **detergentes** (em associação com proteases servem para remover manchas de roupas e demais tecidos), **oleoquímica** (as lipases são usadas para modificar óleos e gorduras, permitindo obter derivados com características metabólicas benéficas para uso humano, tais como os ácidos graxos poliinsaturados – PUFAs, na sigla em inglês – e lipídios estruturados. Os PUFAs são usados como fármacos, produtos dietéticos,

nutracêuticos e aditivos alimentares, enquanto os lipídeos estruturados, na forma emulsionada, constituem-se em excelentes substitutos dos óleos vegetais na área de alimentação parenteral e enteral), **farmoquímica** [segundo GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006 e GHANEM, ABOUL-ENEIN, 2004, as lipases, além de serem estáveis em solventes orgânicos, possuem como características intrínsecas a regio, enantio e quimiosseletividade, que as tornam extremamente úteis na resolução de misturas racêmicas e na obtenção de compostos opticamente ativos como o (R)-feniletilmetoxiamida, usado como intermediário na síntese de fármacos e pesticidas (LIESE et al., 2006), oleamida [amidação do ácido oleico com amônia (SLOTEMA et al, 2006)]; **biodiesel** (na fabricação deste biocombustível explora-se a transesterificação de triglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia longa – oriundos do óleo de mamona ou soja - com álcoois de cadeia curta (por exemplo, metanol, etanol), resultando mistura de ácidos graxos de cadeias longas esterificados, a qual, após a separação do glicerol, constitui o biodiesel propriamente dito; A queima do biodiesel nos motores de combustão interna não gera óxidos de enxofre e nem materiais particulados); **outras aplicações** (biossensores para detectar triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas; produção de aromas, emolientes e de surfactantes para uso na indústria de cosméticos; em associação com outras hidrolases na fabricação do couro; em associação com celulasas e ligninases para a limpeza dos cilindros de secagem usados na indústria de polpa e papel [FREIRE, CASTILHO, 2008]).

A diversidade de aplicações para as lipases se reflete nos números de sua participação no mercado global de enzimas (Tabela 1). Considerando a divisão do mercado de enzimas proposta por SÁ-PEREIRA, et al. (2008) em enzimas industriais (enzimas técnicas – para produtos de limpeza, têxtil, de couros, de etanol combustível e de papel e celulose -, enzimas para a indústria de alimentos e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química fina e enzimas para pesquisa), observa-se que as lipases se enquadram em ambos os grupos. A título de ilustração salienta-se que os setores de alimentos, bebidas e produtos de limpeza respondem por 80% da demanda de lipase para uso industrial e que o setor farmoquímico sozinho consome 60% da lipase para aplicações especiais (SÁ-PEREIRA, et al., 2008).

Tabela 1. Demanda mundial de lipases, expressa em US\$ milhões (Adaptado de SÁ-PEREIRA, et al., 2008)

GRUPOS DE ENZIMAS	ANO				
	1994	1999	2004	2009*	2014*
Industrial	67	114	196	286	419
Especial	23	41	54	79	111
Demanda mundial de enzimas	1.990	2.670	3.700	5.080	7.120
% Lipase	4,5	5,8	6,8	7,2	7,4

O desempenho notável apresentado pelas lipases nos diferentes segmentos de aplicação comercial até o momento – inclusive, espera-se para o futuro incremento na diversidade de aplicação com a consequente ampliação do mercado – está ligado, em boa parte, aos conhecimentos básicos acumulados ao longo das seis últimas décadas, sobretudo, a respeito das suas fontes de obtenção, meios de produção, isolamento e purificação e das características cinéticas, estruturais e da relação estrutura-atividade.

As lipases são encontradas em espécies dos três reinos de seres vivos. Porém, industrialmente os micro-organismos são a fonte preferida, uma vez que têm alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva. Exemplos de micro-organismos utilizados para a obtenção de lipases são a *Candida rugosa*, *Candida Antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Humicola languinosa*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Candida cylindraceae*, *Aspergillus Níger*, *Pseudomonas fluorescens* e *Chromobacterium viscosum* (FREIRE, CASTILHO, 2008; GODTFREDSSEN, 1993).

O principal método de produção de lipases é através de fermentação por cultura submersa e, em menor extensão, por cultivo em superfície (semissólido). No cultivo submerso, em linhas gerais, a produção de lipases é influenciada por parâmetros como tipo e concentração da fonte de carbono (compostos lipídicos são os melhores) e de nitrogênio (peptona, farelo de soja, extrato de levedura e milhocina), presença de íons metálicos, pH do

meio, temperatura de crescimento e concentração de oxigênio dissolvido. No que tange ao isolamento e purificação de lipases a partir do caldo fermentado, recomenda-se consultar SAXENA et al., 2003; SHARMA et al., 2001; AIRES-BARROS et al., 1994; MUKHERJEE, HILLS, 1994.

A cinética das lipases vem sendo estudada desde a segunda metade do século passado, tendo iniciado com a constatação de que as lipases, ao menos as conhecidas até então, atuavam sobre triglicérides, quando estes estavam na forma emulsionada, levando à ideia geral de que as lipases atuam na interface das micelas orgânico-aquosas, sendo, por isso, dependentes da denominada “ativação interfacial” (SARDA, DESNUELLE, 1958; DESNUELLE, 1972). Esta ativação resultaria da adsorção da enzima na interface água-lipídio, seguida de mudanças conformacionais em sua estrutura molecular (CYGLER, SCHRAG, 1997). Porém, verificou-se que nem toda lipase (por exemplo, lipase de *Candida Antarctica*) depende da ativação interfacial. Modernamente, estudos sobre a estrutura tridimensional de proteínas e de cristalografia indicaram que as lipases têm o mesmo dobramento básico – chamado α,β -hidrolase – e sítio ativo formado pela tríade serina-histidina-aspartato (glutamato), sendo essa tríade recoberta por pequeno dobramento da estrutura secundária e/ou terciária da proteína, formando uma espécie de “tampa”. Por conseguinte, quando a enzima está em solução aquosa a “tampa” se dispõe sobre o domínio do sítio ativo, fechando-o, mas que ao interagir com a interface óleo-água seria deslocado, abrindo-o. O mecanismo de “abre-fecha” da tampa, ligado diretamente a modificações conformacionais da macromolécula, foi observado tanto em lipases de famílias homólogas quanto heterólogas, indicando que o mesmo é fundamental para a atividade lipolítica (FREIRE, CASTILHO, 2008).

As lipases microbianas têm sua atividade incrementada pela presença em baixa concentração de sais de cálcio, potássio, sódio e magnésio, sendo inibidas por metais pesados (SHAHANI, 1975). Os efeitos do pH e da temperatura na atividade lipolítica (Tabela 2) dependem da origem da enzima (cepa selvagem, cepa mutante selecionada ou organismo geneticamente modificado, este obtido pela transferência de genes interespecies seguida da clonagem da célula receptora ou por mutação sítio-dirigida – alteração da sequência planejada de bases do gene que codifica a enzima).

As reações biocatalisadas pelas lipases têm como competidores processos químicos convencionais, como, por exemplo, a hidrólise de óleos e gorduras poder ser executada através do rompimento térmico em pH alto ou baixo (GODTFREDSEN, 1993). Para tornar

economicamente viável o uso das lipases nos processos operacionalizados nos diferentes segmentos industriais há a necessidade de se reduzir o seu custo quer pelo aprimoramento dos micro-organismos produtores (seleção de mutantes altamente produtores pela aplicação de técnicas genéticas convencionais e/ou expressão de genes codificadores de lipases em micro-organismos, como a *E.coli*, de fácil cultivo) quer pela sua reutilização. Esta última proposição pode ser alcançada através do emprego da técnica de imobilização.

Tabela 2. Temperatura ótima e pH ótimo para atividade de algumas lipases microbianas

(Adaptada de GODFREY, WEST, 1996; SHAHANI, 1975)

FONTE	pH _{ótimo}	T (°C)	FONTE	pH _{ótimo}	T (°C)
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7,0	37	<i>Penicillium camemberti</i>	5,0	45
<i>Alcaligenes spp.</i>	7,0-8,5	37-40	<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,2-6,8	37
<i>Aspergillus Níger</i>	5,0-7,0	45-55	<i>Penicillium roqueforti</i>	5,0-7,0	40-50
<i>Aspergillus oryzae</i>	8,0-11,0	30-40	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,0-8,0	45
<i>Candida cylindracea</i>	7,0	40-50	<i>Pseudomonas fragi</i>	7,0-7,2	32
<i>Candida rugosa</i>	6,0-7,0	30-40	<i>Rhizomucor miehei</i>	5,0-7,0	30 - 50
<i>Chromobacterium viscosum</i>	5,0-9,0	50-60	<i>Rhizopus japonicus</i>	7,0	40
<i>Geotrichum candidum</i>	8,2	37	<i>Rhizopus javanicus</i>	6,6-7,1	37
<i>Mucor javanicus</i>	7,0	37	<i>Rhizopus niveus</i>	7,0	45
<i>Mucor miehei</i>	6,0-8,0	30-50	<i>Rhizopus oryzae</i>	7,0	40

A imobilização consiste em se associar uma enzima a um suporte inerte através de métodos físico, químico e/ou físico-químico. Devido às características moleculares intrínsecas

das enzimas e à natureza do substrato e produto tem-se uma diversidade de métodos de imobilização (Figura 1).

]

Figura 1. Tipos de imobilização (Fonte: FISCHER, 2010 apud CABRAL et al., 2012).

Vale ressaltar que o tipo de método empregado para a imobilização ou ainda o tipo de suporte, o qual pode ser classificado como poroso ou não poroso ou, ainda, de acordo com sua composição ou morfologia, dependerá de características da própria enzima e das condições de aplicação da enzima imobilizada. Deve-se escolher o método mais simples e barato, que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (NISHA et al., 2012).

No caso da imobilização da lipase o procedimento não foi inédito “per se”, mas a demonstração de que o sistema imobilizado poderia ser aplicado para processo de síntese de ligação éster em meio não aquoso, ilustrou a propriedade de uma enzima hidrolítica poder catalisar a reação inversa. Este fato foi estendido, também, para outras hidrolases. Parece indubitável que o marco inicial da história da imobilização da lipase deu-se por conta de um pedido de patente, em 1976, pela UNILEVER (empresa inglesa) sobre a interesterificação do óleo de palma para obter a manteiga de cacau (WEST, 1996). Desde então, o emprego da lipase na forma imobilizada disseminou-se na modificação de substâncias graxas em geral através de processos de hidrólise, esterificação (sobretudo de ácidos graxos) e na transesterificação de triglicerídeos com álcool de baixa massa molar (metanol, etanol,

principalmente) na produção de biodiesel (STOYTCHIEVA, et al., 2011; KUWAHARA et al., 2013; BISEN, et al., 2010; CAO, 2005; ALMEIDA, et al., 2012; VILLENEUVE, et al., 2000).

A lipase vem sendo imobilizada por adsorção, aprisionamento e ligação covalente em diferentes suportes, com ênfase no método por adsorção (STOYTCHIEVA et al., 2011; SEVERAC, et al., 2011).

O método por adsorção é considerado, ao lado do método de aprisionamento em alginato de cálcio, como um dos métodos de imobilização de mais simples execução. No método de adsorção a enzima se fixa ao suporte através de ligações não covalentes – ligações de hidrogênio, forças de Van der Waal's, interação eletrostática, dentre outras -, sendo as condições de processo bem suaves, inclusive não requerendo ativação prévia do suporte (uma lavagem com tampão antes do uso é suficiente para a remoção de eventuais impurezas presentes) e nem reagentes adicionais (TOMOTANI, VITOLO, 2007). Por isso, este método é econômico, além de permitir que a enzima mantenha sua atividade e especificidade. No entanto, atenção deve ser dada à composição química do suporte, à razão molar entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, ao tamanho das partículas e à área superficial disponível para a ligação, porque esses fatores influem na quantidade total de enzima imobilizada e no seu desempenho catalítico após a imobilização. Segundo STOYTCHIEVA et al., (2011) a variedade de suportes disponíveis é grande, citando, dentre eles, polímeros macroporosos, carvão ativado, celite, poliestireno, poliacrilonitrila, cerâmicas, resinas hidrofílicas (Amberlite, Dowex, por exemplo), sílica e zeólitos.

No presente projeto propõe-se o uso da lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* sn-1,3 estereoespecífica para esterificar o glicerol com um só tipo de ácido graxo, no caso o ácido caprílico (ácido octanóico), visando à obtenção de mono e dicaprilinas.

1.4 Acilgliceróis

Acilgliceróis são ésteres formados por glicerol e ácidos graxos. Gliceróis parciais, como mono- e diacilgliceróis, são intermediários importantes no metabolismo e os triacilgliceróis são os principais constituintes da maioria dos óleos e gorduras comestíveis (SCRIMGEOUR, HARWOOD, 2007). Entre estes, monoacilgliceróis (MAG) são surfactantes não iônicos que possuem o status GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drugs Administration-USA), e têm grande aplicação nas indústrias

farmacêutica, de alimentos e de cosméticos, por não apresentarem efeitos colaterais quando ingeridos ou irritações na pele, ao contrário dos surfactantes iônicos (DA SILVA et al., 2002; MACHADO et al., 2000).

Na indústria farmacêutica, os monoglicerídeos (MAG) são utilizados como emolientes para emplastos, liberando lentamente a medicação. Na indústria alimentícia são mais comumente utilizados como emulsificantes em uma ampla gama de produtos como margarinas, derivados do leite, doces e molhos, enquanto que na indústria de cosméticos, são empregados como agentes texturizantes e para melhorar a consistência de cremes e loções (KAEWTHONG et al., 2005). Os MAGs compostos por apenas um tipo de ácido graxo têm aplicações mais específicas, conforme exemplos citados a seguir. A monocaprilina possui propriedades antivirais, bacteriana e microbiana, sendo utilizada em emulsões para mucosa bucal, reduzindo os prejuízos causados por bactérias como *Candida albicans*, que se aloja entre a gengiva e os dentes (principalmente nas dentaduras). Estudos recentes ressaltam algumas funções da monocaprilina, como propriedades antifúngicas e antibacterianas em materiais têxteis (VLTAVSKA et al., 2013), inativação de *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em alimentos e bebidas (CHANG et al., 2010; GARCIA et al., 2007) e controle de patógenos causadores de doenças em espécies aquáticas em cativeiro (KOLLANOOR et al., 2007), entre outras. A monolaurina possui propriedades antimicrobiana. Em medicamentos é usada para destruir a gordura revestida de viroses como, por exemplo, HIV, herpes, várias bactérias patogênicas (ex. *Listeria monocytogenes*) e protozoa (ex. *Giardia lamblia*). A monolaurina, também, é usada como um dos principais agentes penetrantes para aplicações em membranas mucosas, onde reduz o tempo necessário para o início da ação da droga, aumenta a quantidade da droga penetrante e causa menor ou nenhum efeito deletério à membrana mucosa. A monooleína pode ser utilizada como sistema de liberação de drogas, carreador farmacêutico e emulsificante (FREITAS et al., 2008).

Acilglicerois parciais tradicionalmente são produzidos através de reações químicas pela glicerólise contínua de triacilglicerois por catalisadores inorgânicos (Ca(OH)_2 , NaOH) sob elevadas temperaturas (220-250 °C). Entretanto, o uso de lipases como catalisadores na síntese de MAG – sendo proposto neste projeto a esterificação do glicerol com o ácido caprílico - tem sido estudado intensamente como alternativa ao método clássico (SONNTAG, 1982; KITTIKUN et al., 2008; PAWONGRAT et al., 2007). As vantagens da reação enzimática residem em sua especificidade, possibilitando a síntese de produtos que não poderiam ser obtidos por rota química convencional, condições mais amenas de reação,

resultando em produtos de melhor qualidade, pouca ou nenhuma reação colateral ou formação de produtos indesejados. Cabe ainda ressaltar que, do ponto de vista ambiental, o processo é tecnicamente limpo e seguro, pois há maior facilidade de recuperação do produto final, melhor controle sobre o processo, menor descarte de água e menores custos de energia (YANG et al., 2005). Ainda, do ponto de vista econômico, vem de encontro a uma das prioridades tecnológicas nacionais patrocinada pelo Governo Brasileiro, qual seja o aumento da produção de biodiesel com a consequente sobra de glicerol, para o qual se deve encontrar e desenvolver processos direcionados à obtenção de derivados de maior valor de mercado (FREITAS et al., 2009).

Ressalta-se que o motivo da presente proposta é a obtenção de glicerídeos – através do uso da lipase na forma imobilizada - constituídos de um só tipo de ácido graxo, em particular do ácido caprílico (ácido octanóico), os quais encontram emprego em formulações farmacêuticas (FREITAS et al., 2008).

2. REFERÊNCIAS

- ADEODATO, S. Investimentos em etanol de segunda geração e química verde crescem no Brasil. **Valor Econômico**. 23 jan., 2013. Caderno F, p. 1.
- AIRES-BARROS, M.R. Isolation and purification of lipases. In: WOOLEY, P.; PETERSEN, S.B. **Lipases: their structure, biochemistry and application**. Cambridge University Press, 1994. p. 243-270.
- ALBARELLI, J.Q.; SANTOS, D.T.; HOLANDA, M.R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.4, p. 691-698, 2011.
- ALMEIDA, V.M., BRANCO, C.R.C., ASSIS, A.S., VIEIRA, I.J.C., BRAZ-FILHO, R., BRANCO, A. Synthesis of naringin 6'-ricinoleate using immobilized lipase. **Chemistry Central Journal**, v.6, n.41, p.41-47, 2012.
- BISEN, P., SANODIYA, B., THAKUR, G., BAGHEL, R., PRASAD, G.B.K. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. **Biotechnology Letter**, v.32,n.8, p.1019-1030, 2010.
- CABRAL, B.V.; FALLEIROS, L.N.S.S.; RIBEIRO, E.J. Estudo da imobilização de invertase em resinas de troca iônica e produção de açúcar invertido. **Horizonte Científico**. Uberlândia, v.6, n.2, p. 1-26, 2012.
- CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design**. John Wiley & Sons, 2005.
- CHANG, S.S.; REDONDO-SOLANO, M.; THIPPAREDDI, H. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.1, p.141-146, 2010.

- CYGLER, M., SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymology**, v.284, p.3-27, 1997.
- DA SILVA, M.A.M.; MEDEIROS, V.C.; FREIRE, D.M.G.; LANGONE, M.A.P. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Natal, Brasil, 2002
- DESNUELLE, P. Pancreatic lipase. **Advances Enzymology**, v.23, p.129-161, 1972.
- FREIRE, M.D., CASTILHO, L.R. Lipases em biocatálise. In: BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência, 2008. p.369-385.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F. Monoglicerídeos: Produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 31, n.6, p.1514-1521, 2008.
- FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; BARCZA, M.V. CASTRO, H.F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2277-2281, 2009.
- GADOTTI, C; NELSON, L; DIEZ-GONZALES, F. Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. **Food microbiology**, v.39, p.1-6, 2014.
- GARCIA, M.; AMALARADJOU, M.A.R.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; SURENDRANATH, S.; LEE, S.; HOAGLAND, T.; DZUREC, D.; FAUSTMAN, C.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1594-1599, 2007.
- GHANEM, A., ABOUL-ENEIN, H.Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, v.15, n.21, p.3331-3351, 2004.
- GODFREY, T., WEST, S. **Industrial Enzymology**. 2nd ed. MacMILLAN PRESS LTD., Hong Kong, 1996. 609 p.
- GODTFREDSEN, S.E. Lipases. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 3rd ed, Academic Press, 1993. p. 205-219.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BRIEVA, R., GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 40, n.3, p. 111-120, 2006.
- HULANKOVA, R.; BORILOVA, G.; STEINHAUSEROVA, I. Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. **Meat Science**, v.95,n.2, p.190-194, 2013.
- KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v.40, n.5, p.1525-1530, 2005.
- KITTIKUON, 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, 2008.
- KOLLANOOR, A.; VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). **Aquaculture Research**, v.38, n.12, p.1293-1300, 2007.

- KUWAHARA, Y., YAMANISHI, T., KAMEGAWA, T., MORI, K., YAMASHITA, H. Activity, recyclability, and stability of lipases immobilized on oil-filled spherical silica nanoparticles with different silica shell structures. **Chem.Cat.Chem.**, v.5, n.8, p.2527-2536, 2013.
- LIESE, A., SEELBACH, K., WANDREY, C. **Industrial Biotransformations**. 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 570 p.
- MACHADO, M.D.; PEREZ-PARIENTE, J.; SASTRE, E.; CARDOSO, D.; DE GUERENU, A.M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. **Applied Catalysis A-General**, v.203, n.2, p.321-328, 2000.
- MEDEIROS, M.A.; LEITE, C.M.M.; LAGO, R.M. Use of glycerol by-product of biodiesel to produce an efficient dust suppressant. **Chemical Engineering Journal**, v.180, p.364-369, 2012.
- MERCK INDEX. 12th ed, p. 763, 1996.
- MILLER, R.W., EARLE, F.R., WOLFF, I.A. Search for new industrial oils. IX. *Cuphea*, a versatile source of fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.41, p.279-280, 1964.
- MUKHERJEE, K.D., HILLS, M.J. Lipases from plants. In: WOOLEY, P., PETERSEN, S.B. **Lipases: their structure, biochemistry and application**. Cambridge University Press, 1994. p. 49-75.
- NISHA, S., KARTHICK, A.S., GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review Letters**, v.1, n.3, p.148-155, 2012.
- PAWONGRAT, R.; XU, X.B.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. **Food Chemistry**, v.104, n.1, p.251-258, 2007.
- ROSSI, D.M., COSTA, J.B., SOUZA, E.A., PERALBA, M.C.R., AYUB, M.A.Z.. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. **Renewable Energy**, v.39, n.1, p. 223-227, 2012.
- SÁ-PEREIRA, P., DUARTE, J.C., FERRARA, M.A., BERGO, P.S., ALVES, F.C. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E.P.S., FERRARA, M.A., CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência, 2008. p.433-462.
- SARDA, L., DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esters em émulsion. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v.30, n.3, p.513-521, 1958.
- SAXENA, R.K., GHOSH, P.K., GUPTA, R. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, n.1, p.1-18, 2003.
- SCRIMGEOUR, C.M.; HARWOOD, J.L. Fatty Acid and Lipid Structure. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. **The Lipid Handbook**. 3.ed. CRC Press, 2007. cap.1, p.1-36.
- SEVERAC, E., GALY, O., TURON, F., PANTELE, C., CONDORET, J.S., MONSAN, P., MARTY, A. Selection of Calb immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, n.1, p.61-70, 2011.

- SHAHANI, K.M. Lipases and Esterases. In: REED, G. **Enzymes in Food Processing**, Academic Press, 1975. p. 181-217.
- SHARMA, R. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, n.8, p.627-662, 2001.
- SLOTEMA, W.F., SANDOVAL, G., GUIEYSSE, D., STRAATHOF, A.J., MARTY, A. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalysed amidation with ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v.82, n.6, p.664-669, 2003.
- SONNTAG, N. Glycerolysis of fats and methyl-esters - Status, review and critique. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, v.59, n.10, p.A795-A802, 1982.
- STOYTCHIEVA, M., MONTERO, G., TOSCANO, L., GOCHEV, V., VALDEZ, B. The immobilized lipases in biodiesel production. In: STOYTCHIEVA, M. **Biodiesel Feedstocks and Processing Technologies**. InTech, 2011, cap.19, p.397-405.
- TOMOTANI, E.J., VITOLO, M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1020-1025, 2007.
- VASCONCELOS, Y. Resíduos bem-vindos. **Revista Pesquisa FAPESP**, Junho, p. 56-63, 2012.
- VILLENEUVE, P., MUDESHWA, J.M., GRAILLE, J., HAAS, J.M. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.
- VLTAVSKA, P.; KASPARKOVA, V.; JANIS, R.; BUNKOVA, L. Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, n.7, p.849-856, 2012.
- WEST, S. Chemical biotransformations. In: GODFREY, T., WEST, S. **Industrial Enzymology**. MacMILLAN Press LTD, 1996. p. 157-174.
- WLAZ, Piotr et al. Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. **Neuropharmacology**, v.62, p.1882-1889, 2012.
- YANG, T.;FRUEKILDE, M.B.; XU, X. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. **Food Chemistry**, v.92, p.101-107, 2005.

CAPÍTULO 2

Estudo de Calorimetria Exploratória Diferencial de caprilinas

SILVA, S.A.B.; ARAUJO, M.C.E.; RACT, J.N.R.; VITOLO, M.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.120, n.1, p.711-717, abril/2015

RESUMO: Monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) são surfactantes não iônicos com grande aplicação alimentícia, farmacêutica e em outras indústrias químicas, Podem ser produzidos por alcoólise, esterificação ou hidrólise parcial de triacilgliceróis, utilizando de preferência lipase ao invés de catalisadores químicos, obtendo lipídeos mais puros e menos degradados. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é um método muito utilizado para estudar as propriedades térmicas de muitos materiais, incluindo diversas classes de lipídeos. Nesta área, entretanto, o uso de DSC tem sido geralmente limitado à análise dos perfis térmicos de óleos e gorduras, bem como das características dos produtos de reações de interesterificação. Portanto, este estudo relata o comportamento de cristalização e fusão de padrões cromatográficos de monocaprilina (MC), dicaprilina (DC) e tricaprilina (TC), assim como de misturas binárias de MC e DC nas proporções (p/p) 2:1, 1:1 e 1:2, respectivamente, com o objetivo de propor o uso de DSC como primeiro passo para monitorar reações de esterificação ou hidrólise para produção de MAG e DAG, como também os posteriores e indispensáveis processos de purificação. É importante ressaltar que pouco é conhecido sobre o comportamento físico de MAG e DAG de ácido caprílico aqui apresentado. As notáveis diferenças entre os comportamentos dos padrões e misturas binárias durante o resfriamento e aquecimento podem ser provavelmente atribuídas a interações entre moléculas por ligações químicas fracas como ligação de hidrogênio, força de van der Waals ou interações hidrofóbicas, além de transição de fase ou polimorfismo. Este estudo indica que DSC pode ser uma ferramenta interessante para fornecer informações importantes sobre a evolução da reação catalítica, a qual deverá ser complementada por outras técnicas para fornecer uma descrição completa da reação estudada.

Palavras-chave: monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina, glicerol, comportamento térmico.

Differential Scanning Calorimetry study on caprylins

SILVA, S.A.B.; ARAUJO, M.C.E.; RACT, J.N.R.; VITOLO, M.

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v.120, n.1, p.711-717, abril/2015

ABSTRACT: Monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) are nonionic surfactants with several applications in the food, pharmaceutical and other chemical industries. They can be produced by alcoholysis, esterification or partial hydrolysis of triacylglycerols, alternatively using lipase instead of chemical catalysts, generating purer and less degraded lipids. Differential Scanning Calorimetry (DSC) is a widespread method extensively used for studying the thermal properties of several materials, including the various classes of lipids. In this field, however, the use of DSC has generally been limited to the analysis of the thermal profiles of fats and oils, as well as the characteristics of interesterification reaction products. Therefore, the present study reports the melting and crystallization behavior of chromatographic standards of monocaprylin (MC), dicaprylin (DC) and tricaprylin (TC), as well as binary mixtures of MC and DC in proportions (w/w) of 2:1, 1:1 and 1:2, respectively, aiming to propose the use of DSC as a first step to monitor esterification or hydrolysis reactions for the production of MAG and DAG, as well as the subsequent indispensable purification procedures. It is worth to highlight that little is known about the physical behavior of MAG and DAG of caprylic acid presented herein. The remarkable differences between the behaviors of pure components and binary systems during cooling and heating can be possibly attributed to interactions between molecules by weak chemical bonds such as hydrogen bonds, van der Waals force or hydrophobic interactions, as well as phase transitions or polymorphism. This study indicates that DSC can be a valuable tool to supply important information on catalytic reaction evolution, which should be complemented by other techniques to provide a complete depiction of the reaction under research.

Keywords: monocaprylin, dicaprylin, tricaprylin, glycerol, thermal behavior.

1. INTRODUÇÃO

Monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) compostos por diferentes ácidos graxos são muito utilizados como surfactantes não iônicos com vasta aplicação, por exemplo, como emulsificantes e estabilizante nas indústrias alimentícia, farmacêutica, entre outras (ZONG, CHEONG, XU, 2014; ITABAIANA et al., 2013; FREITAS et al., 2008). Além disso, DAG são efetivos na prevenção do acúmulo de gordura corporal e distúrbios relacionados à obesidade (FELTES et al., 2012). Esses compostos podem ser obtidos por alcoólise, esterificação e hidrólise parcial de triacilgliceróis (TAG), mas atualmente são obtidos por glicerólise química contínua de óleos e gorduras a altas temperaturas (220- 250 °C) utilizando catalisadores inorgânicos alcalinos. Os produtos obtidos por esta rota exibem muitas desvantagens como coloração escura, baixo rendimento e formação de subprodutos (FELTES et al., 2012; FERNANDES, SOUZA, AZEREDO, 2012; SINGH, MUKHOPADHYAY, 2014).

Catalisadores enzimáticos destacam-se entre outros catalisadores devido às condições brandas de reação nas quais operam, levando a produção de lipídeos menos degradados e com menos impurezas. Consequentemente, os produtos são facilmente purificados (FELTES et al., 2012; DUAN, DU, LIU, 2013). Assim, o uso de lipases, tanto em sua forma solúvel quanto na forma imobilizada, tem sido estudado como alternativa ao método clássico para catalisar hidrólise de óleos e gorduras, levando à produção de MAG e DAG, consequentemente liberando ácidos graxos livres e glicerol (MOHAMMADI et al., 2014; GHATTAS et al., 2014). O rendimento da reação de esterificação e hidrólise enzimática pode ser monitorado quantificando o total de acilgliceróis através de métodos analíticos tradicionais como titulação de ácidos graxos com hidróxido de potássio (KOH) em solução alcoólica e cromatografia gasosa ou líquida, além de métodos alternativos como Ressonância Nuclear Magnética (NMR) (MELLO et al., 2008).

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é um dos métodos termo-analíticos mais utilizados para investigar o comportamento de fusão e cristalização de óleos e gorduras. Prova ser uma ótima ferramenta para determinar suas estabilidades oxidativa entre outras propriedades. KOSLOWSKA et al. (2014) utilizou método de DSC para avaliar a efetividade da adição do extratos aquoso-alcoólico de tomilho e alecrim em uma fração lipídica para ser adicionada em biscoitos. Os autores concluíram que esses temperos poderiam aumentar consideravelmente a resistência lipídica quanto à oxidação e melhorar características sensoriais no produto final. WIRKOWSKA et al. (2012) analisaram a estabilidade oxidativa

de gorduras extraídas de formulas infantis em pó. As amostras foram propositalmente oxidadas em um calorímetro de varredura diferencial sob uma atmosfera de fluxo de oxigênio e este estudo demonstrou que as gorduras extraídas a partir de amostras de aglomerados eram mais estáveis que as gorduras extraídas a partir das amostras iniciais de fórmulas infantis. Recentemente, na área de emulsificantes, MIZOBE et al. (2013) estudaram o perfil térmico de MAG e DAG de ácido oleico e palmítico e suas misturas, respectivamente, e relataram que os sistemas de misturas exibiram polimorfismo visto que, os modelos endotérmicos de DSC eram logo seguidos de picos exotérmicos.

Ao passo que muitos grupos de pesquisa já estudaram o perfil térmico de óleos e gorduras, assim como as características dos produtos advindos de interesterificação através de métodos de DSC, este não tem sido frequentemente utilizado para monitorar o progresso de reações de hidrólise e esterificação nem os seguintes processos de purificação necessários para refinar ou separar as diferentes classes de acilgliceróis. Na maioria dos casos, os perfis térmicos de DSC (curvas de fusão e/ou cristalização) foram apresentados como ilustrações para explicar a mudança de propriedades físicas de gorduras após reações de modificação como interesterificação (DANTHINE et al., 2014). DANTHINE et al. (2014) utilizaram o DSC como uma ferramenta para monitorar quantitativamente a interesterificação de óleo de palma catalisada por lipase. As alterações drásticas nas curvas de fusão indicaram que o DSC seria capaz de controlar as diferentes etapas que ocorrem durante a interesterificação. Além disso, ORTIZ (2001) e seus colaboradores analisaram a possível utilização de DSC como um método para estudar o processo de modificações de proteínas durante a hidrólise enzimática. Os autores referiram que o estudo dos produtos da reação de hidrólise é habitualmente efetuado por meio de diferentes tipos de cromatografia e eletroforese, mas o DSC mostrou ser uma ferramenta adequada para estudar as alterações estruturais sofridas pela proteína de soja durante a hidrólise enzimática, evidenciada pela mudança da temperatura máxima do pico, a ampliação dos picos endotérmicos e o calor envolvido durante a reação de desnaturação.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo propor o uso de calorimetria exploratória diferencial como uma valiosa ferramenta para o acompanhamento de reações de esterificação ou de hidrólise para a produção de mono e diacilgliceróis, bem como os procedimentos posteriores de purificação. Para este propósito, os comportamentos de fusão e cristalização de padrões cromatográficos de monocaprilina (MC), dicaprilina (DC) e tricaprilina (TC), bem como misturas binárias de MC e DC em proporções (p / p) de 2: 1, 1 : 1 e 1: 2, respectivamente, são aqui referidas como o primeiro passo para sugerir a utilização de

DSC como um método alternativo para indicar a presença destes compostos em reações envolvendo ácido caprílico (CA), glicerol e acilgliceróis como produtos resultantes. É importante ressaltar que pouco se sabe sobre MAG e DAG de ácido caprílico, embora estudos recentes tenham mostrado propriedades interessantes de MC, tais como antifúngica e atividade antibacteriana em materiais têxteis (VLTAVSKA et al., 2012), inativação de *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em alimentos e bebidas (CHANG, REDONDO-SOLANO, THIPPAREDDI, 2012; GARCIA et al, 2007) e atividade contra *Campylobacter jejuni* e *Cronobacter sakazakii* (MAROUNEK et al, 2012).. Por isso, esperamos também contribuir com informações inéditas, a nosso conhecimento, acerca de glicerídeos de ácido caprílico e suas misturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Padrões cromatográficos de MC, DC e TC (pureza 99%) foram adquiridos da AccuStandard[®], Inc. (New Haven, USA).

MC (I) e DC (II) foram dissolvidos individualmente em n-hexano a fim de obter soluções com concentrações de 2 g L⁻¹. Os sistemas binários de MC/ DC foram preparados misturando 5 ml de I e II (proporção de 1: 1), 3 mL de I e 6 mL de II (proporção de 1: 2) e 6 mL de I e 3 mL de II (proporção de 2: 1). Após agitação, cada sistema foi seco sob fluxo contínuo de nitrogênio gasoso puro.

O comportamento térmico das amostras secas foi observado em um calorímetro exploratório diferencial (DSC 4000, Perkin Elmer) equipado com um acessório de refrigeração mecânica (Intracooler SP, Perkin Elmer). Hélio foi utilizado como gás de purga a uma velocidade de fluxo de 20 ml min⁻¹. Amostras de, aproximadamente, 5 mg foram pesadas em recipientes de alumínio (50 ul), os quais foram então selados hermeticamente. Inicialmente, as amostras foram mantidas a 80 ° C durante 10 min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas de 80 ° C a -60 ° C a uma velocidade de 10 ° C min⁻¹, e mantida a esta temperatura durante 30 min. Finalmente, as amostras foram aquecidas a uma velocidade de varrimento de 5 ° C min⁻¹ até 80 ° C e mantidas durante 5 min, seguindo o Método Oficial da AOCS Cj 1-94 (1998), com adaptações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 e a Figura 2 mostram os perfis de fusão e de cristalização de padrões de caprilinas obtidos por DSC. Durante o aquecimento, picos endotérmicos foram observados em 8,5 ° C [$\Delta H = 106,2 \text{ J g}^{-1}$] para TC, a 19 ° C [$\Delta H = 272,9 \text{ J g}^{-1}$] para DC, e em 31 ° C [$\Delta H = 83,1 \text{ J g}^{-1}$] para MC. Além disso, ocorreram picos exotérmicos a -20 ° C [$\Delta H = -19,2 \text{ J g}^{-1}$] para TC e a 5,5 ° C [$\Delta H = -1,5 \text{ J g}^{-1}$] para DC (Figura 1). O resfriamento da MC levou à formação de três picos exotérmicos a 1.65 ° C [$\Delta H = -6,81 \text{ J g}^{-1}$], -14 ° C [$\Delta H = -24,2 \text{ J g}^{-1}$] e -17 ° C [$\Delta H = -62,8 \text{ J g}^{-1}$], um pico acentuado de DC a -8 ° C [$\Delta H = -76,5 \text{ J g}^{-1}$] e um pico duplo no intervalo de -39 a -47 ° C para TC (Figura 2). O comportamento de fusão das caprilinas corrobora com o estado da matéria em que são comumente encontrados em temperatura ambiente, isto é, sólida para MC e líquido para DC e TC. No entanto, a cristalização, um processo no qual as moléculas tendem a se agregar, - claramente o contrário da fusão, em que as moléculas se dissociam - de MC apresentou um comportamento mais complexo (três picos exotérmicos) do que para a DC e TC. Interessante notar que TC não cristalizou, pelo menos, até à temperatura de -40 ° C.

Figura 1. Curvas de DSC mostrando curvas de fusão de MC (a) DC (b) e TC (c)

Figura 2. Curvas de DSC mostrando as curvas de cristalização de MC (a) DC (b) e TC (c)

A Figura 3 e a Figura 4 representam, respectivamente, os perfis de DSC de fusão e cristalização das misturas de MC e DC nas proporções de 1: 1, 1: 2, e 2: 1. A oscilação das curvas para os sistemas binários MC / DC ocorreu de $-4,6^{\circ}\text{C}$ a 28°C durante a fusão (Figura 3), enquanto que durante a cristalização as curvas oscilam num intervalo mais estreito entre -30°C e -24°C (Figura 4). Os valores de entalpia relacionados com cada pico indicados na Figura 3 são apresentados na Tabela 1.

Figura 3. Curvas de fusão de misturas binárias de MC/DC nas proporções de 1:1 (a) 1:2 (b) e 2:1 (c)

Tabela 1. Entalpia, expressa em J g^{-1} , associado a cada pico (1 a 7) indicado nas Figuras 3 e 4. Proporções de MC/DC foram 2:1, 1:2 e 1:1

Peak n. M/D Ratio	Peak enthalpy (J/g)		
	2:1	1:2	1:1
1	2.7	5.8	2.8
2	32.3	7.1	9.9
3	38.0	3.4	4.9
4	27.0	1.0	-
5	1.1	-	-
6	-13.4	2.9	87.7
7	-77.7	-8.1

Figura 4. Curvas de cristalização das misturas binárias de MC/DC nas proporções de 1:1(a), 1:2 (b) e 2:1 (c)

Os pontos de fusão de MC, DC e TC observados na Figura 1 são muito semelhantes aos encontrados na literatura publicada (BUDAVARI, 1997), o que permite supor que o DSC seria um método adequado para indicar a presença desses acilgliceróis. Além disso, o método de DSC permite avaliar o comportamento de acilgliceróis sob aquecimento de uma maneira mais simples do que através de dilatométrica, espectros de infravermelho, difração de raios-X, entre outros métodos de medição (VLTAVSKÁ et al., 2012).

A partir da Figura 1 vê-se claramente que a curva de TC apresentou um vale perto de -20 °C, o que indica uma possível transição polimórfica (CRAVEN, LENCKI, 2013). DC apresentou um vale estreito perto de 5,5 °C, o que também pode estar associado ao polimorfismo, enquanto que o MC não apresentou. De qualquer forma, o ponto de fusão elevado de MC indica que um arranjo torcido entre as suas moléculas levou, provavelmente, à formação de uma estrutura cristalina, o que lhe confere um caráter sólido à temperatura ambiente, como geralmente observado. Por outro lado, em relação ao DC e TC, tal disposição seria menos intensa, de modo que ambas as substâncias estão no estado líquido à temperatura ambiente.

A Figura 5 apresenta as estruturas moleculares de todas as possíveis caprilinas. Tomando suas estruturas em conta, supomos que suas moléculas podem interagir através de um conjunto de ligações químicas fracas (ligação de hidrogênio, van der Waals e interações

hidrofóbicas). Desse modo, as moléculas de MC podem interagir através de ligações de hidrogênio mais intensamente do que moléculas DC e TC, nas quais van der Waals e interações hidrofóbicas predominariam sobre ligações de hidrogênio. Da mesma forma, os diferentes perfis de cristalização de caprilinas apresentados na Figura 2 não são surpreendentes, se levarmos em conta essas diferenças estruturais. A TC não cristalizou até -40 °C, enquanto que DC cristalizou a -8 °C e MC exibiu três picos de cristalização.

No que diz respeito a MC, embora o padrão é rotulado como puro, provavelmente seria uma mistura de dois isômeros posicionais, nomeados 1-MC e 2-MC, respectivamente, moléculas quirais e aquirais. Isto ocorre porque o esqueleto de glicerol tem um estereocentro (ligado à quiralidade) e três grupos hidroxila, com diferenças de força - relacionada com o aparecimento de três polimorfos, pelo menos, principalmente quando a temperatura do sistema é alterada (CRAVEN, LENCKI, 2013). Por isso, o pico exotérmico que ocorreu a 1,65 °C seria associado ao comportamento eutético (formação de uma mistura mecânica que conduz a um conglomerado de moléculas) entre enantiômeros metaestáveis de um tipo de polimorfo, enquanto que os dois outros picos de cristalização podem resultar tanto da cristalização separada de 1-MAG e 2-MAG quanto da solidificação da mistura racêmica e polimorfos puros. Além disso, a entalpia relacionada com cada um dos três picos, que foram iguais a $-6,81 \text{ J g}^{-1}$, $-24,2 \text{ g de J}^{-1}$ e $-62,8 \text{ g J}^{-1}$, pode ser associada com a quantidade e os tipos de ligações químicas fracas envolvidas para aglomerar os vários tipos de estereoisômeros (enantiômeros e/ou formas polimórficas) à medida que a temperatura diminuiu. Provavelmente, a alta entalpia determinada a -17 °C ocorreu devido ao somatório dos vários tipos de ligações fracas (ligação de hidrogênio, van der Waals, dipolo-dipolo induzido e interações hidrofóbicas).

DC cristalizou entre -1,5 °C e -11 °C, com um pico a -8 °C (Figura 2). De acordo com o fornecedor, a amostra era constituída por 1,3-DC, de modo que apenas duas formas polimórficas estão associadas com ele, de acordo com CRAVEN & LENCKI (2013). À medida que o composto tem duas moléculas de CA, neste caso, nenhuma quiralidade é observada (Figura 5). Desse modo, a associação de moléculas 1,3-DC moléculas para formação de cristais é devido, principalmente, ao estabelecimento de ligações químicas fracas além das ligações de hidrogênio. Uma vez que o 1,3-DC tem apenas um grupo hidroxila - localizado no átomo de carbono 2 da espinha dorsal de glicerol - o número de possíveis ligações de hidrogênio é mínima, ou seja, uma ligação de hidrogênio é estabelecida por

molécula, quer intra 1,3-DC ou inter 1,3-CC (Figura 5). A largura do vale é provavelmente devido à solidificação lenta e acomodação dos dois polimorfos dentro das redes cristalinas.

TC, por sua vez, não mostrou qualquer tendência para a cristalização quando a temperatura foi diminuída até $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2), ao contrário do que é observado para triacilgliceróis constituídos por ácidos graxos que tem dez ou mais átomos de carbono na sua espinha dorsal (CRAVEN, LENCKI, 2013). Tais triacilgliceróis podem apresentar quiralidade se as moléculas apresentam, pelo menos, dois ácidos graxos diferentes e/ou duas formas polimórficas estáveis. Considerando a estrutura molecular de TC (Figura 5), é evidente que a molécula não pode corresponder com as três regras relacionadas à estabilização das estruturas polimórficas dos triacilgliceróis em geral, que são (CRAVEN, LENCKI, 2013): a) empacotamento da cadeia alifática a partir das interações moleculares entre cadeias de ácidos graxos saturados e insaturados; b) conformação do glicerol entre os grupos glicerol determina a configuração total (reta ou dobrada) da molécula de triacilglicerol; c) empilhamento de metilas terminais podem desempenhar papéis importantes em organizar a inclinação da cadeia e estruturas do comprimento da cadeia.

O peculiar comportamento quanto à cristalização apresentado pela TC resultaria do alto caráter hidrofóbico da molécula. Interações intermoleculares hidrofóbicas podem fortemente atar as moléculas TC, levando ao aparecimento de uma viscosidade intrínseca, - propriedade física de um fluido que lhe permite desenvolver e manter certa quantidade de tensão de cisalhamento dependente da velocidade do fluxo e, em seguida, para oferecer resistência contínua ao fluxo - que evita novos rearranjos estruturais de moléculas, tais como a formação de estrutura cristalina. À medida que a temperatura diminui o líquido torna-se mais e mais viscoso até que a resistência ao fluxo atinge um máximo, uma condição em que a substância se torna amorfa.

A fim de aumentar o efeito de formação/destruição de ligações químicas fracas sobre o comportamento de MC e DC contra o aumento (fusão) ou diminuição (cristalização) de temperatura por DSC, misturas de MC/DC em proporções de 1: 1, 1: 2 e 2: 1, foram preparadas. As curvas de fusão e de cristalização são mostradas na Figura 3 e a Figura 4, respectivamente.

Figura 5. Estruturas moleculares de caprilinas: 1-MC (a), 2-MC (b), 1,3-DC (c), 2,3-DC (d), TC (e), glicerol (f). Símbolos R representam o radical heptil $[-(\text{CH}_2)_6\text{-CH}_3]$ e as ligações éster são indicadas em cinza.

Por um lado, a Figura 3 - que mostra as curvas de fusão das misturas MC/DC obtidos aumentando a temperatura de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - revela que o número e intensidade dos picos aumentaram à medida que a proporção de MC e DC na mistura variou de 1: 1, 1: 2 e 2: 1, respectivamente. Entalpias dos picos 2-4 da mistura 2: 1 variaram de $27,0\text{ J g}^{-1}$ a $38,0\text{ J g}^{-1}$, significativamente maior do que para as proporções 1: 2 e 1: 1 (Tabela 1). Por outro lado, pode ser observado a partir da Figura 4 em que são mostradas as curvas de cristalização para as misturas MC/DC obtidas através da mudança de temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - que, em todas as proporções de MC e DC estudadas dois vales com diferentes valores de entalpia foram formados, com valores mais elevados observados para a proporção 2: 1 (Tabela 1).

Sem dúvida, os resultados obtidos para os sistemas binários MC/DC estão ligados à ideia anterior evocando o estabelecimento de vários tipos de ligações químicas fracas entre as moléculas de caprilinas. No entanto, a ocorrência de vários picos nas curvas de fusão, mas apenas dois vales nas curvas de cristalização merece uma explicação. O esqueleto de glicerol é constituído por três átomos de carbono ligados por ligações σ (Figura 5). Como é bem conhecido, os átomos de carbono ligados por este tipo de ligação tem rotação livre em torno da ligação simples carbono-carbono que conduz ao aparecimento de duas conformações

opostas – as chamadas conformação eclipsada e conformação alternada (Figura 6). Entre estas conformações (definida como diferentes arranjos de átomos que podem ser convertidos em um ou outro por rotação em torno de ligações simples) existe uma infinidade de conformações intermédias, que são chamados "conformações de inclinação" (MORRISON, BOYD, 1969).

Uma vez que a molécula de glicerol pode assumir qualquer conformação entre as formas eclipsada e alternada, qualquer molécula passa a maior parte do tempo na conformação mais estável, isto é, na alternada, porque, neste caso, a aglomeração de grupos químicos (hidroxilas e metoxilas) é mínima (Figura 6). Em outras palavras, a energia potencial da molécula é mínima para a conformação alternada, aumenta com a rotação, e atinge um máximo na conformação eclipsada. A energia necessária para girar a molécula de glicerol em torno da ligação C1-C2 ou C2-C3 é chamada de energia torcional. Quando uma hidroxila (no caso de MC) ou duas hidroxilas (no caso de DC) estão ligadas ao CA por ligações éster, outros fatores que afetam a estabilidade relativa das conformações aparecerem: van der Waals, ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e interações hidrófobas. Deve recordar-se que a força de torção e o aparecimento de ligações químicas fracas são devido à aglomeração no esqueleto de glicerol com grupos de alto peso molecular. Desse modo, quando ocorre a fusão da mistura MC/DC durante a análise de DSC, a energia transferida para o sistema através do aumento da temperatura promove uma separação progressiva das moléculas de MC e DC, que certamente envolve a ruptura das ligações químicas fracas e grande força torcional interna e intermolecular, as quais são expressas como vários picos ao longo da curva de fusão (Figura 3). Por outro lado, durante a cristalização - no qual o calor é removido do sistema - apenas as conformações mais estáveis de moléculas isoladas e/ou associadas prevalecem assim, curvas com um baixo número de vales são alcançados (Figura 4). Provavelmente, a razão MC/DC 2: 1 levou a picos mais definidos pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio, devido à alta proporção de MC na mistura, oprimido quaisquer outros tipos de interações.

Figura 6. Exemplos de projeções de Newman para glicerol e caprilinas. A, B, C, D, E e F representam as conformações alternadas enquanto que, A1, B1, C1, D1, E1 e F1 representam as conformações eclipsadas, respectivamente, para glicerol, MC, DC e TC. O átomo de oxigênio foi realçado em cinza, cinza escuro e cinza claro a fim de mostrar em qual átomo de carbono no esqueleto de glicerol (veja Figura 5) o grupo hidroxila e/ou a ligação éster estão unidos, isto é, C1, C2 e C3, respectivamente.

Os dados apresentados apontam para a viabilidade do DSC como um método para indicar a presença de caprilinas. A identificação de MC, DC e TC - hoje em dia amplamente empregados na indústria - no meio de reação é importante para prosseguir com a esterificação do glicerol com ácido caprílico catalisada por enzimas lipolíticas, na medida em que estas enzimas, devido às suas altas especificidades, catalisam a formação do ligações éster uma por

vez até que a terceira molécula tenha sido introduzida. Desse modo, parar a reação num momento desejado (acúmulo de MC, por exemplo) é uma maneira prática para controlar o processo de esterificação.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o DSC seria uma ferramenta adequada para evidenciar a presença de caprilinas em meio reacional, abrindo a possibilidade de controlar a reação de esterificação entre ácido caprílico e glicerol catalisada por lipases. Assim como no caso de outras técnicas, estes resultados devem ser complementados por outros métodos a fim de fornecer uma descrição completa da reação sob investigação. Os picos endotérmicos e exotérmicos formados durante a fusão e a cristalização podem estar relacionados com as diferentes conformações assumidas pelas moléculas caprilinas, levando ao que a literatura denomina de polimorfismo, como uma consequência da rotação livre das ligações σ localizadas entre C1-C2 e C2-C3 de o esqueleto de glicerol. A permanência das conformações mais estáveis depende da criação de ligações químicas fracas entre os radicais heptil e hidroxila pertencentes às estruturas moleculares das caprilinas.

5. REFERÊNCIAS

- AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**. 5th ed. Champaign: Illinois, 1998.
- BUDAVARI, S. editor. **The Merck Index**. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories; 1997.
- CHANG, S.S; REDONDO-SOLANO, M; THIPPAREDDI, H. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.1, p.141-146, 2010.
- CRAVEN, R.J; LENCKI, R.W. Polymorphism of Acylglycerols: A Stereochemical Perspective. **Chemical Reviews**, v.113, n.10, p.7402-7420, 2013.
- DANTHINE, S; CLERQC, N.D; DEWETTINCK, K; GIBON, V. Monitoring batch lipase catalyzed interesterification of palm oil and fractions by differential scanning calorimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.115, n.3, p.2219-2229, 2014.
- DUAN, Z.Q; DU, W; LIU, D.H. Improves synthesis of 1,3 diolein by novozym 435-mediated esterification of monoolein with oleic acid. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.89, p.1-5, 2013.
- FELTES, M.M.C; OLIVEIRA, D.; BLOCK, J.M; NINOW, J.L. The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.1, p.17-35, 2012.

- FERNANDES, J.L.N; SOUZA, R.O.M.A; AZEREDO, R.B.V. ^{13}C NMR quantification of mono and diacylglycerols obtained through the solvent-free lipase-catalyzed esterification of saturated fatty acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.50, n.6, p.424-428, 2012.
- FREITAS, L; BUENO, T; PEREZ, V.H; CASTRO, H.F. Monoglicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1514-1521, 2008
- GARCIA, M; AMALARADJOU, M.A.R; NAIR, M.K.M; ANNAMALAI, T; SURENDRANATH, S; LEE, S; HOAGLAND, T; DZUREC, D; FAUSTMAN, C; VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1594-1599, 2007.
- GHATTAS, N; ABID, FI; GALAI, S; MARZOUKI, M.N; SALAH, A.B. Monoolein production by triglycerides hydrolysis using immobilized *Rhizopus oryzae* lipase **International Journal of Biological Macromolecules**, v.68, p.1-6, 2014.
- ITABAIANA Jr. I; GONÇALVES, K.M; CORDEIRO, Y.M.L; ZOUMPANIOTI, M; LEAL, I.C.R; MIRANDA, L.S.M; SOUSA, R.O.M.A; XENAKIS, A. Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis., **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v.96, p.34-39, 2013.
- KOZLOWSKA, M; ZBIKOWSKA, A; GRUCZYNSKA, E; ZONTALA, K; PÓLTORAK, A. Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.118, n.3, p.1697-1705, 2014.
- MAROUNEK, M; PUTTHANA, V; BENADA, O; LUKEŠOVÁ, D. Antimicrobial activities of médium chain fatty acids and monoacylglycerols on *Cronobacter sakazakii* DBM 3157T and *Cronobacter malonaticus* DBM 3148 . **Czech Journal of Food Sciences**, v.30, n.6, p.573-580, 2012.
- MELLO, V.M; OLIVEIRA, F.C.C; FRAGA, W.G; NASCIMENTO, C.J; SUAREZ, P.A.Z. Determination of the content of fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel samples obtained by esterification using ^1H -NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.46, n.11, p.1051-1054, 2008.
- MIZOBE, H; TANAKA, T; HATAKEYAMA, N; NAGAI, T; ICHIOKA, K; HONDOH, H; UENO, S; SATO, K. Structures and Binary Mixing Characteristics of Enantiomers of 1-Oleoyl-2,3-dipalmitoyl-sn-glycerol (S-OPP) and 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-sn-glycerol (R-PPO). **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.90, n.12, p.1809-1817, 2013.
- MOHAMMADI, M; HABIBI, Z; DEZVAREI, S; YOUSEFIC, M; SAMADI, S; ASHJARI, M. Improvement of stability and selectivity of *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on silica nanoparticles: selective hydrolysis of fish oil using immobilized preparations. **Process Biochemistry**, v.49, n.8, p. 1314-1323, 2014.
- MORRISON, R.T; BOYD, R.N, editors. **Organic Chemistry**. Allyn and Bacon, Inc, Boston, 1969.
- ORTIZ, S.E.M; AÑÓN, M.C. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolates. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.66, n.2, p.489-499, 2001.
- SINGH, A.K; MUKHOPADHYAY, M. Optimization of lipase-catalyzed glycerolysis for mono and diglyceride production using response surface methodology. *Arabian Journal of Science and Engineering*, v.39, n.4, p. 2463-2474, 2014.

- VLTAVSKA, P; KASPARKOVA, V; JANIS, R; BUNKOVA, L. Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.114, n.7, p.849-856, 2012.
- ZHONG, N; CHEONG, L.Z; XU X. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.116, n.2, p.97-107, 2014.
- WIRKOWSKA, M; LIGEZA, E.O; GÓRSKA, A; KOCZON, P. Thermal properties of fats extracted from powdered baby formulas. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.110, n.1, p.137-143, 2012.

CAPÍTULO 3

Síntese de acilgliceróis de ácido caprílico em reator do tipo batelada munido ou não de membrana de microfiltração utilizando lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* como biocatalisador

RESUMO: Acilgliceróis são surfactantes não iônicos que podem ser sintetizados utilizando lipase como biocatalisador acarretando em lipídios mais puros e menos degradados. Este primeiro estudo teve como objetivo a síntese de acilgliceróis através da esterificação de ácido caprílico e glicerol utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM[®]) como biocatalisador. Os efeitos das condições reacionais, a saber, temperatura (30 – 70°C) e proporção molar ácido caprílico/glicerol (2:1 – 6:1) foram analisadas utilizando um planejamento experimental fatorial composto por dois fatores, dois níveis e três pontos centrais. A Metodologia de Superfície de Resposta foi aplicada a fim de atingir a melhor combinação dos parâmetros reacionais. O tempo de reação foi fixado em 6 horas e as sínteses ocorreram em um reator descontínuo convencional operado a pressão reduzida e com controle de temperatura. O rendimento foi calculado através da quantidade de ácidos graxos livres por método de titulação. A identificação de caprilinas e composição total em acilgliceróis foram obtidas através de método de cromatografia gasosa. Os resultados mostraram que, quando as reações ocorreram na razão molar ácido caprílico/glicerol 2:1 e à temperatura de 50 ° C, o rendimento mais elevado foi atingido (87,8%). Na condição mais desfavorável (razão molar ácido caprílico/glicerol 2,58:1 à temperatura de 64 ° C) apenas 6,3% de conversão de ácido caprílico foi alcançada. Análise de variância (ANOVA) revelou que o modelo aplicado foi estatisticamente significativo. Os parâmetros da reação afetaram fortemente a síntese de acilgliceróis.

Palavras-chave: acilglicerois, glicerol, biocatalisador, planejamento experimental.

Synthesis of acylglycerols of caprylic acid in batch reactor fitted with or without microfiltration membrane using *Rhizomucor miehei* immobilized lipase as biocatalyst

ABSTRACT: Acylglycerols are nonionic surfactants that can be synthesized using lipase as biocatalyst resulting in more pure and not degraded lipids. This first study aimed to glycerides synthesis by esterification of caprylic acid and glycerol using lipase of *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM[®]) as biocatalyst. The effects of the reaction conditions, i.e., temperature (30 - 70 ° c) and molar ratio caprylic / glycerol acid (2:1 - 6:1) were analyzed using a factorial design consisting of two factors, two levels and three central points. Response surface methodology was applied in order to achieve the best combination of reaction parameters. The reaction time was set at 6 hours and synthesis occurred in a conventional batch reactor under reduced pressure and temperature control. The yield was calculated from the amount of free fatty acids by titration method. Caprylins identification and the total glycerides composition were obtained by gas chromatography method. The results showed that when the reactions occur in the molar ratio caprylic acid / glycerol 2:1 and at a temperature of 50°C, the highest yield was achieved (87.8%). In the most unfavorable condition (molar ratio caprylic acid / glycerol 2.58: 1 64 °C) only 6.3% of caprylic acid conversion was achieved. Analysis of variance (ANOVA) showed that the applied model was statistically significant. The reaction parameters strongly affected the glycerides synthesis.

Key-words: acylglycerols, glycerol, biocatalyst, experimental design.

1. INTRODUÇÃO

Acilgliceróis são importantes emulsificantes com ampla utilização em diversos setores industriais (BLANCO et al., 2015). Podem ser produzidos por catálise química ou enzimática, sendo que esta última apresenta vantagens como menor consumo energético, pouca ou ainda inexistência de formação de subprodutos e a possibilidade de se trabalhar em condições reacionais brandas de pH e temperatura, evitando assim alguns problemas como coloração escura dos produtos de interesse (FERNANDES, SOUZA, AZEREDO, 2012; SINGH, MUKHOPADHYAY, 2014; SOLAESA et al., 2016). Para minimizar os custos ao empregar enzimas como catalisadores e fazer com que os processos enzimáticos sejam mais competitivos financeiramente com a tecnologia química, pode-se adotar o método de imobilização enzimática em diferentes suportes, permitindo a reutilização da enzima e aumento de sua atividade catalítica e estabilidade operacional (DUARTE et al., 2015; ROMDHANE et al., 2013). Rotas como glicerólise, interesterificação, hidrólise e alcoólise de triacilgliceróis e esterificação de ácidos graxos com glicerol podem ser utilizadas para a síntese desses emulsificantes (NAIK et al., 2014; REMONATTO et al., 2015; ZHONG, CHEONG, XU, 2014;). O emprego do glicerol nestas reações torna-se muito interessante visto que o aumento da produção de biodiesel tem gerado grandes quantidades desse poliálcool (AGUIEIRAS et al., 2014). Dessa forma, tais rotas catalíticas acabam transformando um subproduto sem grande valor comercial em produtos de alto valor agregado (HERRERO et al., 2016; ZHONG, CHEONG, XU, 2014).

Além do uso de biocatalisadores, estas substâncias podem ser produzidas em reatores em regime contínuo ou batelada, sendo que a forma contínua, quando em produção de grande escala, pode apresentar vantagens como melhor controle do processo, alta produtividade, aumento de pureza e rendimento do produto, diminuição de custo no produto final (JUNIOR et al., 2012; SEVERAC et al., 2011). Os reatores do tipo batelada são a forma de tecnologia mais comum usada em processos enzimáticos. O reator batelada possui uma configuração simples, sendo basicamente um tanque equipado com um controle de temperatura e sistema de agitação, permitindo que as partículas de biocatalisador sejam dispersas na solução de substrato (POPPE et al., 2015). A escolha de uma configuração apropriada junto com as condições operacionais são aspectos importantes que permitem que processos enzimáticos resultem em alta produtividade (SAPONGIC et al., 2010).

Biorreatores podem ser equipados com membranas de filtração, as quais permitem a retenção completa das partículas em suspensão, eliminando a necessidade de uma etapa secundária de purificação (SANTOS, F., 2015). A membrana utilizada nos processos de separação é um material altamente permeável a alguns dos seus componentes e menos permeável aos outros existindo duas formas distintas de operação: frontal (“dead- end filtration”) ou tangencial também chamado de filtração de fluxo cruzado (cross-flow filtration). A filtração frontal é um processo descontínuo, pois com o decorrer do processo o material suspenso contido no material de alimentação será retido na superfície da membrana, aumentando assim a resistência à transferência de massa. Já na filtração tangencial, a corrente de alimentação passa em paralelo pela superfície da membrana, em vez de perpendicularmente à mesma. Este fluxo ajuda a minimizar o acúmulo de sólidos sobre a membrana, mantendo desta forma a superfície limpa (BERLOTTO, 2015; DAVIS, 2010; KUCERA, 2010). Existem diversos tipos de processos de separação como microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, sendo que a diferença está no material de composição (polipropileno, acrilonitrilo, polisulfona, poliamida e etc) e configuração das membranas (espiral, fibra oca, e placa plana) (SCHNEIDER, TSUTIYA, 2001).

Os processos biocatalíticos fornecem vantagens específicas de químico, regio, enantiosseletividade em comparação a conversões químicas. Além disso, os processos biocatalíticos que utilizam enzimas isoladas ao invés de células completas reduzem a complexidade dos processos downstream de produção de uma substância (MARZUKI et al., 2015; PREEZ et al., 2015).

Uma forma de aprimorar uma reação é fazer uso de um planejamento experimental e através de ferramenta estatística obter dados e extrair conclusões valiosas sobre o experimento. A fim de obter um bom planejamento experimental, deve-se projetá-lo de acordo com o tipo de informação que queremos obter. (NETO, SCARMINIO, BRUNS, 1996).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi sintetizar acilglicerois derivados de ácido caprílico, utilizando lipase de *Rhizomucor miehei* comercial imobilizada *sn*-1,3- específica, adotando um planejamento experimental do tipo composto central rotacional constituído por 2 variáveis e 2 níveis. A abordagem experimental foi utilizar o delineamento composto central e a metodologia de superfície de resposta para encontrar as melhores condições reacionais que resultassem nos maiores rendimentos em caprilinas. Os parâmetros reacionais incluindo temperatura e proporção molar entre os reagentes foram analisados a fim de estabelecer uma

relação entre eles e o rendimento em produtos. Além dessas comparações, foi investigada a estabilidade operacional do biocatalisador quando reaproveitado em repetidas bateladas, em reator munido ou não de membrana de microfiltração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Para a síntese de acilgliceróis de ácido caprílico, foram utilizados glicerol e ácido caprílico (pureza $\geq 98\%$), (Fluka) como substratos para a produção de mono-, di- e tricaprilinas. A lipase comercial imobilizada Lipozyme RM IM (Novozymes) foi utilizada como catalisador da reação de esterificação. Membrana de microfiltração (Millipore[®]) foi utilizada para avaliar o reuso do biocatalisador. Todos os reagentes e solventes necessários para a realização dos experimentos são de grau analítico.

2.2 Reação de esterificação e análise dos produtos

As reações de esterificação em reator descontínuo convencional foram realizadas em um balão de fundo redondo munido de três bocas com capacidade de 100 mL. A reação de síntese enzimática de caprilinas foi preparada misturando ácido caprílico com glicerol, totalizando 50 g, seguido da adição da lipase imobilizada (10% em relação ao peso de substrato). Não houve adição de solventes ao sistema. O balão foi acoplado a um sistema de vácuo por bomba para remover a água e evitar a oxidação dos reagentes, de modo que a reação ocorreu à pressão reduzida, controle de temperatura através de banho de água e agitação magnética. A proporção entre os componentes da mistura e temperaturas de reação foram definidos de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 1.

Ao final de cada reação, o conteúdo do reator foi filtrado em papel de filtro com auxílio de bomba de vácuo para a recuperação do biocatalisador. O filtrado foi homogeneizado em vórtex por aproximadamente 10 min e imediatamente depois, amostras de 5 g foram coletadas e transferidas para um funil de separação. A cada amostra foi adicionada uma mistura composta por 45 mL de éter de petróleo e 12 mL de ácido acético. Após agitação vigorosa, foram realizadas 3 lavagens sucessivas com 30 mL de água destilada cada. A fase aquosa (contendo glicerol) foi descartada e a fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador a 70 °C, por 20 min a 60 rpm (Figura 1) (FREITAS *et al.*, 2009).

Figura 1. Fluxograma de extração de caprilinas

Uma amostra da fase orgânica (0,1g) foi titulada com solução padrão de NaOH 0,1N utilizando fenolftaleína como indicador de ponto final para obter o valor do índice de acidez. Semelhante a WANG et al (2012), o rendimento da esterificação (em porcentagem) foi calculado através da concentração de ácido graxo consumido na mistura reacional e determinado através dos valores obtidos por titulação nas amostras antes e após esterificação, utilizando a Equação 1.

$$\text{Rendimento de esterificação (\%)} = \frac{V_o - V_i}{V_o} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que V_o representa o volume de NaOH gasto na titulação do meio reacional antes da esterificação e V_i o volume de NaOH gasto na titulação do meio reacional após a esterificação. Todas as determinações foram realizadas em duplicata e a média apresentada.

Tabela 1. Planejamento Experimental e resultados por DCCR

Experimento	Temperatura de reação (°C)	Proporção molar de ácido caprílico no substrato (%)	Rendimento de Esterificação (%)
1	35,82	2,58	78,29
2	64,18	2,58	11,93
3	35,82	5,42	48,37
4	64,18	5,42	25,82
5	30	4	53,85
6	70	4	13,46
7	50	2	92,55
8	50	6	40,44
9	50	4	55,13
10	50	4	56,41
11	70	4	52,56

2.3 Planejamento Experimental

Delineamento Composto Central Rotacional com duas variáveis independentes foi realizado para obter as ótimas condições para reação de esterificação. As variáveis e seus valores codificados e não codificados são apresentados na Tabela 2. Segundo RODRIGUES, IEMMA (2009), para um estudo que contempla 2 variáveis independentes, o DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) é considerado um tipo de planejamento experimental possível e que poderá resultar em informação de boa qualidade. Com este delineamento pode-se calcular os efeitos de cada variável e utilizar a metodologia de superfície de resposta (MSR). À semelhança de KOH et al. (2010), foi empregado um DCCR de 2 fatores (variáveis) e 2 níveis, sendo que o delineamento apresenta 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos (Tabela 1). As variáveis e os intervalos de trabalho selecionados para este planejamento foram os seguintes: temperatura de reação (30- 70°C) e proporção molar ácido caprílico:glicerol (2:1 a 6:1), o tempo de reação

foi fixado em 6 horas. As respostas em função dos valores de acidez foram analisadas por metodologia de superfície de resposta, utilizando o programa Statistica versão 9.0 (Statsoft), de forma a estabelecer condições de reação em que a produção de monocaprilina (Y_m) ou dicaprilina (Y_d) ou, ainda, a soma delas (Y_{md}) seja máxima.

Tabela 2. Níveis e variáveis avaliadas no Planejamento Experimental.

	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Variáveis					
Proporção molar (x_1)	2	2,58	4	5,42	6
Temperatura (x_2)	30	35,82	50	64,18	70

2.4 Recuperação da enzima em bateladas sucessivas

Lipozyme RM IM foi reutilizada por duas vezes em três bateladas sucessivas na melhor condição reacional (temperatura: 50 °C; proporção molar ácido caprílico/glicerol: 2:1; 10% de enzima em relação à massa total de substrato) tanto em reator descontínuo convencional quanto em reator descontínuo munido de membrana de microfiltração (Figura 2). Ao final de cada batelada, o biocatalisador retido na membrana de microfiltração ou filtro de papel foi lavado com água destilada para remover quaisquer resquícios de produtos ou reagentes. Após isso, o biocatalisador foi utilizado em uma nova reação.

Figura 2. (a) reator descontínuo munido de membrana de microfiltração (b) reator descontínuo convencional

2.5 Porcentagem total de acilgliceróis por Cromatografia Gasosa

Primeiramente, foram realizadas diversas corridas com padrões comerciais de monocaprilina, dicaprilina, tricaprilina e ácido caprílico a fim de analisar seus tempos de retenção e identificar seus respectivos picos.

Tricaprilina (TAG), dicaprilina (DAG), monocaprilina (MAG) e ácido caprílico (AC) foram identificados por cromatografia gasosa em cromatógrafo equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar CP Sil 5CB: 10 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro, contendo 0,12 μm de phenyl-methylpolysiloxane. As condições de análise foram: gás de arraste: hidrogênio, à vazão de 1,0 mL/min; injeção *split*, na razão de 20:1; temperatura do injetor: 350 °C; temperatura do detector: 350 °C; temperatura inicial da coluna: 80 °C por 1 minuto, programada até 320 °C à razão de 20 °C /min, mantendo-se constante por 2 minutos a 350 °C, totalizando 15 minutos de análise. A composição qualitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da temperatura de reação

O efeito da temperatura reacional sobre o rendimento foi estudado na faixa de 30 a 70 °C, adotando os melhores valores de rendimento nas proporções molares de ácido caprílico de 2; 2,58; 4 e 5,42. Como pode ser visto na Figura 3 o rendimento de esterificação subiu de

53,85% a 30 °C para 92,6% a 50 °C demonstrando que o aumento de temperatura tem grande influência no rendimento. Isto pode ser explicado pelo efeito da temperatura na atividade enzimática e afinidade da enzima pelo substrato (EOM et al, 2010). A elevação ideal de temperatura foi efetiva em melhorar a transferência de massa pelo aumento da atividade enzimática, solubilidade do substrato no meio reacional, elevação da energia cinética do sistema promovendo colisões efetivas entre enzima e moléculas do substrato. Entretanto, o rendimento caiu rapidamente após 50 °C, indicando provável desnaturação térmica da enzima. Esta desnaturação pode ser atribuída à destruição da conformação espacial e estrutural da enzima, quando submetida a temperaturas elevadas (MANAN et al., 2016; VERRI et al, 2016; WAN, 2015).

Figura 3. Efeito da temperatura sobre o rendimento de esterificação.

3.2 Efeito do tempo de reação

Para determinar o tempo ótimo de reação, as reações de esterificação em diferentes tempos (2 a 10 horas) foram realizadas fixando a temperatura em 50 °C e proporção molar de ácido caprílico/glicerol 2:1. Como demonstrado na Figura 4, o rendimento aumentou de 68,6% em duas horas para 92,81% em seis horas, permanecendo invariável até pelo menos 10h. Provavelmente a disponibilidade de um dos reagentes para a esterificação diminuiu quer por questão de quantidade presente no meio quer porque a hidroxila livre do diacilglicerol (DAG) tornar-se-ia menos reativa devido a efeitos estéricos e/ou redução do seu caráter ácido.

Em outras palavras, se a formação de 1,3-DAGs foi favorecida em relação à de 1,2-DAGs – a Lipozyme de *R. miehei* é de especificidade sn,1-3 – então a hidroxila da posição 2 do 1,3-DAG tornar-se-ia menos disponível à esterificação do que a hidroxila da posição 3 do 1,2-DAG (SILVA, et al, 2015).

Figura 4. Efeito do tempo sobre o rendimento.

Comparando com os resultados obtidos por SKORONSI et al (2014), que estudou a síntese de éster de ácido caprílico com 1-pentanol em reator de leito contínuo, o esgotamento do substrato e o equilíbrio de reação foram atingidos após 10 horas, com rendimento de 73,25% quando a temperatura foi fixada em 30 °C. A uma temperatura de 50 °C, o equilíbrio foi atingido após cinco horas de reação, com rendimento de 87,45%. Muitas razões podem explicar este fato: (a) a reação de esterificação ocorreu em um sistema com adição solvente. Isso diminui a concentração de substrato e aumenta a chance de ocorrer desnaturação enzimática (GARMROODI et al., 2016); (b) as reações foram conduzidas a menores temperaturas. Isso pode propiciar um aumento da viscosidade da mistura, diminuir a difusão e, assim, diminuir a acessibilidade dos reagentes ao sítio ativo da enzima (WAN et al., 2015); (c) As reações não ocorreram à pressão reduzida, assim a água formada durante a reação não foi removida, movendo o equilíbrio para os reagentes (WAN et al, 2015).

3.3 Reuso da enzima

Um das propriedades mais características das enzimas imobilizadas – daí a sua importância – é a possibilidade de recuperação e reuso do biocatalisador. Portanto, foi testado o reciclo da Lipozyme RM IM® em reações do tipo batelada em reator descontínuo convencional e em reator munido de membrana de microfiltração. Os resultados estão apresentados na Figura 5, que demonstra a estabilidade operacional da Lipozyme RM IM após sucessivas bateladas.

Pode-se notar que enquanto a enzima reteve 28,2% de sua atividade inicial quando as reações ocorreram em reator descontínuo convencional, em reator munido de membrana de microfiltração a retenção de atividade inicial foi de 82,7% após três ciclos de bateladas sucessivas. O reator convencional resultou em menor retenção de atividade devido à necessidade de esvaziar, filtrar a enzima e carregar novamente o reator antes de começar uma nova reação (MATTES et al, 2016). Tais procedimentos podem ter levado à perda gradual de quantidade de enzimas e, conseqüente perda de atividade. Tal fato não ocorreu no reator equipado com membrana, visto que o conteúdo do reator foi esvaziado por pressurização e a enzima ficou retida no interior do reator.

Figura 5. Estabilidade operacional da Lipozyme RM IM após sucessivas bateladas. (●) representa as reações em batelada conduzidas em reator descontínuo convencional. Todas as reações foram conduzidas na melhor condição experimental. (□) representa as reações em batelada realizadas em reator munido de membrana de microfiltração. Os resultados representam a média das duplicatas.

3.4 Planejamento experimental para melhores condições de síntese de caprilinas

Para obtenção das melhores condições de reação para produção de caprilinas foi aplicado um modelo fatorial completo (2^2) com os níveis +1 e -1, três pontos centrais (nível zero), em que as variáveis estudadas foram temperatura e proporção molar dos reagentes (ácido caprílico:glicerol).

Baseando-se a nos resultados de rendimento de esterificação, tais dados foram tratados no software Statística. Sendo assim, a resposta ao delineamento foi dada em função da avaliação quantitativa do rendimento em caprilinas, determinada através de titulação e equação descrita por WANG et al (2012).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada como ferramenta estatística para observar a influência dos dois fatores estudados (temperatura e proporção molar dos reagentes) sobre a produção de mono, di e tricaprilina.

Para que os efeitos calculados sejam estatisticamente significativos, o valor de p correspondente deve ser menor que 0,05 ao nível de significância de 95%. Portanto, os valores de p na Tabela 3 indicam que os fatores x_1 e x_2 do modo quadrático e as interações x_1x_2 não são estatisticamente significativas a 95% pois, estão fora do esperado com valores superiores a 0,05. Desta forma, apenas os fatores x_1 e x_2 do modo linear foram estatisticamente significativos. Nota-se que os fatores x_1 e x_2 no modo linear e o fator x_2 no modo quadrático afetam de forma negativa o rendimento de caprilinas, ou seja, o aumento na proporção de ácido caprílico diminui a produção de caprilinas por dois motivos prováveis: saturação do sítio catalítico da enzima com o substrato ácido caprílico e aumento da viscosidade do meio reacional com diminuição da eficiência do sistema de agitação para uma mistura homogênea entre ácido caprílico e glicerol, desta forma, baixa proporção de ácido caprílico mostrou uma melhor resposta.

Em relação à interação dos fatores, pelo valor de p superior a 0,05 ($p=0,125515$) revelou ser estatisticamente insignificante.

Outra possível explicação para que o aumento da proporção de ácido caprílico influencie negativamente a resposta rendimento expressa em índice de acidez seria a dificuldade de separação da fase caprilinas/ácido caprílico.

Tabela 3. Efeitos para os fatores e os erros padrão correspondentes para o rendimento

Fatores	Coeficiente	Erro Padrão	T calc (5)	Valor p	-95% limite confiança	95% limite confiança
Média	54,7403	6,88172	7,95444	0,000506	37,0502	72,4303
Efeitos principais						
x ₁ :temperatura (L)	-36,5669	8,43974	-4,33271	0,007480	-58,2619	-14,8719
x ₁ :temperatura (Q)	-25,6980	10,06607	-2,55293	0,051084	-51,5736	-0,7371
x ₂ :proporção (L)	-22,4474	8,44567	-2,65786	0,045000	-44,1577	33,2616
x ₂ :proporção (Q)	7,3260	10,08936	0,72612	0,500321	-18,6095	
Interações						
x ₁ x ₂	21,9050	11,91967	1,83772	0,125515	-8,7355	52,5455

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, utilizaram-se os dados da Tabela 4 sobre análise de variância.

A análise de variância (ANOVA) é útil para analisar a qualidade da aproximação gerada a partir de um conjunto de dados e requer a obtenção de alguns parâmetros estatísticos como a média e as somas dos quadrados dos desvios.

Para facilitar o entendimento da ANOVA, é necessário interpretar o significado de cada soma quadrática: Soma Quadrática da Regressão (SQ_R) representa a soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo em relação à média global; Soma Quadrática Residual (SQ_r) representa a soma das diferenças entre os valores observados e os valores previstos; Soma Quadrática Total (SQ_T) representa a soma dos desvios dos valores observados em relação à média global (CHAVES, 2008).

Num modelo bem ajustado, a Soma Quadrática Residual (SQ_r) deve ser pequena de forma que os valores observados e os valores previstos sejam próximos. Através da equação $SQ_T = SQ_R + SQ_r$, nota-se que isso equivale dizer que a Soma Quadrática Total (SQ_T) deve ser aproximadamente igual a Soma Quadrática da Regressão (SQ_R). A Soma Quadrática Residual (SQ_r) pode ser dividida em duas parcelas, assim: $SQ_r = SQ_{EP} + SQ_{FA}$, onde a Soma Quadrática devido ao erro puro (SQ_{EP}) fornecerá uma medida do erro aleatório, ou seja, do erro inerente aos experimentos, não tendo relação alguma com o modelo ajustado, já a Soma Quadrática devido a falta de ajuste (SQ_{FA}) fornece uma medida da falta de ajuste do modelo (CHAVES, 2008).

A Soma Quadrática Residual (SQ_R) do modelo apresentado, conforme os dados da Tabela 4, é obtida somando-se 7,69 (erro puro) com 702,99 (falta de ajuste). A Soma Quadrática da Regressão (SQ_R) pode ser obtida através da diferença entre a Soma Quadrática Total (SQ_T) e a Soma Quadrática Residual (SQ_R). A Média Quadrática é a Soma Quadrática dividida pelo Grau de Liberdade. O F calculado é a divisão da Média Quadrática de Regressão (MQ_R) pela Média Quadrática Residual (MQ_R).

Tabela 4. Análise de Variância do modelo

Efeito	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Valor F	Valor p
Modelo	5411,33	5	1082,27	7,61	0,0219
x_1 :temperatura (L)	2665,60	1	2665,60	18,75	0,0075
x_1 :temperatura (Q)	920,25	1	920,25	6,47	0,0516
x_2 :proporção (L)	1006,31	1	1006,31	7,08	0,0448
x_2 :proporção (Q)	75,41	1	75,41	0,53	0,4990
$x_1 x_2$	479,83	1	479,83	3,38	0,1256
Resíduos	710,68	5	142,14		
Regressão	5411,33				
Falta de ajuste	702,99	3	3,84	60,96	0,0162
Erro puro	7,69	2			
Total	6122,01	10			

Coeficiente de determinação: 0,8839

Desta forma, pode-se observar que o fator de maior relevância em nosso estudo foi temperatura de reação, visto que os valores de F obtidos tanto no modelo linear quanto no quadrático ($F=18,75$ e $F=6,47$, respectivamente) foram superiores ao F tabulado (3,88). Tais valores também podem sustentar a ideia de que se baseando nos valores de temperatura empregados no Planejamento Experimental, o modelo empregado é significativo com um nível de confiança de 95%.

O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação das respostas. Em geral, tal coeficiente é expresso em termos de porcentagem, ou seja, significa quanto em porcentagem os resultados podem ser explicados. De acordo com o R^2 obtido, cerca 88% dos resultados podem ser explicados pelo modelo empregado. O valor de R^2 (0,8839) fornecido pela análise de variância (ANOVA) aponta que o novo planejamento adotado foi mais significativo que o

anterior, visto que o primeiro apresentou um valor de $R^2 = 0,7847$. Entretanto, o valor do coeficiente de determinação obtido pode indicar que o modelo deve sofrer melhorias. Um fator que pode ter contribuído para um valor baixo de coeficiente de determinação foi o número reduzido de fatores (temperatura e proporção molar dos reagentes). Estudos recentes que empregaram a Superfície de Resposta como ferramenta estatística, consideraram cinco fatores (XU, X. *et al*, 1998; KOH, S.P. *et al*, 2010). De acordo com KOH e colaboradores (2010), a adição de mais fatores ao modelo estatístico sempre aumentará o valor de R^2 , mesmo se esse fator não for estatisticamente significativo. Dessa forma, seria possível que um modelo apresentasse um bom valor de coeficiente de determinação e mesmo assim poderia ser considerado inadequado.

Através da Análise de Variância pode-se notar que os dois fatores escolhidos foram estatisticamente significativos nos modelos linear e quadrático, com exceção ao fator temperatura no modelo quadrático. A interação entre os fatores não apresentou relevância estatística. Nota-se que a falta de ajuste do método não é significativa e que o planejamento adotado foi satisfatório e o modelo empregado bem ajustado, visto que os valores da Soma Quadrática de Regressão e a Soma Quadrática Total estão próximos, o que significa que a soma dos desvios das previsões feitas pelo modelo em relação à média global e a soma das diferenças entre os valores observados e previstos são mínimas. Isso pode ser confirmado pelo valor de F, indicando que o modelo não necessita de ajuste, mas pode sofrer melhorias a ponto de elevar o coeficiente de determinação.

Empregando a Superfície de Resposta buscou-se analisar as condições mais adequadas que maximizam o rendimento de caprilinas.

A Figura 6 mostra a superfície de resposta em função da temperatura reacional e proporções entre reagentes e seus efeitos sobre o rendimento. É possível observar que valores ideais seriam aqueles dentro da área vermelha, os quais corresponderiam a um valor de rendimento superior a 80%. Isto seria alcançado empregando baixas temperaturas e baixa proporção de ácido caprílico. Uma explicação possível seria que ao empregar grandes quantidades de substrato (ácido caprílico) o sítio ativo da enzima poderia ficar saturado e não mais disponível para realizar a atividade catalítica. De acordo com a literatura (GODFREY, WEST, 1996; SHAHANI, 1975), a temperatura ótima para atividade catalítica da lipase compreende a faixa entre 30 e 50 °C e acima de 70 °C a estabilidade da enzima é reduzida por mudanças em sua estrutura molecular.

Figura 6. Superfície de Resposta demonstrando a influência da temperatura e proporções entre reagentes sobre rendimento em caprilinas.

Os valores de rendimento observados e esperados são demonstrados como pontos na Figura 7. Analisando o gráfico, observamos que alguns valores obtidos experimentalmente estão pouco distantes da reta média. Apesar do planejamento experimental adotado não ter sido o mais adequado, tornou-se útil para nortear futuros trabalhos em relação à escolha dos fatores e dos valores mínimos e máximos que esses fatores poderiam adotar.

Figura 7. Valores preditos versus valores obtidos pelo modelo estatístico utilizado.

3.5 Porcentagem de acilgliceróis resultantes da reação de esterificação

A Tabela 5 mostra que o total de acilgliceróis (caprilinas) – determinado por cromatografia gasosa - resultantes da esterificação do glicerol com ácido caprílico variou entre 6,3% e 87,8% conforme variação da temperatura de reação (30°C – 70°C) e da proporção molar inicial ácido caprílico/glicerol (2:1 – 6:1). O maior percentual de caprilinas obtido (87,8%) ocorreu a 50°C e ácido caprílico/glicerol 2:1, mostrando concordância com o previsto pelo método da superfície de resposta (Figura 6).

Tabela 5. Rendimento total de acilgliceróis de acordo com os experimentos que compõem o planejamento experimental.

Experimento	Temperatura de reação (°C)	Proporção molar de ácido caprílico/glicerol (p/p)	Total de acilgliceróis (%)
1	35,82	2,58:1	61,3
2	64,18	2,58:1	6,3
3	35,82	5,42:1	28,8
4	64,18	5,42:1	20,4
5	30	4:1	38,4
6	70	4:1	6,0
7	50	2:1	87,8
8	50	6:1	23,0
9	50	4:1	39,8
10	50	4:1	39,4
11	70	4:1	37,3

Da Tabela 6 observa-se que as porcentagens de mono, di e tricaprilina variaram conforme as condições de reação (temperatura e proporção dos reagentes). A condição (50°C e 2:1) permitiu obter as maiores porcentagens de mono (7,4%), di (67,7%) e tricaprilina (12,7%). Entretanto, em princípio, poder-se-ia tentar direcionar a reação de esterificação para

favorecer a formação de uma das caprilinas, uma vez que, por exemplo, nas condições (50 °C e 4:1) houve tendência de maior formação de tricaprilina em relação aos demais experimentos. Analogamente, para a monocaprilina as condições que favoreceram sua formação seriam 36 °C e 2,58:1.

Tabela 6. Porcentagens de mono, di e tricaprilina obtidas em diferentes condições de temperatura e proporção molar de ácido caprílico:glicerol. O tempo total de reação foi fixado em 6h.

Experimento	Ácido Caprílico*	Monocaprilina*	Dicaprilina*	Tricaprilina*
1	38,7	3,0	55,9	2,4
2	93,7	1,1	5,0	0,2
3	71,2	0,6	26,4	1,8
4	77,6	2,8	2,8	1,1
5	61,8	1,1	35,2	2,1
6	94,0	1,6	4,2	0,2
7	12,2	7,4	67,7	12,7
8	77,0	0,7	17,5	4,7
9	60,2	0,8	32,4	6,5
10	60,6	0,8	31,9	6,6
11	61,2	0,9	31,2	5,2

*Os dados representam a média de duplicatas

4. CONCLUSÃO

A síntese de caprilinas foi estudada utilizando Lipozyme RM IM[®] em um sistema livre de solventes. A Superfície de Resposta composta por dois níveis e dois fatores foi utilizada para otimizar a reação. Um rendimento de esterificação de 92,55% foi alcançado na melhor condição reacional: temperatura de 50 °C e proporção molar ácido caprílico/Glicerol: 2:1. Estas condições foram aplicadas para bateladas sucessivas em reator descontínuo

convencional e reator equipado com membrana de microfiltração. A enzima apresentou grande queda da atividade enzimática inicial quando utilizada no reator convencional. Tal fato não foi observado no reator equipado com membrana, em que após a segunda reação em batelada a atividade enzimática manteve-se praticamente constante e com pouca diferença em relação à atividade enzimática inicial. A cromatografia a gás indicou que as melhores condições de temperatura e proporção molar dos reagentes para a formação das caprilinas foram 50°C e 2:1. Além disso, observou-se que o favorecimento da formação de cada caprilina poderá ser conseguido ajustando adequadamente os parâmetros de reação (temperatura, proporção molar e tempo).

5. PERSPECTIVAS

Direcionar as condições de reação para favorecer a formação de um dos tipos de caprilina, através do estudo cinético das reações feitas a 36°C e 2,58:1 (tendência à formação de monocaprilina), a 50°C e 2:1 (tendência à formação de dicaprilina) e 50°C e 4:1 (tendência à formação de tricaprilina).

6. REFERÊNCIAS

- AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **AOCS official method Te 1a-64**, 1997.
- AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E.D.; CASTRO, A.M.; LANGONE, M.A.P.; FREIRE, D.M.G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalyst. **Fuel**, v.135, p.315-321, 2014.
- BERLOTTO, R.C.T. Avaliação das interações de um derivado de tanino em processos de membrana poliméricas de microfiltração e de ultrafiltração. 2015. 117 f. **Dissertação de mestrado**. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- BLANCO, S.F.M.M.; SANTOS, J.S.; FELTES, M.M.C.; DORS, G.; LICODIEDOFF, S.; LERIN, L.A.; de OLIVEIRA, D.; NINIW, J.L.; FURIGO, A. Optimization of diacylglycerol production by glycerolysis of fish oil catalyzed by Lipozime TL IM with Tween 65. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.38, n.2, p.2379-2388, 2015.
- CHAVES, A.T.C.A. Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando delineamento composto central rotacional. 2008. 63 f. **Dissertação de mestrado**. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.
- DAVIS, M. **Water and wastewater engineering**. McGraw Hill, 2010, 1296p.

- DUARTE, S.H.; HERNANDEZ, G.L.P.; CANET, A.; BENAIGES, M.D.; MAUGERI, F.; VALERO, F. Enzymatic biodiesel synthesis from yeast oil using immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. **Bioresource Technology**, v.183, p. 175-180, 2015.
- EOM, T.K.; KONG, C.S.; BYUN, H.G.; JUNG, W.K.; KIM, S.K. Lipase catalytic synthesis of diacylglycerols from tuna oil and its anti-obesity effects in C57BL/6J mice. **Process Biochemistry**, v.45, n.5, p.738-743, 2010.
- FERNANDES, J.L.N.; SOUZA, R.O.M.A.; AZEREDO, R.B.V. ^{13}C NMR quantification of mono and diacylglycerols obtained through the solvent-free lipase-catalyzed esterification of saturated fatty acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.50, n.6, p.424-428, 2012.
- FREITAS, L.; SANTOS, J.C.; BARCZA, M.V. CASTRO, H.F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2277-2281, 2009.
- GARMHOODI, M.; MOHAMMADI, M.; RAMAZANI, A.; ASHJARI, M.; MOHAMMADI, J.; SABOUR, B.; YOUSEFI, M. Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.86, p.208-215, 2016.
- HERRERO, O.M.; MONCALIAN, G.; ALVARES, H.M. Physiological and genetic differences amongst *Rhodococcus* species from using glycerol as a source for growth and triacylglycerol production. **Microbiology-SGM**, v.162, n.2, p.384-397, 2016.
- HWANG, H.T.; QI, F.; YUAN, C.; ZHAO, X.; RAMKRISHNA, D.; LIU, D.; VARMA, A. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n.4, p.639-653, 2014.
- JUNIOR, I.I., FLORES, M.C., SUTILI, F.K., LEITE, S.G.F., MIRANDA, L.S.M., LEAL, I.C.R., SOUZA, R.O.M.A. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. **J Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.77, p.53-58, 2012.
- KOH, S.P.; TAN, C.P.; LAI, O.M.; ARIFIN, N.; YUSOFF, M.S.A.; LONG, K. Synthesis of medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT): Optimization of process parameters using response surface methodology. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, n.2, p.288-299, 2010.
- KUCERA, J. **Reverse osmose design: process and application for engineers**. Johnwiley & Sons: New Jersey, 2010.
- MANAN, F.M.A.; RAHMAN, I.N.A.; MARZUKI, N.H.C.; MAHAT, N.A.; HUYOP, F.; WAHAB, R.A. Statistical modelling for eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. **Process Biochemistry**, v.51, n.2, p.249-262, 2016.
- MATTE, C.R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J.K.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.127, p.67-75, 2016.
- MARZUKI, N.H.C.; MAHAT, N.A.; HUYOP, F.; ABOUL-ENEIN, H.; WAHAB, R.A. Sustainable production of the emulsifier methyl oleate by *Candida rugosa* lipase nanoconjugates. **Food and Bioproducts Processing**, v.96, p.211-220, 2015.
- 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.

- NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299p.
- POPPE, J.K.; FERNANDEZ-LAFUENTER, R.; RODRIGUEZ, R.C.; AYUB, M.A.Z. Enzymatic reactions for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v.33, n. 5, p.511-525, 2015.
- PREEZ, R.; CLARKE, K.G.; CALLANAN, L.H.; BURTON, S.G. Modelling of immobilized enzyme biocatalytic membrane reactor performance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.119, p. 48-53, 2015.
- REMONATTO, D.; SANTIN, C.M.T.; VALERIO, A.; LERIN, L.; BATISTELLA, S.; NINOW, J.L.; de OLIVEIRA, J.V.; de OLIVEIRA, D. 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.
- ROMDHANE, L.B.; ROMDHANE, Z.; BOUZID, M.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Application of a chitosan immobilized *Talaromyces termophilus* lipase to a batch biodiesel production from waste frying oils. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.171, n.8, p.1986-2002, 2013. p. , 2010.
- SANTOS, F. Processos de nanofiltração e osmose inversa para pós-tratamento de efluente de biorreator à membrana. 2015. 102f. **Dissertação de mestrado**. Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- SAPONGI, S.; KNEZEVIC, Z.D.; BEZBRADICA, D.I.; ZUZA, M.G.; SAIED, O.A.; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N.; MIJIN, D.Z. Use of *Candida rugose* lipase immobilized on sepabeads for the amylcaprylate synthesis: batch and fluidized bed reactor study. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.6, p.12-13, 2010.
- SCHENEIDER, R.P.; TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reúso**. ABES: São Paulo, 2001. 233p.
- SEVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C.C.; CONDORET, J.S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, n.1, p.61-70, 2011.
- SINGH, A.K, MUKHOPADHYAY M. Optimization of lipase-catalyzed glycerolysis for mono and diglyceride production using response surface methodology. **Arabian Journal of Science Engineering**, v.39,n.4, p.2463-2474, 2014.
- SILVA, S. A. B.; ARAÚJO, M. C. E.; RACT, J. N. R.; VITOLO, M. Differential scanning calorimetry study on caprylins. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.120, n.1, p.711-717, 2015.
- SKORONSKI, E.; PADOIN, N.; SOARES, C.; FURIGO, A. Stability of immobilized *rhizomucor miehei* lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.31, n.3, p.633-641, 2014.
- SOLAESA, A.G.; SANZ, M.T.; FALKEBORG, M.; BELTRÁN, S.; GUO, Z. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. **Food Chemistry**, v.190, p. 960-967, 2016.
- VERRI, F.; DIAZ, U.; MACARIO, A.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Optimized hybrid nanospheres immobilizing *Rhizomucor miehei* lipase for chiral biotransformation. **Process Biochemistry**, v.51, n.2, p.240-248, 2016.

- ZHONG, N, CHEONG, L.Z, XU, X. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.116,n.2, p.97-107, 2014.
- WAN, F.L.; TENG, Y.L.; WANG, Y.; LI, A.J.; ZHANG, N. Optimization of oligoglycerol fatty acid ester preparation catalyzed by Lipozyme 435. **Grasas y Aceites**, v.66, n.3, p.e088, 2015.

CONCLUSÕES GERAIS DO TRABALHO

No presente estudo, foi possível estabelecer as melhores condições para síntese enzimática de caprilinas a partir de glicerol e ácido caprílico, adotando a metodologia de superfície de resposta para otimização do rendimento. O reuso do biocatalisador foi analisado em dois tipos de reatores descontínuos: convencional e munido de membrana de microfiltração. Além disso, foi possível estudar o uso de Calorimetria Exploratória Diferencial como uma ferramenta para controlar a reação de esterificação entre glicerol e ácido caprílico.

Baseando-se nos resultados, a melhor combinação dos parâmetros adotados no planejamento experimental que culminaram em maior rendimento em caprilinas foi proporção molar ácido caprílico/glicerol 2:1 e temperatura 50°C. Da mesma forma, a combinação de parâmetros que desfavoreceu a síntese de caprilinas foi proporção molar ácido caprílico/glicerol 2,58:1 e temperatura 65°C. O reuso do biocatalisador empregado em dois tipos de reatores descontínuos demonstrou o bom desempenho da membrana de microfiltração, pois reteve 82,7% da atividade enzimática inicial quando o biocatalisador foi submetido a três ciclos de bateladas sucessivas. Sendo assim, o trabalho contribuiu para aproveitamento de um subproduto abundante como o glicerol, transformando-o em emulsificantes, produtos de maior valor agregado e amplamente utilizados em diversos setores industriais.

ANEXOS

ANEXO I

Cromatograma do experimento de maior rendimento em caprilinas (experimento n°7) do Planejamento Experimental. Análise realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica. Os tempos de retenção de cada substância, em minutos, foram: ácido caprílico (2,41 min), monocaprilina (4,20 min), dicaprilina (7,57 min) e tricaprilina (9,21 min).

ANEXO II

Cromatograma do experimento de maior rendimento em caprilinas do primeiro planejamento experimental. Análise realizada na Escola de Engenharia de Lorena. Os tempos de retenção, em minutos, de cada substância foram: ácido caprílico (2,41 min), monocaprilina (4,35 min), dicaprilina (7,69 min) e tricaprilina (9,71 min). As condições de análise e coluna utilizada foram as mesmas apresentadas no capítulo 3 da presente dissertação.

ANEXO III

World Journal of Pharmaceutical Sciences

ISSN (Print): 2321-3310; ISSN (Online): 2321-3086

Published by Atom and Cell Publishers © All Rights Reserved

Available online at: <http://www.wjpsonline.org/>**Original Article** **Lipase catalyzed esterification of caprylic acid with residual glycerol from biodiesel production**

Sara Anunciacao Braga Guebara*, Maria Cláudia Este de Araújo, Juliana Neves Rodrigues Ract, Michele Vitolo

University of São Paulo, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B.16, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

*Received: 07-02-2016 / Revised: 20-04-2016 / Accepted: 30-05-2016 / Published: 31-05-2016***ABSTRACT**

On an industrial scale, diacylglycerols and triacylglycerols are traditionally obtained either by extraction or transesterification/ inter-esterification of oils and fats. However, the esterification of glycerol with fatty acids using soluble or insoluble lipases as catalyst represents an alternative, with the advantage of milder reaction conditions when compared to traditional processes. Nowadays, the main reagents for enzyme catalyzed esterification reactions are plentiful and inexpensive. Acylglycerols and fatty acids with chain length shorter than ten carbon atoms, such as monocaprylin, besides their inherent surfactant properties, also present an antimicrobial activity, which enables their use as food preservatives or pharmaceutical/cosmetic ingredients. This paper proposes the use of residual glycerol from biodiesel manufacture as a starting material in esterification reactions with caprylic acid for the synthesis of acylglycerols using immobilized lipase as catalyst. In this context, environmentally friendly synthesis of such high-added value derivatives using biocatalysts are associated with a currently important waste recovery. Additionally, a concise approach of important aspects of glycerol, caprylic acid, lipases, caprylins as a target product, as well as alternative ways to produce them, are presented in this paper and analytical methodology for the reaction monitoring is proposed. These products have widely application in the pharmaceutical, chemical, and food industries.

Keywords: acylglycerol, caprylic acid, esterification, glycerol, lipase**INTRODUCTION**

Technological advances have led to increasing applications of chemical and biological catalysts in industrial processes. Enzymatic catalysis, when compared with chemical catalysis, requires mild pH (from 4.5 to 8.5) and temperature (from 35 °C to 60 °C), so that labile substances would be handled safely. Besides, the high selectivity (regioselectivity and/or enantioselectivity) and the possibility for carrying out simultaneous reactions also constitute significant advantages presented by enzymes. Besides, the presence of toxic or undesirable compounds into the medium would be minimal at the end of enzyme-catalyzed reaction [1-5].

Particularly, the number of industrial applications of enzymes has increased due to the greater availability and variety of biocatalysts, as a result of the great biotechnological progress achieved in the two last decades, including new techniques for

cell culture, isolation and genetic manipulation (mating and mutation), recombinant DNA, and hybridoma. Among the various existing biocatalytic processes, the conversion of porcine insulin into human, production of aspartame, acrylamide, semisynthetic penicillins and inulin, sucrose hydrolysis, oligodextrins, and hydrolysis of cellulose can be mentioned [6- 10]. Biocatalysis can replace traditional extraction processes (strongly dependent on the availability of the raw material and presenting low final product yield), fermentation (a microbial process that requires long time to transform raw materials, aseptic operation conditions, biosecurity measures in the industrial plant and surrounding areas) and chemical synthesis (highly pollutant and energetically wasting) [11].

This paper proposes the use of residual glycerol from biodiesel manufacture as a starting material in esterification reactions with caprylic acid for the synthesis of mono-, di-, and tricaprylins using

*Corresponding Author Address: Dr. Sara Anunciação Braga Guebara, University of São Paulo, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B.16, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil; E-mail: saraabraga@usp.br

immobilized lipase as catalyst. In this context, environmentally friendly synthesis of such high-added value derivatives using biocatalysts are associated with a currently important waste recovery. Additionally, a concise approach of important aspects of glycerol, caprylic acid, lipases, caprylins as a target product, as well as alternative ways to produce them, are presented in this paper and analytical methodology for the reaction monitoring is proposed. These products have wide application in the pharmaceutical, chemical, and food industries [12].

REAGENTS

Glycerol: Glycerol is a polyol with wide industrial application, commercially available since the late 19th century. It is commonly known as glycerin when its purity is not less than 95%. At room temperature glycerol is a syrupy, colorless, odorless, sweet-taste and hygroscopic liquid. It is miscible with water and alcohol in any proportion and immiscible in benzene, chloroform, carbon tetrachloride, and other non polar solvents. Some of its physicochemical properties are Melting Point = 17.8 °C, Boiling Point_{760mmHg} = 290 °C, Density = 1.261 g/cm³, Flash Point = 176 °C (open container), Freezing Point (aqueous solution 10% w/w) = -1.6 °C, and Viscosity = 1.143 cp.

As far as 1950, commercial glycerol was obtained as a by-product from the soap processing. In the following years, it was synthesized from petroleum products, but it only became available in large amounts in the early 2000, due to the global expansion of biodiesel industry [13]. Biodiesel undoubtedly holds a prominent position among biofuels since its production, when compared to other fuels, releases lower amounts of harmful gases to man and the environment. The biodiesel is a liquid obtained mainly from natural lipids such as vegetable oils or animal fat following transesterification and/or esterification with alcohols. The biodiesel has several advantages over conventional fuels, i.e., high biodegradability, low toxicity and obtained from renewable sources. According to Vasconcelos [14], the production of 1,000 lb of biodiesel generates 100 lb of waste glycerol. In 2011, for instance, Brazil alone produced 2.6 billion tons of biodiesel, generating 260,000 tons of residual glycerol. In global terms, glycerol current offer is around 1.5 million tons. Furthermore, the availability of glycerol tends to increase in Brazil, since a national production of around 14.3 billion tons of biodiesel is expected for 2020.

Glycerol is traditionally used as a raw material in drugs (as an important component in the

formulation of pharmaceutical specialties - liniments, ointments, for example - and in medicines packaging), foods (as a moistener in formulations due to its high hygroscopicity), cosmetics (inhibiting drying of creams, lotions, and soaps), softening and elastic fibers (as a plasticizer to increase paper flexibility and resistance), explosives (as nitroglycerin, for example), tobacco leaves (protecting them and increasing their resistance during drying), and as a lubricant in general (as an ingredient in paints, varnishes, and detergents). However, new applications have been recommended, especially in animal feeding (as a component in pigs, chickens, and cattle feed), aggregation of particles avoiding their suspension in the air (as in the case of iron ore transportation in open wagons), burning in boilers (for steam and electricity generation), and as a reactant in the production of ethylene glycol (antifreeze fluid used in radiators), ethanol, propanediol, bio additives (antioxidants and antifreeze for gasoline and diesel), propene, besides several other recommended applications [15, 16].

Despite the current diversity of glycerol uses, the great amounts resulting from the biodiesel industry ensures an excess production, compelling the academic, technological, and business sectors to offer new possibilities for its reuse, leading to the increasing of its market value. Converting glycerol into higher added value compounds (fatty acid esters - such as caprylins -, propylene polymers, 3-hydroxypropionaldehyde, 1,3-propanediol, etc.) may be an alternative to the petroleum processing for the synthesis of plastics and resins. The association of ethanol, biodiesel and petroleum processing is currently leading to the implementation of multifaceted industrial complexes - called biorefineries - which, according to estimates, will supply, in the near future, 65% of all chemical demand, reaching 100% in 50 years [17]. As most reactions for the conversion of glycerol into derivatives are catalyzed processes, the use of enzymes has enormous potential. In this context, it is perfectly valid to discuss the attainment of acylglycerols from glycerol and short chain fatty acids, such as caprylic acid, mediated by lipase (EC. 3.1.1.3) [14].

Caprylic acid: Caprylic acid is the common name of octanoic acid, which is a naturally occurring saturated fatty acid. It is commonly found in mammal milk, especially goats, and in some vegetable oils such as coconut, babassu, and palm oils. In most cases its content does not exceed 8% of total fatty acid composition. However in the seeds of the species *Cuphea hookeriana* and *Cuphea painteri* - commonly known as cigar plants - it occurs at levels of about 70% [18]. It can be

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375

obtained by the hydrolysis of these oils, following separation from the other fatty acids by vacuum fractional distillation, or from 1-heptene or octanol oxidation [19].

By a chemical point of view, caprylic acid is an oily liquid with a lightly rancid flavor, slightly soluble in water (0.068 g/100 g; 20 °C), but miscible with alcohol, chloroform, ether, carbon disulfide, petroleum ether and glacial acetic acid. Some of its physico-chemical properties are: Melting Point = 16.7 °C; Boiling Point = 240 °C; $d_{20} = 0.910 \text{ g/cm}^3$; Flash Point = 130 °C.

Caprylic acid has applications in the cosmetic industry for the formulation of creams and shampoos, since its reaction with glycerin results in a compound with emollient and lubricating properties. Besides, when reacted with alcohols, it produces esters that are widely used in perfume formulation [20].

This fatty acid - classified by the FDA (Food and Drug Administration) as GRAS (Generally Recognized as Safe) - is known for its antimicrobial property, having the capability of inactivating both Gram-positive and Gram-negative bacteria such as Group B *Streptococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. Probably, the mechanism involves the interruption or uncoupling of electron transport and oxidative phosphorylation chain [21, 22]. According to the FAO/WHO, this fatty acid is also considered safe as a food additive with a diversity of applications such as flavoring agent or pathogens inhibitor when applied in meat surfaces [22]. In recent years, the search for natural caprylic acid-type antimicrobials has been intensified, in order to decrease the use of synthetic antimicrobials for increasing the shelf life of many foods [22].

Caprylic acid has antifungal activity against *Candida albicans*, a fungus responsible for many

skin and intestine infections. Apparently, this fatty acid has the ability to interact with the fungus cell membrane, promoting changes in cell permeability, causing their destruction [23].

Among other important pharmacological properties of caprylic acid is its intrinsic ability to produce an acute anticonvulsant effect, besides serving as a metabolic substrate for the production of ketone bodies, which also act as an acute anticonvulsant. When administered at ineffective doses, it has the ability to potentiate the anticonvulsant effect of valproate drug [24]. It also has the ability to interfere with the body energy balance control via appetite stimulation, since it binds to ghrelin hormone by the esterification of a serine hydroxyl group, which is one of the 28 amino acids forming the peptide [24].

Lipase: Lipases (EC.3.1.1.3) are enzymes found in prokaryotic and eukaryotic beings, able to catalyze structural modifications in lipid materials. The lipolytic activity in the body is associated with the anabolism and catabolism of fats. These enzymes have been studied since 1846, when pancreas lipolytic activity was first detected. In 1871 it was also detected in vegetable seeds. From the 1950s and 1960s onward they were isolated and purified, respectively, from animal organs and microorganisms - for example, *Geotrichum candidum* (1965), *Staphylococcus aureus* (1967) and *Achromobacter lipolyticum* (1967) [25].

The reactions catalyzed by these enzymes always involve the modification of an ester molecule by three different mechanisms, namely, hydrolysis, esterification, and transesterification. While transesterification comprises four different types of unidirectional reactions, hydrolysis and esterification have in common a balancing mechanism in which a displacement to the right (occurs in aqueous medium) or to the left (occurs in a non-aqueous medium) will depend on the water activity in the reaction medium.

The balance between hydrolysis and esterification can be outlined as follows:

The four different reactions that compose the lipase mechanism called transesterification are:

Acidolysis (reaction between an ester and a fatty acid):

Alcoholysis (reaction between an ester and an alcohol):

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375**Interesterification** (reaction between fatty acid esters): **Aminolysis** (the reaction between an ester and an amine):

Considering the reaction types mentioned, the catalytic versatility of lipases is evident, which accounts for their widespread use in industrial biocatalytic processes since the late 1970s - in interesterification of fats, hydrolysis of esters, transesterification and acylation [26]. Therefore, lipases are used in foods (release of fatty acids from oils and fats present in raw material, promoting desired organoleptic, physicochemical, and nutritional modifications in the final products; improvement of bakery products texture; abbreviation of sausage maturing period, such as frankfurters; development of flavors and aromas, as well as milk fat hydrolysis and maturation speed up in cheeses); detergents (in combination with proteases, lipases are used to remove stains from clothing and other fabrics); oleo-chemistry (used to modify oils and fats, producing derivatives with beneficial metabolic properties such as polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and structured lipids. PUFAs are used as drugs, dietary products, nutraceuticals and food additives, while structured lipids, in the emulsified form, can be considered excellent substitutes for vegetable oils in parenteral and enteral nutrition); pharmaceutical chemistry (lipases are stable in organic solvents and present regional, enantio and chemoselectivity, with large application in racemic resolution and chiral compounds attainment [27, 28]); biodiesel (transesterification of triglycerides containing long chain fatty acids with short chain alcohols (methanol, ethanol, etc.), resulting in a mixture of esterified long chain fatty acids which, after glycerol separation, constitute the biodiesel); other applications (biosensors to detect triglycerides in the oleo-chemical industry, food technology and clinical analysis; production of flavoring agents, softeners and surfactants with application in the cosmetics industry; in association with other hydrolases in leather manufacture; in combination with cellulases and ligninases for cleaning the drying cylinders used in the pulp and paper industry) [26].

The diversity of applications for lipases is reflected by their huge participation in the global enzymes market, which was about US\$ 7.4 million on 2014 [29]. Considering the enzyme market division proposed by Sá-Pereira [29], in industrial enzymes (technical enzymes for cleaning, textile, leather, ethanol, cellulose, and paper products, enzymes for

the food and animal feed industry) and special enzymes (enzymes for therapeutic and diagnostic purposes, fine chemicals, and research), lipases fit into both groups. As an example, the food, beverages, and cleaning products sectors account for 80% of lipase demand for industrial use while the pharmaceutical sector alone consumes 60% of lipases for special applications [29].

To date, the remarkable performance presented by lipases in different commercial sectors - which diversity of application in the near future is expected to increase in association with the market development - resulted directly from the basic knowledge gathered over the last six decades, especially about their obtaining sources, production and downstream processes, kinetic, structural properties and structure-activity relationship.

Lipases are found in species of the three kingdoms of living things. However, for industrial uses, microorganisms are the preferred source since they ensure a high rate of synthesis, high substrate to product conversion yield, great versatility and easiness of environmental and genetic manipulation of its productive capacity. Examples of microorganisms used for obtaining lipases are *Candida rugosa*, *Candida Antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Candida cylindraceae*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens* and *Chromobacterium viscosum* [26, 30].

The main lipase production method comprises submerged culture fermentation and, to a lesser extent, surface cultivation. In submerged culture, generally, lipase production is influenced by parameters such as type and concentration of the carbon source (lipid compounds are most recommended) and nitrogen (such as peptone, soybean meal, yeast extract and corn steep liquor), presence of metal ions, pH, growth temperature and dissolved oxygen concentration. Regarding the isolation and purification of lipases from the fermented broth, it is recommended to consult Saxena [31], Sharma [32], Aires-Barros [33], Mukherjee [34].

The kinetics of lipases has been studied since the second half of the last century, triggered by the finding that lipases, at least the ones known so far, acted on triglycerides when they were in the emulsified form, leading to the general idea that lipases act at the interface of organic-aqueous micelles, which Desnuelle [35] called "interfacial activation." This activation would result in the enzyme adsorption in the water-lipid interface, followed by conformational changes in its molecular structure [36]. However, it was found that not all lipases (for example lipase from *Candida antarctica*) depend on the interfacial activation. Nowadays, studies on the three-dimensional structure of proteins and crystallography indicate that lipases have the same basic folding - called α , β -hydrolase - and an active site formed by the serine-aspartate-histidine triad (glutamate). This triad is covered by a discrete folding of a secondary and/or tertiary structure of the protein, forming a kind of "cover". Therefore, when the enzyme is in an aqueous solution, the "cover" disposes on the domain of the active site, closing it, but when it interacts with the oil-water interface, it is displaced and opens. The cover "open-close" mechanism, directly associated to the macromolecule conformational changes, has been observed in lipases of both homologous and heterologous families, indicating that it is essential for the lipolytic activity [26].

Microbial lipases have their activity enhanced by the presence of low concentrations of calcium, potassium, sodium and magnesium salts and inhibited by heavy metals [37]. The effects of pH and temperature on lipolytic activity (Table 1) depend on the origin of the enzyme (wild strain, selected mutant strain, or genetically modified organism, obtained by interspecies gene transfer or followed by cloning of the receiving cell or site-directed mutation - alteration in the planned sequence of gene bases that encode the enzyme).

The reactions catalyzed by lipases compete with conventional chemical processes such as hydrolysis of oils and fats performed by thermal disruption in low or high pH conditions [30]. In order to become economically viable the use of lipases in processes operated in different industrial sectors, a cost reduction is essential, which can be attained either by improving the lipase producing microorganisms (selecting high production mutants by applying conventional genetic techniques and/or gene expression lipase encoders in microorganisms such as *E. coli*, of easy growth) or by reusing them. This last proposal can be achieved through the use of immobilization technique.

The immobilization consists in joining an enzyme to an inert support by physical, chemical and/or physicochemical methods. Due to the inherent molecular characteristics of the enzymes and the substrate and product nature, there is a variety of immobilization methods. These can be divided into three groups according to the type of interaction between the enzyme and the inert support, namely, support bonding (by adsorption, covalent bonding, and ionic bonding), physical retention (in membranes, microcapsules, and amongst a polymer mesh - e.g., polyacrylamide) and crosslinked (represented by the formation of aggregates of enzyme molecules interconnected by bifunctional molecules such as glutaraldehyde).

It is noteworthy that the type of method to be employed for the enzyme immobilization or the type of support to be chosen, which can be classified as porous or non-porous, or even, according to its composition or morphology, will depend on the enzyme properties and the application conditions of the immobilized enzyme. The simplest and cheapest method should be chosen, resulting in a derivative with good activity retention and high operational stability [38].

In the case of lipase immobilization, the procedure was not unprecedented "per se", but the demonstration that the immobilized system could be applied to the process of ester bonding synthesis in non-aqueous medium, illustrated the property of a hydrolytic enzyme to be able to catalyze the inverse reaction. This observation was also extended to other hydrolases. It appears unquestionable that the starting point of lipase immobilization history took place in a patent application in 1976 by Unilever (a British Company) for palm oil interesterification for obtaining cocoa butter alternatives [36]. Since then, the use of lipases in the immobilized form has spread out in the fats and oils industry for lipid modification in general by hydrolysis, esterification (particularly fatty acids) and in the transesterification of triglycerides with low molecular weight alcohol (mainly methanol and ethanol) for biodiesel production [13, 40-44].

The lipase has been immobilized by adsorption, entrapment and covalent bond in different supports, with emphasis on the method by adsorption [13, 45].

As well as the calcium alginate entrapment method, the adsorption method is considered one of the simplest immobilization methods to perform. In the adsorption method, the enzyme is fixed to the support by non-covalent bonds - hydrogen bonds, Van der Waals forces, electrostatic interaction,

among others - with smooth processing conditions, including no prior support activation (a washing procedure with buffer before use is sufficient to remove any impurities) and no additional reagents [46]. Therefore, this method is inexpensive and promotes the maintenance of enzyme activity and specificity. However, attention should be given to the support chemical composition, the molar ratio between hydrophilic and hydrophobic groups, particle size and surface area available for binding, as these factors influence the total amount of immobilized enzyme and its catalytic performance after immobilization. According to Stoytcheva [13] there is a great variety of supports available such as macroporous polymers, activated carbon, celite, polystyrene, polyacrylonitrile, ceramic, hydrophilic resins (Amberlite, Dowex, for example), silica and zeolite.

PRODUCT

Glycerides are esters formed by glycerol and fatty acids. Partial glycerols such as mono- and diacylglycerols are important intermediates in the metabolism and triacylglycerols are the major constituents of most edible oils and fats. Among these, monoacylglycerols (MAG) are nonionic surfactants that have the GRAS status (Generally Recognized as Safe) by the FDA (Food and Drug Administration - USA), and have important application in the pharmaceutical, food and cosmetic industries, for not causing side effects upon ingestion or skin irritation, unlike ionic surfactants [47].

In the pharmaceutical industry, monoglycerides (MAG) are used as emollients to plasters, slowly releasing the medication. In foods they are most commonly used as emulsifiers in a wide range of products such as margarines, dairy products, sweet and sauces, whereas in cosmetics they are used as texturizing agents, improving the consistency of creams and lotions [48]. MAGs composed of only one type of fatty acid have more specific applications. Monocaprylin, for instance, has antiviral and antibacterial properties and is used in emulsions for oral mucosa, reducing the damage caused by bacteria such as *Candida albicans*, which is lodged between the gum and the teeth (especially in dentures). Recent studies point out some functions of monocaprylin as antifungal and antibacterial agents on textile materials [49], inactivation of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria monocytogenes* in foods and beverages [19, 50], and control of disease-causing pathogens in aquatic species in captivity [51], among others. On these aspects, monocaprylin would be compared to monolaurin and monoolein, both having those properties well established [11]. Meanwhile

monoolein can be used as a drug delivery system, emulsifier and pharmaceutical carrier [11], the monolaurin has antiviral, antibacterial and antiprotozoal properties, being used in drugs for destroying fat coated viruses (for example, HIV, herpes), many pathogenic bacteria (ex., *Listeria monocytogenes*) and protozoa (ex., *Giardia lamblia*). Besides, monolaurin is also used as a penetrating agent on drugs applied in mucous membranes, reducing the time required for the drug action onset, increasing the amount of absorbed drug, and causing less or no deleterious effect on the mucous membrane. Thereby, monocaprylin could be envisaged as an alternative for monolaurin and monoolein.

Partial glycerides are typically produced by continuous glycerolysis employing inorganic catalysts at high temperatures (220 - 250 ° C) and pressure (200 psi). However, the use of lipases as catalysts in the synthesis of MAGs has been intensively studied as an alternative to traditional methods [52]. However, there are few studies regarding the production of mono- and diglycerides from glycerol and fatty acids of low molar mass, such as caprylic acid. The advantages of the enzymatic reaction comprise enzyme specificity, which allows the synthesis of products that could not be obtained by conventional chemical routes, milder reaction conditions, resulting in products with improved quality, little or no side reaction or formation of undesired products. It is also noteworthy that, from an environmental point of view, the process is technically clean and safe, the final product is easily recovered, the process is more accurately controlled, and water demand and energy costs are lowered [53]. Besides, from an economic point of view, it meets a technological priority for the Brazilian Government to increase biodiesel production, and consequently the production of glycerol residues, rendering indispensable the search and development of processes that will allow the production of derivatives with added market value [11].

OBTAINING CAPRYLINS

In general, the procedure for obtaining caprylins consists in mixing glycerol and caprylic acid as substrates in an appropriate vessel, following the addition of an immobilized lipase at a ratio of 10% of substrate amount. The blend must be stirred, for example, at 180 rpm and kept at a previously determined constant temperature. After a certain time, the reaction is stopped and the reactor contents are then filtered through filter paper under vacuum. The immobilized lipase is removed from the filter and, after washing with deionized water, it can be reused in another batch. The filtrate is

collected for later separation of caprylins and appropriate characterization using analytical methods.

In order to separate the caprylins from the reaction medium, the filtrate is homogenized and a sample is collected, which is then transferred to a separation funnel. A certain volume of the extraction solution is added to the filtrate, following intense manual stirring, then, addition of distilled water. After further stirring, the mixture is left to rest to allow phase separation. The aqueous (lower) phase is removed and this procedure is repeated twice. The organic (upper) phase is collected and concentrated on rotary evaporator (operated under vacuum). Samples of the concentrated organic phase are collected for appropriate analytical determinations.

An example of a laboratory scale procedure is described hereinafter. A 50 g mixture of glycerol and caprylic acid (proportion of 1:2) is added to a 100 mL glass flask, following the addition of 5 g of the immobilized lipase Lipozyme RM IM®, comprising an enzyme/substrate ratio of 10%. The flask is coupled to a rotary evaporator so that the reaction is performed with a 180 rpm agitation at reduced pressure to remove water (suction pump capacity = 0.6 m³/h, Pressure = 8 mbar). The flask is kept rotating in a water bath at the desired reaction temperature (50 °C - 90 °C). By the end of the preset reaction time, the flask content is filtered under vacuum, the enzyme retained by the filter is collected, washed with deionized water, dried, and stored for reuse. The filtrate, in turn, is homogenized by vortexing for 10 minutes and then a 5 g sample is transferred to a separation funnel containing a mixture of petroleum ether (45 mL) and acetic acid (12 mL). After intense stirring, 30 mL of distilled water are added. The funnel content is once more vigorously stirred and then left to rest until phase separation is observed. Following, the lower phase composed of water soluble substances, as glycerol, is drained and the procedure is repeated three times. The resulting organic phase is concentrated on rotary evaporator at 70° C for 20 minutes under a 60 rpm agitation. Aliquots of this solution are collected for analytical purposes (for determinations of acid value and proportions of mono-, di- and tricaprylins). The just described laboratory scale procedure allows the obtainment of caprylins at a yield (considering the sum of mono-, di- and tricaprylin) of around 90% if the esterification is performed at 50 °C for 6 h and using a molar ratio of caprylic acid/glycerol of 2:1.

CHARACTERIZATION OF CAPRYLINS

Determination of acid value: The caprylic acid content in the reaction medium by the end of

esterification reactions can be measured by the titration method commonly called Acid Value. For this purpose, reaction medium samples are collected and titrated with a sodium hydroxide solution (0.1 M) as described by AOCS standard method (Te 1a-64) [54].

The acid value (AV), expressed as mg NaOH/g of sample is calculated using the equation:

$$AV = (V \cdot f \cdot 5.61) \div m \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: V = volume of sodium hydroxide 0.1 M spent in titration (mL); f = sodium hydroxide solution correction factor; and m = sample weight (g).

The method suitability can be determined by applying it in the determination of the acid value of glycerol/caprylic acid blends. Table 2 shows that AV decreases with decreasing proportions of caprylic acid in the blends. The same applies to esterification reaction monitoring (run under different conditions), in which different total caprylin contents are obtained (

Table 3). Figure 1 shows the monitoring of esterification reaction kinetics by determining reaction yields over time (total = 10h) using the acid value method, revealing that reaction yield is above 90% from t = 6 h onwards. The coefficient of variation for this method is approximately 11% (personal information).

* (G)/(CA) = initial ratio of the substrates (glycerol and caprylic acid)

Table 2 and

Table 3 clearly demonstrate that AV is an indicative measure of esterification intensity in different reaction conditions. Although the example relates to the esterification of glycerol with caprylic acid - specifically directed to obtain caprylins - the method described can be applied to the esterification of glycerol with any other fatty acid. Given the simplicity of the method, it can be performed by the reactor in the industrial plant.

Differential Scanning Calorimetry (DSC): The DSC technique is often used to characterize the melting and crystallization behavior of fats and oils, especially to evaluate the stability of these substances towards oxidation. Kosłowska [55] studied the effectiveness of the addition of thymus and rosemary alcoholic extracts into lipids in cookies formulations and observed in DSC curves that lipids had their resistance to oxidation greatly increased. Several studies found in literature describe the employment of DSC in similar circumstances [56]. On the other hand, many other studies focused on the changes in the physical properties of fats, for example, after performance

of interesterification and/or transesterification reactions, observed in DSC melting and/or crystallization profiles [57].

However, there are few studies focused on the use of DSC in monitoring hydrolysis and esterification reaction progress in reactors for the production of mono-, di- and triglycerides. Moreover, the use of DSC in monitoring the efficiency of purification processes for the refining and separation of glycerides, in general, is little explored. In this approach, Danthine [57] used the DSC as a quantitative tool to monitor the enzymatic interesterification of palm oil in a batch reactor. The intense changes observed in the melting curves allowed following the course of interesterification. Similarly, Mizobe [58] determined the thermal profiles of mono- and diglycerides of oleic and palmitic fatty acids separately and then observed polymorphism by changes in the distributions of peaks in the endo/exothermic curves obtained by DSC for their blends. In this area, it is also valuable to mention the work of Ortiz [59], who used DSC measures to monitor the changes undergone by soy protein during enzymatic proteolysis. While recognizing the suitability of the traditional methods for this purpose - the various types of chromatography (molecular sieve, adsorption, etc.) and electrophoresis - the authors observed that structural changes undergone by the protein were clearly evidenced by displacements of the maximum temperature peaks, the broadening endotherms and the value of the denaturation enthalpy.

Based on these, the use of DSC to characterize caprylins (mono, di and tricaprylin) was sensitive in evidencing the presence of these compounds in esterification reactions involving caprylic acid and glycerol.

An example to assess the laboratory applicability of DSC for the characterization of caprylins is the determination of melting and crystallization curves of mono-, di-, and tricaprylin separately and in combination. Measurements can be made in equipment (a Perkin Elmer DSC 4000, for example) provided with a cooling device (Perkin Elmer Intracooler SP) and an oven with a helium atmosphere at a flow rate of 20 mL/min. Thereby, 5 mg samples are placed in 50 μ L aluminum pans, which are then hermetically sealed. Initially, a sample is maintained at 80 °C for 10 min. Subsequently, the system cools from 80 °C to - 60 °C at a cooling rate of 10 °C/min and then keeps the sample at - 60 °C for 30min. Finally, the sample is heated from - 60 °C to 80 °C at a rate of 5 °C/min. When analyzing reaction products, it is necessary to concentrate the sample containing the

caprylins previously dissolved in the organic phase used to extract them from the reaction medium, by evaporating it with a pure nitrogen stream. For the preparation of blends of mono-, di-, and tricaprylin standards, it is recommended to dissolve them separately in n-hexane and then mix the solutions according to the desired proportions, at a concentration of 2g/L.

As an example, Figure 2 and Figure 3 correspond to the melting and crystallization curves, respectively, of mono- and dicaprylin. Figure 4 and Figure 5, in turn, show the melting and crystallization curves, respectively, of mono- and dicaprylin blends in the proportions 1:2 and 2:1. The corresponding enthalpies of each peak are presented in Table 3.

The figures clearly evidence the possibility of distinguishing mono and dicaprylins separately or in blends. As shown in Table 4, each peak is related to a specific enthalpy, which shows, according to by *Silva* et al. [60], the occurrence of polymorphism, phenomenon intrinsically related to inter and intramolecular interactions stabilized by a pool of non-covalent bonds (hydrogen bonds, van der Waals forces, etc.).

Gas Chromatography: Chromatography is an analytical technique widely used in the identification and quantification of chemical substances. In the field of lipids, gas chromatography is widely used for monitoring interesterification by examining the incorporation of required fatty acids into the products. In general, it is a key technique in all areas of lipid analysis [61, 62]. A chromatogram of the final reaction medium, containing residual caprylic acid and the synthesized mono-, di-, and tricaprylin is shown in Figure 6.

Caprylins (mono-, di-, and tricaprylin) can be adequately identified on a Varian GC gas chromatograph (430 GC, Varian Chromatograph Systems, USA). The Galaxie software package is used for identification of peaks. Injections can be performed on a 15 m silica capillary column (ID= 0.25 mm) using helium as the carrier gas at 1.0mL/min at a split ratio of 30:1. The injector temperature is set at 360 °C and the detector temperature at 375 °C. The oven temperature is initially 80 °C and programmed to increase to 350 °C at a rate of 5 °C/min. The identification of caprylins, expressed as w/w, is determined by normalizing the peak area of the chromatogram.

CONCLUSION

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375

Conclusively, caprylins are a compound having antimicrobial and surfactant properties, with wide application in the pharmaceutical, cosmetic, and food industries. Their synthesis from caprylic acid and residual glycerol from the biodiesel production catalyzed by immobilized lipases represents an alternative process with high potential for commercial application. It makes use of inexpensive raw material abundantly available, can bring benefits to the environment by recovering a major industrial waste, and simultaneously presents

a series of advantages over the chemical synthesis traditionally used, such as lower process temperatures, enzyme reuse, and lower generation of byproducts. The process monitoring can be performed by a variety of methods, from the simplest, by titration of the acid number by the reactor, up to the most sophisticated, such as gas chromatography and thermal analysis, among other techniques, in well-equipped laboratories, for more specific results.

Table 1. Optimum temperature and pH for some microbial lipases [37, 39].

Microorganism	pH	T(°C)
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7.0	37
<i>Alcaligenes sp</i>	7.0 - 8.5	37 - 40
<i>Aspergillus niger</i>	5.0 - 7.0	45 - 55
<i>Aspergillus oryzae</i>	8.0 - 11.0	30 - 40
<i>Candida cylindracea</i>	7.0	40 - 50
<i>Candida rugosa</i>	6.0 - 7.0	30 - 40
<i>Chromobacterium viscosum</i>	5.0 - 9.0	50 - 60
<i>Geotrichum candidum</i>	8.2	37
<i>Mucor javanicus</i>	7.0	37
<i>Mucor miehei</i>	6.0 - 8.0	30 - 50
<i>Penicillium camemberti</i>	5.0	45
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6.2 - 6.8	37
<i>Penicillium roqueforti</i>	5.0 - 7.0	40 - 50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7.0 - 8.0	45
<i>Pseudomonas fragi</i>	7.0 - 7.2	32
<i>Rhizomucor miehei</i>	5.0 - 7.0	30 - 50
<i>Rhizopus japonicus</i>	7.0	40
<i>Rhizopus javanicus</i>	6.6 - 7.1	37
<i>Rhizopus niveus</i>	7.0	45
<i>Rhizopus oryzae</i>	7.0	40

Table 2. Acid Values (AV) of glycerol (G) and caprylic acid (CA) blends in different proportions.

(G)/(CA)	AV (mg NaOH/g)
1:1	207
2:1	151
3:1	134
4:1	104
5:1	90

Table 3. Examples of esterification reactions between glycerol and caprylic acid performed under the conditions indicated in the table. After the reaction completion, the acid value (AV), the free caprylic acid (CA) content and the total acylglycerols (TA) formed were determined. The proportion of immobilized lipase/substrate was 10%.

Reaction conditions Temperature, reaction time and (G)/(AC)*	CA (%)	TA (%)	AV (mg NaOH/g)
60 °C, 8 h, 2%	49	51	71
60 °C, 4 h, 2%	67	33	85
70 °C, 2 h, 3%	96	4	92
70 °C, 6 h, 3%	95	5	92

Table 4. Enthalpies for each one of the peaks shown in Figure 4 and Figure 5 [60]

Peak Number	Enthalpy (J/g)	
	2:1	1:2
1	2.7	5.8
2	32.3	7.1
3	38.0	3.4
4	27.0	1.0
5	1.1	-
6	-13.4	2.9
7	-77.7	-8.1

Figure 1. Variation of acid value (Y) measured by the difference between the Acid Value at the beginning of the reaction (AG₀) and at a given time (t) (AG_t), and yield percent of glycerol/caprylic acid esterification [Y] (●). The reaction conditions were: 50 °C, lipase/substrate ratio = 10% and caprylic acid/glycerol = 2:1.

Figure 2. Melting curves of mono (a) and dicaprylin (b) [60]

Figure 3. Crystallization curves of mono (a) and dicaprylin (b) [60]

Figure 4. Melting curves of mono/dicaprylin binary systems in proportions of (a) 1:1, (b) 1:2, and (c) 2:1 obtained by DSC [60]

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375

Figure 5. Crystallization curves of mono/dicaprylin binary systems in proportions of (a) 1:1, (b) 1:2, and (c) 2:1 obtained by DSC [60]

Figure 6. Chromatogram of caprylins after esterification. Conditions: temperature 60 °C, reaction time 8 hours and molar ratio of glycerol/caprylic acid 2:1, respectively.

REFERENCES

1. Hauer B *et al.* New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew Chem Int Ed* 2014; 53: 3070-95.
2. Christopher LP *et al.* Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. *Appl Energ* 2014; 119: 497-520.
3. Taraboulsi-Jr FA *et al.* Multienzymatic sucrose conversion into fructose and gluconic acid through fed-batch and membrane continuous processes. *Appl Biochem Biotech* 2011; 165: 1708-24.
4. Peng YQ *et al.* Resin adsorption application for product separation and catalyst recycling in coupled enzymatic catalysis to produce 1,3-propanediol and dihydroxyacetone for repeated batch. *Eng Life Sci* 2013; 13: 479-86.
5. Tudorache M *et al.* Biocatalytic designs for the conversion of renewable glycerol into glycerol carbonate as a value-added product. *Cent Eur J Chem* 2014; 12: 1262-70.
6. Smith JE. *Biotechnology*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1996.
7. Abrahão-Neto J. Algumas aplicações de enzimas. In: Borzani W, Schmidell Netto W, Lima UA, Aquarone E, eds. *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher; 2001. pp.411-18.
8. Rocha-Filho JA, Vitolo M. *Enzimas no contexto da síntese orgânica*. Edition of authors: São Paulo, 1998.
9. Gan Q *et al.* Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor. *J Chem Technol Biot* 2005; 80: 688-98.

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375

10. Díaz EG et al. Towards the development of membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis. *J Membrane Sci* 2006; 273:152-58.
11. Freitas L et al. Monoglicéridos: produção por via enzimática e algumas aplicações. *Quim Nova* 2008; 31: 1514-21.
12. Zhong N et al. Strategies to obtain high content of monoacylglycerols. *Eur J Lipid Sci Technol* 2014; 116: 97-107.
13. Stoytcheva M et al. Immobilized lipases in biodiesel production. In: Stoytcheva M, Montero G, Eds. *Biodiesel Feedstocks and Processing Technologies*. Rijeka: Intech; 2011. pp.397-405.
14. Vasconcelos Y. Resíduos bem-vindos. *Revista Pesquisa FAPESP* 2012; 196: 56-63.
15. Rossi DM et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renew Energ* 2012; 39: 223-27.
16. Albarelli JQ et al. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. *Braz J Chem Eng* 2011; 28: 691-698.
17. Adeodato S. Investimentos em etanol de segunda geração e química verde crescem no Brasil. *Valor Econômico*. 2013 Jan 23; F:1.
18. Gadotti C et al. Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiol* 2014; 39:1-6.
19. The Merck Index: an encyclopedia of chemical, drugs and biologicals, 12th ed.; Chapman & Hall: New York, 1996; pp. 763.
20. Hernandez E. Pharmaceutical and cosmetic use of lipids. In: Shahidi F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. 6th ed. John Wiley & Sons; 2005. pp. 391-411.
21. Chang SS et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monacapylin. *Int J Food Microbiol* 2010; 144: 141-46.
22. Hulankova R et al. Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Sci* 2013; 95: 190-94.
23. Tsukahara T. Fungicidal action of caprylic acid for *Candida albicans*. 2. Possible mechanisms of action. *Jpn J Microbiol* 1962; 6: 1-7.
24. Wlaz P et al. Anticonvulsant profile of caprylic acid, a main constituent of the medium-chain triglyceride (MCT) ketogenic diet, in mice. *Neuropharmacology* 2012; 62: 1882-89.
25. Joseph B et al. Cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007; 2: 39-48.
26. Freire MD, Castilho LR. Lipases em biocatálise. In: Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008. pp.369-85.
27. Gotor-Fernández V et al. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Cat B: Enzym* 2006; 40: 111-20.
28. Ghanem A, Aboul-Enein HY. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron- Asymetr* 2004; 15: 3331-51.
29. Sá-Pereira P et al. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: Bom EPS, Ferrara MA, Corvo ML. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência; 2008. pp.433-62.
30. Godtfredsen SE. Lipases. In: Nagodawithana T, Reed G. *Enzymes in Food Processing*. San Diego: Academic Press; 1993. pp. 205-19.
31. Saxena RK et al. Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Meth* 2003; 52: 1-18.
32. Sharma R. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 2001; 19: 627-62.
33. Aires-Barros MR. Isolation and purification of lipases. In: Wooley P, Petersen SB. *Lipases: their structure, biochemistry and application*. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. pp. 243-70.
34. Mukherjee KD, Hills MJ. Lipases from plants. In: Wooley P, Petersen SB. *Lipases: their structure, biochemistry and application*. Cambridge: Cambridge University Press; 1994. pp. 49-75.
35. Desnuelle P. Pancreatic lipase. *Adv Enzymol Ramb* 1972; 23: 129-61.
36. Cygler M, Schrag JD. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Method Enzymol* 1997; 284: 3-27.
37. Shahani KM. Lipases and Esterases. In: Reed G. *Enzymes in Food Processing*. New York: Academic Press; 1975. pp. 181-217.
38. Nisha S et al. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chem Sci Rev Lett* 2012; 1: 148-55.
39. Godfrey T, West S. *Industrial Enzymology*. Macmillan Press Ltd: Hong Kong, 1996.
40. Kuwahara Y et al. Activity, recyclability, and stability of lipases immobilized on oil-filled spherical silica nanoparticles with different silica shell structures. *Chem Cat Chem* 2013; 5: 2527-36.
41. Bisen P et al. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnol Lett* 2010; 32: 1019-30.
42. Cao L. *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGa: Weinheim, 2005.
43. Almeida VM et al. Synthesis of naringin 6'-ricinoleate using immobilized lipase. *Chem Cent J* 2012; 6: 41-7.
44. Villeneuve P et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B- Enzym* 2000; 9: 113-48.
45. Severac E et al. Selection of Calb immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. *Enzyme Microb Tech* 2011; 48: 61-70.
46. Tomotani EJ, Vitolo M. Immobilized glucose oxidase as a catalyst to the conversion of glucose into gluconic acid using a membrane reactor. *Enzyme Microb Tech* 2007; 40: 1020-25.
47. Da Silva MAM et al. Síntese de Monoglicéridos catalisada por lipases em meio sem solvente. In: XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002, Natal, Brazil: Congresso Brasileiro de Engenharia; 2002 Aug 25-28; Natal, Brasil: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química; 2002. p.2924-29.
48. Kaewthong W et al. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochem* 2005; 40: 1525-30.
49. Vltavská P et al. Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials. *Eur J Lipid Sci Tech* 2012; 114: 849-56.
50. Garcia M et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monacapylin alone or in combination with acetic acid. *J Food Protect* 2007; 70: 1594-99.
51. Kollanoor A et al. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monacapylin and sodium caprylate). *Aquac Res* 2007; 38: 1293-1300.

Guebara *et al.*, World J Pharm Sci 2016; 4(6): 362-375

52. Pawongrat R et al. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem* 2007; 104: 251-58.
53. Yang T et al. Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chem* 2005; 92:101-7.
54. AOCS, American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the AOCS, 4th ed. Champaign, 1999.
55. Kozłowska M et al. Effects of spice extracts on lipid fraction oxidative stability of cookies investigated by DSC. *J Therm Anal Calorim* 2014; 118: 1697-1705.
56. Wirkowska M et al. Thermal properties of fats extracted from powdered baby formulas. *J Therm Anal Calorim* 2012; 110: 137-43.
57. Danthine S et al. Monitoring batch lipase catalyzed interesterification of palm oil and fractions by differential scanning calorimetry. *J Therm Anal Calorim* 2014; 115: 2219-29.
58. Mizobe H et al. Structures and Binary Mixing Characteristics of Enantiomers of 1-Oleoyl-2,3-dipalmitoyl-sn-glycerol (S-OPP) and 1,2-Dipalmitoyl-3-oleoyl-sn-glycerol (R-PPO). *J Am Oil Chem Soc* 2013; 90: 1809-17.
59. Ortiz SEM, Anón MC. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolates. *J Therm Anal Calorim* 2001; 66: 489-99.
60. Silva SAB et al. Differential scanning calorimetry study on caprylins. *J Therm Anal Calorim* 2015; 120: 711-17.
61. Janssen HG et al. The role of comprehensive chromatography in the characterization of edible oils and fats. *Eur. J Lipid Sci Technol* 2009; 111: 1171-1184.
62. Mu H et al. Chromatographic methods in the monitoring of lipase-catalyzed interesterification. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 111: 202-11.

ANEXO IV**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

1.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

ANEXO V**Carta de Dispensa do Comitê de Ética**

Eu, Sara Anunciação Braga Guebara, aluna de mestrado do programa de Pós-graduação do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, DECLARO que o projeto intitulado de: “Reação entre glicerol e ácido caprílico catalisada por lipase imobilizada” sob orientação do Prof. Dr. Michele Vitolo e co-orientação da Profa. Dra. Juliana Neves Rodrigues Ract não foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, visto que não envolve pesquisa com animais de quaisquer espécies ou com seres humanos.

Ciente,

São Paulo, 20 de Julho de 2016.

ANEXO VI

Ficha do Aluno

14/07/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 8727137/1 - Sara Anunciação Braga Silva

Email:	saraabraga@usp.br
Data de Nascimento:	10/12/1987
Cédula de Identidade:	RG - 42.527.395-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Mestrado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula:	31/01/2014
Início da Contagem de Prazo:	31/01/2014
Data Limite para o Depósito:	01/08/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Michele Vitolo - 31/01/2014 até o presente. Email: michenzi@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Juliana Neves Rodrigues Ract - 09/04/2014 até o presente. Email: julianaract@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 31/01/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 17/03/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 31/01/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016

Impresso em: 14/07/2016 11:55:48

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

14/07/2016

9134 - 8727137/1 - Sara Anunciação Braga Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5733-5/6	Uso Industrial de Enzimas	03/02/2014	06/04/2014	90	6	95	A	N	Concluída
FBT5768-4/3	Princípios de Fermentação Continua	07/02/2014	13/03/2014	75	5	90	A	N	Concluída
PSE5825-2/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5700-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	03/04/2014	04/06/2014	90	6	95	A	N	Concluída
VPS5717-5/3	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	09/05/2014	17/07/2014	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5735-7/1	Modificação Industrial de Óleos e Gorduras	02/10/2014	05/11/2014	75	5	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/07/2016

Impresso em: 14/07/2016 11:55:48