UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial

Sylvio Jorge Hares Júnior, M.Sc.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial

Sylvio Jorge Hares Júnior, M.Sc.

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Michele Vitolo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli

São Paulo

2017

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

Hares Júnior, Sylvio Jorge
H276c Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial / Sylvio Jorge Hares Júnior. - São Paulo, 2017.
93p. + anexos.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Vitolo, Michele
Co-orientador: Gioielli, Luiz Antonio

1. Hidrólise enzimática : Tecnologia química 2. Hidrólise enzimática : Bioquímica I. T. II. Vitolo, Michele, orientador. III. Gioielli, Luiz Antonio, co-orientador.

660.284425 CDD

Sylvio Jorge Hares Júnior

Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli
Orientador/ Presidente

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
1° examinador

Prof. a Dr.a Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
2° examinador

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Neves
3° examinador

São Paulo, outubro/ 2017

RESUMO

HARES JÚNIOR, S.J. **Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial.** 2017. 93pg. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mono e diacilgliceróis são produtos empregados na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e química como emulsificantes e melhoradores de viscosidade de produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. No entanto, a forma mais usual de obtê-los é por síntese química, o que acaba rendendo produtos finais caros e com atributos de qualidade, rendimento e de aplicabilidade tecnológica inferiores aos esperados. A busca por formas de obtenção mais racionais, eficientes e com melhor padrão de qualidade destes produtos foi o objetivo principal do trabalho, por meio de hidrólise parcial enzimática, que necessita de condições de reação mais brandas. Foram avaliadas a hidrólise enzimática descontína, empregando como substrato a trioleína técnica, e a hidrólise enzimática descontínua-alimentada, usando como substrato o óleo de girassol médio oléico. Foi utilizada, em ambos processsos, a lipase imobilizada *sn*-1,3 específica Lipozyme RM IM (de *Rhizomucor miehei).* A caracterização dos padrões e dos substrados, bem como o acompanhamento da formação dos produtos da hidrólise enzimática foram feitos por determinação da porcentagem de hidrólise, cromatografia em camada delgada (TLC), dos perfis das curvas de fusão e cristalização por calorimetria diferencial de varredura (DSC), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC). Os parâmetros de hidrólise descontínua foram o tempo de reação, a temperatura e a concentração inicial de substrato. Os parâmetros de hidrólise descontínua-alimentada foram tempo de enchimento e intervalo de alimentação de substrato. Para as respostas analíticas de porcentagem de hidrólise e de composição de frações lipídicas foi aplicado um modelo de regressão múltipla com base em metodologia de superfície de resposta. Os resultados experimentais observados nas reações de hidrólise enzimática descontínua de trioleína técnica mostraram de 24,7 a 34,2% de mono e diacilgliceróis (para 5% de óleo na emulsão) e de 21,4 a 33,6% de mono e diacilgliceróis (para 20% de óleo na emulsão). Os resultados experimentais observados nas reações de hidrólise enzimática descontínua-alimentada de óleo de girassol médio oléico (para 15% de óleo na emulsão), mostraram de 7,9 a 31,8% de mono e diacilgliceróis. Os modelos de superfície de resposta foram considerados significativos e preditivos. As hidrólises obtidas no formato descontínuo e descontínuo-

alimentado permitiram efetivamente a obtenção de frações de mono/ diacilgliceróis com vários graus de eficiência de conversão e com corretas identificação e quantificação das frações de lipídios procuradas. As correlações feitas entre porcentagem de hidrólise e entalpias de cristalização e fusão, corroboradas com os resultados qualitativos e/ou quantitativos diretos obtidos na cromatografia de camada delgada (TLC) e de HPSEC, demonstraram que estes atributos podem positivamente indicar a ocorrência efetiva de reação de hidrólise, além de auferir uma escala de desempenho de reação alinhada com o previsto na literatura, à medida que são aumentadas a temperatura, o tempo de hidrólise e a porcentagem inicial de substrato oleoso, sob regime descontínuo, e que puderam ser melhoradas, de forma inovadora, sob parâmetros de tempo total de alimentação e de intervalo de alimentação, sob regime descontínuo-alimentado. A hidrólise parcial enzimática de triacilgliceróis utilizando lipase imobilizada *sn*-1,3 específica pode ser considerada uma alternativa às vias químicas para a produção de misturas de mono e diacilgliceróis para utilização como aditivos químicos.

Palavras – chaves: monoacilgliceróis, diacilgliceróis, hidrólise enzimática, lipase, TLC, óleo de girassol médio oléico, HPSEC.

ABSTRACT

HARES JÚNIOR, S.J. **Enzymatic conversion of triacylglycerols to mono and diacilglycerols of industrial interest.** 2017. 93pg. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mono and diacylglycerols are products used in the food, pharmaceutical, cosmetic and chemical industries as emulsifiers and viscosity improvers for food products, cosmetics and pharmaceuticals. However, the most usual forms of obtaining them are by chemical synthesis, which ends up yielding expensive final products with attributes of quality, yield and technological applicability lower than expected. The search for more rational, efficient and better quality standards of these products was the aim of the work, through partial enzymatic hydrolysis, which requires milder reaction conditions. Discontinuous enzymatic hydrolysis was evaluated using technical triolein as substrate and discontinuous-fed enzymatic hydrolysis using as the substrate the mid oleic sunflower oil. In both processes, immobilized lipase sn-1,3 specific Lipozyme RM IM (from *Rhizomucor miehei*) was used. The characterization of the patterns and substrates, as well as the monitoring of the formation of the products from the enzymatic hydrolysis were made by determining the percentage of hydrolysis, thin layer chromatography (TLC), profiles of the melting and crystallization curves by differential scanning calorimetry (DSC), gas chromatography (GC) and high performance size exclusion chromatography (HPSEC). The parameters of discontinuous hydrolysis were the reaction time, the temperature and the initial substrate concentration. The parameters of discontinuous-fed hydrolysis were filling time and substrate feed interval. For the analytical responses of hydrolysis percentage and composition of lipid fractions a multiple regression model was applied based on response surface methodology. The experimental results observed in the reactions of discontinuous enzymatic hydrolysis of technical triolein indicated amounts of mono- and diacylglycerols from 24.7 to 34.2% (for 5% of oil in the emulsion) and from 21.4 to 33.6% for mono and diacylglycerols with 20% oil in the emulsion. The experimental results observed in the reactions of discontinuous-fed enzymatic hydrolysis of mid oleic sunflower oil (for 15% oil in the emulsion), showed from 7.9 to 31.8% of mono and diacylglycerols. Response surface models were considered significant and

predictive. The hydrolysis obtained in the discontinuous and discontinuous-fed form allowed to obtain fractions of mono / diacylglycerols with various degrees of conversion efficiency and with correct identification and quantification of the lipid fractions sought. The correlations between the percentage of hydrolysis and enthalpies of crystallization and fusion, corroborated with the qualitative and / or quantitative direct results obtained in thin layer chromatography (TLC) and HPSEC, showed that these attributes can positively indicate the effective occurrence of reaction of Hydrolysis, in addition to achieving a reaction performance scale in line with the literature, as the temperature rate, the hydrolysis time and the initial percentage of oily substrate are increased under a discontinuous regime and can be improved, in a innovative form, under parameters of total filling time and feeding interval, under a fed-batch regime. The partial enzymatic hydrolysis of triacylglycerols using specific sn-1,3-specific immobilized lipase may be considered an alternative to the chemical pathways for the production of mono- and diacylglycerol blends for use as chemical additives.

Keywords: Monoacylglycerols, diacylglycerols, enzymatic hydrolysis, lipase, TLC, mid oleic sunflower oil, HPSEC.

Hay hombres que luchan un día y son buenos, otros luchan un año y son mejores, hay quienes luchan muchos años y son muy buenos, pero están los que luchan toda la vida, y esos son lós imprescindibles !!!

Bertolt Brecht

Cada día sabemos más y entendemos menos !!!

Albert Einstein

Be hungry, be fool !!!

Steve Jobs

O que é necesssário não é a vontade de acreditar, mas o desejo de descobrir, o que é justamente o oposto !!!

Bertrand Russel

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, por estar sempre ao meu lado (por mais que eu não mereça) e por ter me guiado nesta e em todas as etapas da minha vida.

Ao meu pai, Sylvio Jorge (*in memorian*) pelo apoio necessário, pela formação do meu caráter e por me incentivar a lutar para a concretização dos meus sonhos.

À minha esposa Liliana, pelo apoio incondicional e pelo seu estímulo, alegria e ânimo, sem o qual minha vida estaria sem sentido e muito vazia.

À minha irmã Marici e ao meu tio Comandante Aviador Fábio B. Martins, por estarem sempre me acompanhado, durante todas as turbulências e mal tempo.

Às Professoras Marilena M. Hares e M. Elisa B. Martins, por terem sido minhas primeiras orientadoras e por me ensinarem a me aplicar nos estudos, por buscar o gosto do novo, por apreciar os novos conhecimentos, ter paixão pelo que se faz e ter a perseverança e a disciplina necessária para pesquisar e completar os trabalhos propostos.

Ao meu orientador, Professor Michele Vitolo e co-orientador, Professor Luiz Antonio Gioielli, com quem divido por igual todos os méritos deste trabalho. O padrão profissional, disciplina, paciência, humildade e sabedoria dos dois tornaram muito prazerosa e frutífera nossa convivência e contribuíram imensamente para meu desenvolvimento como profissional, pesquisador, acadêmico e futuro docente. O profissionalismo, generosidade, bondade, bom humor e compreensão demonstrados por eles sempre serão uma inspiração para mim, aonde quer que eu esteja.

Aos Professores Adalberto Pessoa e Bernardete Franco, que me receberam na primeira hora, me estimularam, me guiaram e me ajudaram a me encaixar dentro de um ambiente profissional tão diverso de onde eu estava trabalhando.

À Professora Lireny Gonçalves, ao Professor João Carlos, à Professora Carlota, à Professora Marina, ao Professor Ricardo Pinheiro, ao Professor Mauri, ao Professor Stephano e à Professora Juliana Ract, que, com muito carinho, real amizade, desapego, atenção e profissionalismo, prestigiaram e me alinharam durante a minha re-engenharia, para me tornar um melhor pós-graduando e profissional.

Às Dra. Roberta Claro, pela colaboração, amizade, suporte, paciência, conhecimento, experiência e camaradagem em todas as minhas fases de trabalho e vida no Depto.

Aos colegas secretários da CPG FCF Sueli e Irineu, pela orientação atenta, pela paciente revisão final da última versão do trabalho e pela amizade de sempre.

Aos Professores Daniel Arellano, Paula Badan e Renato Grimaldi, sem se esquecer da equipe técnica do LOG-laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Rosana e Ingrid), que me proporcionaram o aprendizado e a utilização de seus equipamentos de cromatografia HPSEC, CG e HPLC, para a devida validação de meus dados de hidrólise, quando ninguém mais se disponibilizou.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo privilégio da concessão de minha bolsa de pesquisa (processo nº 141159/ 2014-6).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização de minha necessária e sonhada pós-graduação.

SUMÁRIO

RESUMO.....v

PALAVRAS CHAVES.....vi

ABSTRACT.....vii

KEYWORDS.....viii

AGRDECIMENTOS.....x

SUMÁRIO.....xii

LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS xvi

LISTA DE TABELAS.....xviii

LISTA DE FIGURAS.....xxi

LISTA DE EQUAÇÕES.....xxiv

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Produtos 1

1.1.1 Monoacilgliceróis 1

1.1.2 **Diacilgliceróis** 2

1.2. Aspectos gerais sobre enzimas e aplicações 4

1.2. Lipases …..... 5

1.3.1 Fontes de lipases 6

1.3.2 Propriedades gerais das lipases 6

1.4. Aspectos gerais sobre reações catalisadas para a transformação de óleos e gorduras 7

1.5. Reações catalisadas por lipases …… 11

1.6 Substratos 13

1.6.1 Triacilgliceróis 13

1.7 Aspectos gerais sobre biorreatores 18

1.8 Produtos e processos de identificação/ quantificação 20

1.8.1 Técnicas para identificar e/ ou quantificar mono, di e triacilgliceróis 20

1.8.1.1 Calorimetria diferencial de varredura 20

1.8.1.2 Acidez (% de hidrólise) como indicador de desempenho de reação 20

1.8.1.3 Cromatografia em camada delgada para detectar e quantificar mono, di e triacilgliceróis 21

1.8.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência para detectar mono, di, triacilgliceróis.....22

1.9 Justificativa.....23

2. OBJETIVO.....24

2.1 Objetivos Específicos 24

3. MATERIAL E MÉTODOS 25

3.1 Material 25

3.2 Planejamento experimental.....26

3.2.1 Planejamento experimental fatorial central codificado para criação de superfície de resposta para condição de hidrólise enzimática em regime de reator descontínuo.....26

3.2.2 Planejamento fatorial central codificado para criação de superfície de resposta para condição de hidrólise enzimática em regime de reator descontínuo-alimentado..... 28

3.2.3 Análise estatística dos resultados 29

3.3 Procedimento experimental e métodos 30

3.3.1 Hidrólise de triacilglicerol em processo descontínuo.....30

3.3.2 Hidrólise de triacilglicerol por processo descontínuo-alimentado em reator com membrana..... 31

3.3.3 Extração da fração oleosa..... 32

3.3.4 Comportamentos de cristalização e fusão.....32

3.3.5 Determinação da porcentagem de hidrólise dos produtos resultantes da reação enzimática (ácidos graxos livres)..... 33

3.3.6 Determinação de acidez de óleos e gorduras..... 33

3.3.7 Identificação e quantificação de padrões e dos produtos resultantes da hidrólise (ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis) por TLC..... 33

3.3.8 Composição em ácidos graxos dos substratos oleosos..... 34

3.3.9 Composição triacilglicerólica dos substratos oleosos utilizados..... 34

3.3.10 Teor de acilgliceróis parciais do substrato oleoso e dos produtos hidrolisados determinado por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC)..... 35

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 34

4.1 Parâmetros de qualidade dos substratos triacilgliceróis e dos padrões lipídicos empregados.....35

4.2 Composição e qualificação das frações lipídicas nos subtratos triacilgliceróis e nos padrões lipídicos empregados 36

4.2.1 Qualificação e quantificação dos padrões e substratos por TLC..... 36

4.2.2 Composição em grupos lipídicos dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oleico por HPSEC..... 40

4.2.3 Identificação dos padrões e substrato trioleína técnica por DSC.... 42

4.2.4 Perfil de ácidos graxos do substrato óleo de girassol médio oléico..... 44

4.2.5 Composição em triacilgliceróis do substrato óleo de girassol médio oléico..... 45

4.3 Identificação, caracterização e quantificação das frações lipídicas do substrato hidrolisado de trioleína técnica em regime descontínuo por cromatografia em camada delgada (TLC), acidez (porcentagem de hidrólise) e por HPSEC..... 47

4.4 Identificação, caracterização e quantificação das frações lipídicas do substrato hidrolisado de óleo de girassol médio oléico em regime descontínuo-alimentado por cromatografia em camada delgada (TLC), acidez (porcentagem de hidrólise) e por HPSEC..... 69

5. CONCLUSÕES..... 82

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....83

7. ANEXOS..... 93

7.1 Artigo publicado em jornal indexado..... 93

Título: "Conversion of Triolein into Mono- and Diacylglycerols by Immobilized Lipase"

Data publicação online: 17 June 2017

Nome da publicação: Arabian Journal of Science and Engineering (AJSE)

DOI: 10.1007/s13369-017-2635-7

LISTA DE NOMENCLATURAS E SIGLAS

MAG	Monoacilgliceróis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAG	diacilgliceróis
AOCS	AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY
SER	Serina
HIST	Histidina
ASP	Aspartato
GLU	Glicina
ACCUREL[R]	Resina de troca iônica aditivada (fabricante : Membrana GmBH)
OO	Dioleína
OOO	Trioleína
PP	Dipalmitina
SS	Diestearina
EEC	Mercado Comum Europeu
U	Unidades industriais
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TAGs	Triacilgliceróis
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
WHO/FAO	Organização Mundial da Saúde /Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação

R_f	Frente de eluição das manchas ou “spots”, relativa a processos de cromatografia em camada delgada (**TLC**)
“spots”	Manchas de componentes separados e revelados, relativa a processos de identificação de compostos em cromatografia em camada delgada (**TLC**)
ΔH	Diferencial de entalpia (J/g)
ANOVA	Análise de variância
CG	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPSEC	Cromatografia de exclusão de compostos por tamanho de alta performance

LISTA DE TABELAS

1 Aplicações de lipases conforme o tipo de reações catalisadas.

2 Distribuição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras.

3 Composição típica de três variedades de óleo de girassol.

4 Composição típica do óleo de girassol desodorizado.

5 Características físico-químicas do óleo de girassol comum e da variedade alto oleico.

6 Leis de adição em reatores descontínuo-alimentados.

7 Exemplos de processos para a obtenção de monoacilgliceróis via glicerólise enzimática.

8 Variáveis independentes codificadas dos parâmetros de processo para tratamento da superfície de resposta nas reações de hidrólise de substrato trioleína para 5 e 20% de óleo na emulsão inicial.

9 Matriz para planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central e pontos axiais para tratamento da superfície de resposta com as variáveis nas unidades codificadas e originais para 5 e 20% de óleo na emulsão inicial.

10 Variáveis independentes codificadas dos parâmetros de processo para tratamento da superfície de resposta nas reações de hidrólise de substrato óleo de girassol médio oléico para 15% de óleo na emulsão inicial.

11 Matriz para planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central e pontos axiais para tratamento da superfície de resposta com as variáveis nas unidades codificadas e originais para 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial.

12 Índice de acidez dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico e dos padrões trioleína, 1-monoleína e 1,3-dioleína.

13 Valores de R_f do óleo de girassol médio oléico e das trioleínas com 99% e 65% de pureza, bem como dos padrões de monooleína, dioleína e ácido oléico.

14 Validação da metodologia JustTLC® pela comparação dos percentuais de ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triaciglicerois presentes na mistura padrão com os percentuais de cada componente avaliados pelo *software*.

15 Composição e quantificação comparativa, por análise de TLC/HPSEC, dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico.

16 Dados calorimétricos (temperaturas onset e endset e entalpias) de cristalização e fusão do substrato trioleína técnica e padrões dos acilgliceróis.

17 Composição em ácidos graxos do óleo de girassol comum e óleo de girassol alto e médio oleico.

18 Composição em triacilgliceróis do óleo de girassol normal e óleo de girassol alto e médio oleico.

19 Distribuição de ácidos graxos na trioleína.

20 Distribuição de ácidos graxos no óleo de girassol médio oléico.

21 Trioleína residual (RT), MAGs/DAGs (M/D) e FFAs presentes no hidrolisado pela ação da lipase imobilizada em emulsão de trioleína/água a 5%.

22 Trioleína residual (RT), MAGs/DAGs (M/D) e FFAs presentes no hidrolisado pela ação da lipase imobilizada numa emulsão de trioleína/água a 20%.

23 Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 5% de óleo ($p \leq 0,05$).

24 Análise de variância (ANOVA) para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 5% de óleo ($p \leq 0,05$).

25 Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 20% de óleo ($p \leq 0,05$).

26 Análise de variância (ANOVA) para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 20% de óleo ($p \leq 0,05$).

27 Composição e quantificação comparativa por análise de TLC, acidez e HPSEC dos produtos hidrolisados por via descontínua a partir do substrato trioleína técnica.

28 TAGs residuais, formação de MAGs/DAGs e de ácidos graxos livres (FFAs), após

hidrólise enzimática descontínua-alimentada a 50 ºC de emulsão de óleo de girassol médio oléico/água a 15%.

29 Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), triacilgliceróis residuais (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 15% de óleo de girassol médio oléico ($p \leq 0,05$)

30 Análise de variância (ANOVA) para a formação de mono e diacilgliceróis (TLC), triacilgliceróis residuais (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 15% de óleo de girassol médio oléico ($p \leq 0,05$).

31 Composição e quantificação comparativa, por análise de TLC/acidez/HPSEC, dos produtos hidrolisados a partir do substrato emulsão a 15% de óleo girassol médio oléico via hidrólise descontínua-alimentada.

LISTA DE FIGURAS

1 Esquema de reação de obtenção de MAGs por hidrólise ou alcoólise enzimática.

2 Etapas da reação de glicerólise (1–3) e hidrólise (4–6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.

3 Hidrólise catalisada por lipase. Triacilglicerol (TAG); diacilglicerol (DAG); monoacilglicerol (MAG); ácido graxo livre (AGL).

4 Mecanismo de catálise por lipases.

5 Esquema de metodologia empregada para hidrólise descontínua do substrato lipídico (trioleína técnica).

6 Esquema de metodologia empregada para hidrólise descontínua-alimentada do substrato lipídico (óleo de girassol médio oléico).

7 Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão de ácidos graxos livres e acilgliceróis. Spot 1 = mistura em partes iguais dos padrões lipídicos puros (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína), Spot 2 = 1-monooleína, Spot 3 = 1,3-dioleína, Spot 4 = ácido oléico, Spot 5 = trioleína técnica e Spot 6 = trioleína pura); MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

8 Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão de ácidos graxos livres e acilgliceróis e óleo de girassol médio oléico. Spot 1 = mistura em partes iguais dos padrões lipídicos puros (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spot 2 = 1-monooleína, Spot 3 = 1, 3-dioleína, Spot 4 = ácido oléico, Spot 5 = trioleína pura, Spot 6 = trioleína técnica e Spots 7-10 = óleo de girassol médio oléico; MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

9 Cromatograma HPSEC representativo de óleo de girassol médio oléico. Tempo de retenção (min): 16,41, triacilgliceróis; 18,76, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres.

10 Cromatograma HPSEC representativo de trioleína técnica. Tempo de retenção (min): 16,35, triacilgliceróis; 17,02, diacilgliceróis; 18,45, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres.

11 Curvas de cristalização dos padrões empregados: trioleína técnica, trioleína 99%, 1-monoleína 99% e 1,3–dioleína 99%.

12 Curvas de fusão dos padrões empregados: trioleína técnica, trioleína 99%, 1-monoleína 99% e 1,3–dioleína 99%

13 Análise por cromatografia de camada delgada (TLC) de mistura padrão e produtos de hidrólise de emulsão 20% O/A de trioleína técnica. Spot 1 = mistura padrão (1-

monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spots 2-4 = hidrolisados a 60 ºC/2 h), Spots 5–7 = hidrolisados a 40ºC/4 h), Spots 8-10 = hidrolisados a 50 ºC/3 h); MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

14 Hidrólise enzimática descontínua da trioleína técnica (teor inicial de óleo na emulsão = 5%) e formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácido oleico.

15 Hidrólise enzimática descontínua da trioleína técnica (teor inicial de óleo na emulsão = 20%) e formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácido oléico

16 Superfície de resposta para a formação de mono e diacilgliceróis para substrato com 5% de óleo na emulsão inicial.

17 Superfície de resposta para o consumo de trioleína na condição de 5% de óleo na emulsão inicial.

18 Superfície de resposta para a formação de ácidos graxos livres para substrato com 5% de óleo na emulsão inicial.

19 Superfície de resposta para a formação de mono e diacilgliceróis para emulsão inicial com 20% de óleo.

20 Superfície de resposta para formação de ácidos graxos livres na emulsão com 20% de óleo.

21 Superfície de resposta para trioleína residual para emulsão com 20% de óleo.

22 Correlação entre resultados de TLC e percentual de hidrólise para a formação de ácidos graxos livres, para emulsão com 5% de óleo.

23 Correlação entre resultados de TLC e percentual de hidrólise para a formação de ácidos graxos livres, para emulsão com 20% de óleo.

24 Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (60 °C/2 h).

25 Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (50 °C/3 h).

26 Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (60 °C/4 h).

27 Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (60 °C/2 h).

28 Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (50 °C/3 h).

29 Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (65 °C/3 h)

30 Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão, padrões de acilgliceróis, óleo de girassol médio oléico e produtos de hidrólise de emulsão 15% O/A de óleo de girassol médio oléico. Spot 1 = trioleína técnica, Spot 2 = óleo de girassol médio oléico, Spot 3 = mistura padrão (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spot 4 = trioleína 99%, Spot 5 = 1,3-dioleína 99%, Spot 6 = 1-monoleína 99%, Spot 7 = ácido oléico 99%, Spots 8 = hidrolisados em tempo total de 5,4 h/1,5 h de intervalo de alimentação, Spots 9 = hidrolisados em tempo total de 4,0 h/2,9 h de intervalo de alimentação; MAG monoacilgliceróis, DAG diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

31 Superfície de resposta para a porcentagem de formação de mono e diacligliceróis para substrato com 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial.

32 Superfície de resposta para a porcentagem de consumo de triacilgliceróis para condição de 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial.

33 Superfície de resposta para a porcentagem de formação de ácidos graxos livres (acidez) para substrato com 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial.

34 Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 3 h/ intervalo de alimentação 0,5 h)

35 Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 4 h/ intervalo de alimentação 0,1 h)

36 Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 5 h/ intervalo de alimentação 0,5 h)

LISTA DE EQUAÇÕES

1 Etapas da reação de glicerólise (1).

2 Etapas da reação de glicerólise (2).

3 Etapas da reação de glicerólise (3).

4 Etapas da reação de hidrólise (4).

5 Etapas da reação de hidrólise (5).

6 Etapas da reação de hidrólise (6).

7 Equação de porcentagem de hidrólise.

8 Equação polinomial de segunda ordem para hidrólise de trioleína técnica.

9 Equação teórica polinomial de formação de MAGs/DAGs à partir da hidrólise da emulsão 5% de trioleína técnica.

10 Equação teórica polinomial de trioleína residual à partir da hidrólise da emulsão 5% de trioleína técnica.

11 Equação teórica polinomial de formação de FFAs à partir da hidrólise da emulsão 5% de trioleína técnica.

12 Equação teórica polinomial de formação de MAGs/DAGs à partir da hidrólise da emulsão 20% de trioleína técnica.

13 Equação teórica polinomial de formação de FFAs à partir da hidrólise da emulsão 20% de trioleína técnica.

14 Equação teórica polinomial de trioleína residual à partir da hidrólise da emulsão 20% de trioleína técnica.

15 Equação teórica polinomial de formação de MAGs/DAGs à partir da hidrólise da emulsão 15% de óleo de girassol médio oléico.

16 Equação teórica polinomial de trioleína residual à partir da hidrólise da emulsão 15% de óleo de girassol médio oléico.

17 Equação teórica polinomial de formação de FFAs à partir da hidrólise da emulsão 15% de óleo de girassol médio oléico.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos

1.1.1. Monoacilgliceróis

Monoacilgliceróis (MAGs) são os mais utilizados emulsificantes em alimentos, produtos farmacêuticos e indústrias de cosméticos (THUDE *et al*., 1997). Na indústria farmacêutica, os MAGs são utilizados como ligantes em comprimidos e como emolientes para medicamentos transdérmicos de liberação lenta (emplastos, por exemplo). Na indústria de alimentos, os MAGs são os emulsificantes alimentares mais comuns para produtos de panificação, margarinas, produtos lácteos, doces e molhos (JACKSON & KING, 1997). Na indústria de cosméticos, são usados como agentes de texturização e para melhorar a consistência de cremes e loções (STEVENSON *et al*., 1993). Além disso, como são excelentes lubrificantes e possuem propriedades plastificantes, eles encontram uso também na indústria textil, no processamento e produção de plásticos e na formulação de óleos lubrificantes para máquinas (COTERON *et al*., 1998).

MAGs são moléculas anfipáticas de importância nos contextos industriais e biológicos. MAGs e outros hidrocarbonetos alifáticos substituídos têm muitas formas polimórficas que são geralmente classificados como α, β-prima ou β, com base no seu modo de empacotamento de cadeia. Em sistemas com MAGs, a forma α é em geral a menos estável (KODALI *et al*., 1985).

MAGs são surfactantes não iônicos, que possuem o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration*-USA), não apresentando efeitos colaterais quando ingeridos ou postos em contacto com a pele, por serem basicamente monoésteres formados por ácidos graxos e glicerol (FREITAS *et al*., 2008).

A produção mundial de MAGs em 2005 foi estimada em cerca de 180 mil t por ano, das quais, aproximadamente, 85 mil t são consumidas nos EUA, correspondendo a 70% do total de emulsificantes usados na indústria alimentícia (FREITAS *et al.*, 2008).

Em 1999, o mercado mundial de emulsionantes utilizado em alimentos foram estimados em cerca de 3×10^5 toneladas, dos quais a monoleína (MAG) representou cerca de 10% (GHAMGUI *et al.*, 2006).

Normalmente, os MAGs são sintetizados quimicamente via glicerólise de TAGs empregando catalisadores inorgânicos ($Ca(OH)_2$, NaOH) a 220-250 °C (SONNTAG, 1982).

Recentemente, a síntese de MAGs catalisada por lipases tem sido estudada intensamente como alternativa ao método convencional, devido, principalmente, à utilização de condições reacionais brandas, que implicam em baixo consumo energético e à seletividade das lipases, o que resulta em produtos de melhor qualidade. Além disso, a exploração da especificidade dessas enzimas possibilita a síntese de

produtos que não poderiam ser obtidos pela rota química convencional. Cabe ressaltar que do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente limpo e seguro (FREITAS *et al.*, 2008).

FLENKER, SPENER (1990) hidrolisaram óleo de mamona usando uma lipase 1,3 específica de *Rhizopus arrhizus*. Os melhores resultados foram obtidos a pH 7,5 com formação de 23% de MAGs (principalmente monoricinoleína) e 66% de ácido ricinoléico, após 3 h de reação.

Três metodologias são descritas para a obtenção de MAGs por catálise enzimática, empregando lipases: a hidrólise ou alcoólise de TAGs, glicerólise de TAGs e esterificação ou transesterificação de glicerol com ésteres de ácidos graxos. O primeiro método fornece 2-MAGs, enquanto o segundo e terceiro usualmente fornecem uma mistura de MAGs, na qual 1(3)-MAG é o composto predominante, geralmente obtido com rendimento elevado (FREITAS *et al*., 2008).

A hidrólise enzimática usando lipases oferece um processo alternativo para a produção de MAGs em condições moderadas, requerendo, entretanto, um controle rígido da reação para evitar hidrólise completa. Para superar esta limitação é recomendado o uso de lipases 1,3-específicas, o que resulta na formação de 2-MAGs, como mostrado na Figura 1 (FREITAS *et al*., 2008).

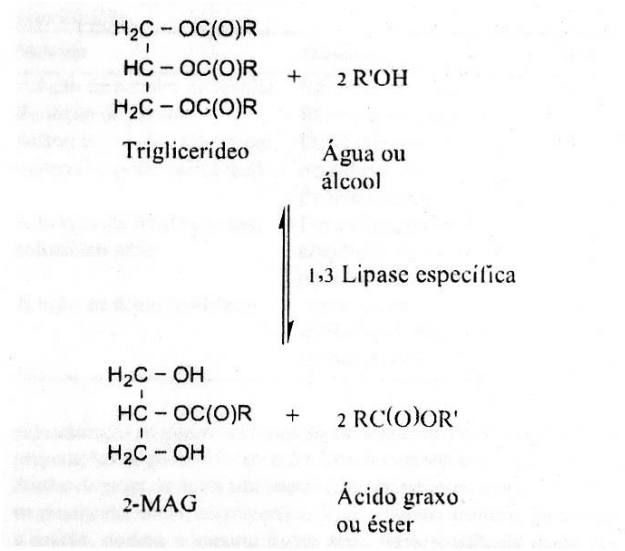


Figura 1 - Esquema de reação de obtenção de MAGs por hidrólise ou alcoólise enzimática (FREITAS *et al*., 2008)

1.1.2. Diacilgliceróis

Os diacilgliceróis (DAGs) são emulsificantes utilizados na indústria alimentícia, cosmética (como

estabilizantes de emulsões) e farmacêutica (como ligantes em comprimidos e como emolientes) (BOYLE & GERMAN, 1996).

Atualmente, a produção de DAGs em escala industrial é realizada pela reação de glicerólise (transesterificação) a partir de glicerol e triacilgliceróis (TAGs) de óleos vegetais, empregando-se altas temperaturas (acima de 240ºC) e catalisadores químicos. Os rendimentos obtidos são relativamente baixos e os produtos são geralmente de baixa qualidade (BOYLE & GERMAN, 1996). Em geral, o produto final torna-se de cor escura e de odor desagradável, decorrentes da formação de produtos indesejáveis obtidos devido às reações de polimerização (FREGOLENTE, 2006).

Por outro lado, podem ser obtidos também por processos enzimáticos, cujos benefícios foram observados anteriormente (FREGOLENTE *et al.*, 2009). Dependendo da metodologia e da enzima aplicadas pode-se garantir maiores rendimentos em reações com temperaturas próximas a ambiente, o que proporciona produtos de qualidade superior, com economia de energia e reduzida formação de subprodutos (KOBLITZ, 2003).

Os MAGs e os DAGs são os produtos mais valiosos que se obtém em reações de hidrólise/glicerólise. Por apresentarem parte da molécula hidrofílica (glicerol) e parte hidrofóbica (ácido graxo), os MAGs ou misturas destes com DAGs possuem importantes aplicações industriais, representando de 70 a 75% de todos os emulsificantes sintéticos (MOQUIN *et al.,* 2005).

Os DAGs foram aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para uso como emulsificantes e aceitos como *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (Geralmente Reconhecido como Seguro) em 2000, sendo aprovados para diversas aplicações em alimentos. Recentemente, produtos lipídicos contendo mais que 80% de DAGs adicionados aos alimentos foram relacionados, com diversos benefícios à saúde (BLASI *et al.*, 2007).

Consequentemente, os óleos com altas concentrações de DAGs têm chamado a atenção como óleos úteis para utilização em várias aplicações alimentares. Os DAGs podem ser aplicados em emulsões O/A, tais como maioneses e molhos para salada, e em emulsões A/O (como margarinas e cremes vegetais), recheios cremosos, confeitos, gordura culinária, alimentos fritos (batata frita, bolos fritos e donuts), glacês e sorvetes. Em gordura de palma, DAGs são responsáveis pela inibição de nucleação durante o processo de cristalização, e a presença de DAGs em gordura interesterificada pode reduzir os sólidos cristalizados e aumentar a cremosidade em margarinas. Os DAGs originados da hidrólise dos TAGs representam 5-8% do óleo de palma refinado (TAN & CHE MAN, 2002).

Os DAGs têm duas formas isoméricas, a sn-1,3-DAG e a sn-1,2(2,3)-DAG, com uma razão isomérica natural de aproximadamente 7:3. Os DAGs tem a mesma biodisponibilidade e valor calórico que os TAGs (NG *et al*., 2014).

Em função de ter um grupo hidroxila livre, os DAGs têm hidrofilicidade um pouco mais elevada, em comparação com os TAGs, e isto pode ser responsável pelas suas propriedades físico-químicas (ponto de fusão e propriedades químicas interfaciais) que são diferentes dos TAGs (SABERI *et al*., 2011).

Misturas de MAGs e DAGs são usadas em alimentos industrializados em quantidades da ordem de 85 milhões de kg/ano nos Estados Unidos**.** As diretivas da Organização Mundial de Saúde (OMS) requerem que estas misturas (EEC, código 471) tenham pelo menos 70% de MAGs + DAGs, e um mínimo

de 30% em MAGs, e que os conteúdos de glicerol e TAGs estejam abaixo de 10% (ARCOS & OTERO, 1996).

Os principais efeitos dos emulsificantes ocorrem nas etapas de nucleção e crescimento dos cristais de gordura, modificando as propriedades físicas do sistema, como tamanho dos cristais e conteúdo de gordura sólida. Geralmente, grupos acil similares entre as gorduras e os emulsificantes promovem a cristalização, enquanto grupos acil diferentes retardam o desenvolvimento dos cristais. Acilgliceróis parciais insaturados tendem a aumentar a fração líquida da gordura, retardando a cristalização e acelerando as transformações de fase para formas polimórficas mais estáveis. Adicionalmente, estes emulsificantres insaturados provavelmente criam imperfeições locais nos cristais que facilitam a mobilidade dos TAGs e a transição polimórfica de β′ para β (ACEVEDO *et al*., 2012).

1.2. Aspectos gerais sobre enzimas e aplicações

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que atuam a altas temperaturas. Além disso, estes catalisadores possuem baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados e requerem uma etapa posterior de purificação. As enzimas são biocatalisadores protéicos formados por longas cadeias de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, agitação, pH e pressão, acelerando a reação a valores iguais ou superiores àqueles proporcionados *pelos c*atalisadores químicos convencionais. Além disso, a biocatálise leva à baixa ou nenhuma formação de produtos colaterais indesejáveis – que poderiam dificultar a separação do produto desejado - assim como os resíduos não são agressivos ao meio ambiente (MENDES *et al*., 2011).

A maioria das enzimas sintetizadas pelas células é retida para funções intracelulares (sobretudo para a obtenção de energia e multiplicação). As enzimas extracelulares liberadas no meio de cultivo têm a função de permitir à célula obter nutrientes indispensáveis para sua manutenção e viabilidade (ZANOTTO, 2003).

As enzimas têm sido empregadas em diversos segmentos, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, metodologias analíticas por meio de construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, aditivos, papel e celulose, têxtil e de cosméticos (MENDES *et al*., 2011).

Estimativas apontaram que o mercado mundial de enzimas, no período de 2005 a 2013, apresentou um crescimento médio entre 4% e 6%, envolvendo valores da ordem de US$ 2,4 bilhões (2005), US$ 5,1 bilhões (2008), US$ 6,5 bilhões (2013), sendo que a demanda global por enzimas está prevista para crescer em média 4,6% até 2020, para US$ 7,2 bilhões. Este mercado inclui enzimas utilizadas em aplicações industriais (alimentos e bebidas, produtos de limpeza, produção de

biocombustíveis, alimentos para animais e outros mercados) e aplicações especiais (pesquisa e biotecnologia, diagnósticos e biocatalisadores). Alimentos e bebidas continuarão a ser o maior mercado de enzimas por valor, com ganhos impulsionados pelo aumento do consumo de produtos contendo enzimas nas regiões em desenvolvimento. Quase todos os mercados industriais terão um crescimento saudável, com exceção dos biocombustíveis, devido à falta de incentivos dos governos regionais que estará prejudicando a expansão do modelo desta matriz energética (FREEDONIA GROUP, 2017).

1.3. Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à família das hidrolases, atuando na interface orgânico-aquosa demonstrando níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes aquosos e não aquosos, ao contrário de outras enzimas (HASAN *et al*., 2006). A função biológica da lipase é catalisar a hidrólise de longas cadeias de triacilgliceróis (TAGs), formando ácidos graxos e glicerol, além de realizarem esterificação, isto é, a síntese reversa a partir de ácidos graxos de cadeias curtas (menos de dez átomos de carbono) ou longas (dez ou mais átomos de carbono) e glicerol (SAXENA *et al*., 1999; GUEBARA *et al*., 2016).

As lipases são enzimas que atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. Elas podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Catalisam a hidrólise de TAGs de cadeia longa, levando à formação de ácidos graxos, MAGs, DAGs e glicerol. A hidrólise de TAGs utilizando lipases é uma reação reversível e, portanto, o equilíbrio pode ser alterado através da variação da concentração de reagentes e/ou produtos (ABDEL-FATTAH & GABALLA, 2008).

A aplicação de lipases imobilizadas está se mostrando de grande interesse em indústrias de oleoquímica, pelas vantagens sobre as reações químicas convencionais (CHEW *et al.,* 2008). McNEILL *et al.* (1992) já demonstravam ser interessante o processo de síntese de MAGs e DAGs a partir de TAGs, utilizando lipases como catalisadores, pela alta especificidade e atividade em temperaturas relativamente baixas. Estes autores, também, realçaram que a qualidade dos MAGs e DAGs obtidos por via enzimática era superior à da síntese por via química.

A Tabela 1 ilustra algumas das possibilidades de uso, em escala industrial, das lipases em diferentes áreas.

Tabela 1 – Aplicações de lipases conforme o tipo de reações catalisadas.

Tipos de reações	Áreas de aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (processamento de óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleos	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicérides no sangue	Kits para diagnósticos
	Indústria farmacêutica	Síntese de intermediários em medicamentos	Antiinflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen)
Transesterificação	Química	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de biodiesel

[Fonte: DURLI, 2007]

1.3.1. Fontes de lipases

As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), vegetal e microbiana (bactérias e fungos) (MARTINS *et al*., 2008). Industrial e economicamente, as lipases microbianas apresentam uma série de vantagens em relação às lipases de origem animal e vegetal. As lipases de micro-organismos são em sua maioria extracelulares, apresentando procedimento mais fácil de extração, isolamento e purificação tendo custo de produção menor, são mais estáveis e possuem propriedades distintas das lipases de origem animal e vegetal (DALLAVECCHIA *et al.,* 2004).

1.3.2. Propriedades gerais das lipases

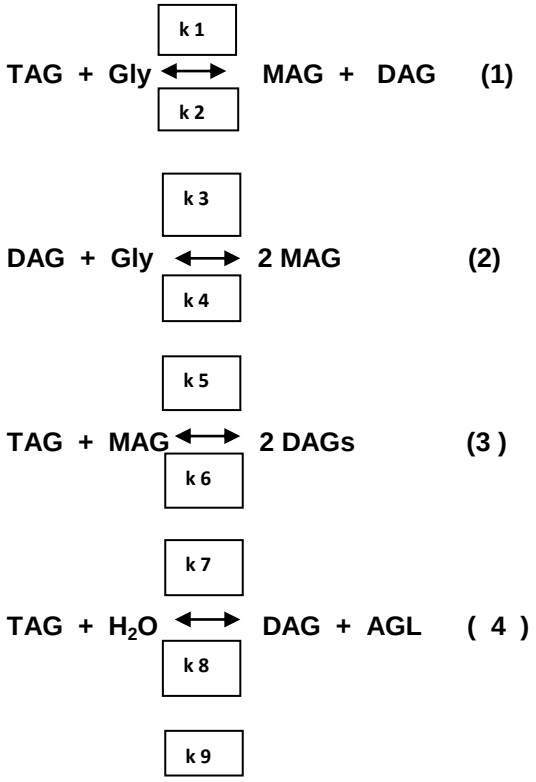
As lipases são enzimas que catalisam a hidrólise total ou parcial do triacilglicerol liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol (Figura 2), agindo apenas na interface óleo/água, podendo catalisar, também, reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em solventes orgânicos (JAEGER & REETZ, 1998).

Dependendo da fonte, a massa molecular das lipases pode variar entre 20 a 75 kDa, a atividade em pH na faixa de 4 a 9 e temperatura entre a ambiente até 70 °C, mas com atividade ótima na faixa entre 35 e 50 °C, variando sua termoestabilidade consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as de melhor estabilidade térmica (CASTRO *et al.,* 2004).

As lipases são classificadas em função da relação da sua especificidade ao substrato e são classificadas em três grupos: A) Lipases 1,3 específicas: liberam ácidos graxos resultantes da catálise especificamente nas posições sn-1,3 dos acilgliceróis. As fontes mais conhecidas de lipases com essas características são a lipase pancreática, as lipases de colza, mostarda e lupino e as lipases de *Aspergillus niger, Mucor miehei e Rhizopus delemar;* B) Lipases ácido graxos específicas: são biocatalisadores hidrolíticos de tipos específicos de grupos acil nas moléculas de TAG, onde são hidrolisados preferencialmente grupos acil de cadeia longa que contém dupla ligação *cis* na posição 9, como a lipase da levedura *Geotrichum candidum;* C) lipases não específicas: catalisam aleatoriamente a hidrólise de TAG para ácidos graxos livres e glicerol não mostrando especificidade com relação ao grupo acil ou à posição de esterificação no glicerol. São exemplos, as lipases produzidas por *Penicilium cyclopium*, *Corynebacterium acnes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Candida cylindracea* (CARVALHO *et al.,* 2006; CASTRO & ANDERSON, 1995; CASTRO *et al.*, 2004).

1.4. Aspectos gerais sobre reações catalisadas para transformação de óleos e gorduras

Hidrólise/glicerólise são reações que produzem MAGs e DAGs a partir de moléculas de TAGs, podendo ser representadas pelas seis etapas indicadas da Figura 2, sendo que as etapas representadas pelas Equações (1) a (2) indicam as reações envolvidas na glicerólise e as etapas representadas pelas Equações (3) a (6) indicam as reações de hidrólise que podem ocorrer paralelamente caso haja água suficiente no meio. (KRÜGER, 2010).



$$DAG + H_2O \underset{k\,10}{\longleftrightarrow} MAG + AGL \quad (5)$$

$$MAG + H_2O \underset{k\,12}{\overset{k\,11}{\longleftrightarrow}} Gly + AGL \quad (6)$$

Figura 2 - Etapas da reação de glicerólise (1 –3) e hidrólise (4 –6). Onde: Gly = glicerol e AGL = ácidos graxos livres.

Como mostrado na Figura 2, um mol de TAG reage com um mol de glicerol produzindo um mol de MAG e um mol de DAG. Então, um mol de DAG reage novamente com um mol de glicerol para a formação de outros dois moles de MAGs (FREGOLENTE, 2006). Ou seja, teoricamente, a glicerólise de um mol de TAG e dois moles de glicerol pode produzir três moles de MAGs. Entretanto, o rendimento em MAGs depende do equilíbrio estabelecido em diferentes condições (CHEIRSILP *et al*., 2007).

A presença de água no sistema, se controlada, pode aumentar a conversão de TAGs em DAGs [Equação (4)] e este em MAGs [Equação (5)], mas se não houver controle na quantidade de água presente, estes substratos podem ser convertidos em ácidos graxos livres [Equação (6)]. Cabe salientar que as etapas de hidrólise podem ocorrer paralelamente à de glicerólise e que a partir de baixas concentrações de água no meio, ácidos graxos livres já começam a ser formados (TEMELLI *et al.*, 1996).

Além disso, o teor de água em estudos de enzimas em meio orgânico é uma etapa fundamental, uma vez que esta definirá, por exemplo, algumas propriedades da enzima, como atividade, estabilidade e especificidade. Sabe-se que a quantidade de água certa é necessária para preservar ativa a conformação da enzima. Por outro lado, o excesso de água no meio reacional promove a hidrólise dos substratos e a diminuição do rendimento dos produtos da glicerólise (ZHENG *et al.*, 2009; KUMARI *et al.*, 2009). MOQUIN *et al.* (2005), em seu estudo de glicerólise**,** utilizando dióxido de carbono supercrítico**,** consideraram a presença de mais de 8% (p/p) de água no meio reacional para aumento da formação de MAGs.

Desta forma, sendo um dos mais consagrados canais para a preparação de mono e diacilgliceróis, a glicerólise de gorduras e óleos de origens animal e vegetal envolve uma reação entre óleo ou gordura e glicerol a altas temperaturas (cerca de 290 ºC) durante 4 horas, na presença de um catalisador básico, como NaOH ou KOH, utilizado na proporção de 0,05-0,20% (com base no peso da gordura empregada). No caso dos mono e diacilgliceróis utilizados na indústria alimentar, cal hidratada, $Ca(OH)_2$, é preferida, devido ao baixo desenvolvimento de cor no produto final, usando níveis de catalisador entre 0,06-0,10% (SONNTAG, 1882). As quantidades de produtos resultantes, dependendo da relação molar entre glicerol e triacilgliceróis utilizada no meio reacional, poderão ser de 35 a 60% (p/p) de MAGs, 35 a 55% (p/p) de

DAGs; 1 a 20% (p/p) de TAGs e 1 a 10% (p/p) de ácidos graxos livres (FERREIRA-DIAS *et al.*, 2001; DAMSTRUP *et al.*, 2005; CHEIRSILP *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2008).

Ao término da reação, o catalisador deve ser neutralizado com ácido fosfórico para evitar a reversão da reação (em cerca de 30%) e também para evitar características indesejáveis da mistura final tais como um sabor de sabão, cor instável e formação de espuma devido à presença do citado catalisador (cerca de 35% sobre a quantidade final produzida). Após o processo, os produtos são filtrados em argila diatomácea, com grande quantidade de solvente, onde acaba retida uma proporção considerável de MAGs / DAGs (cerca de 21%). Alguns subprodutos indesejáveis são formados durante a neutralização da cal hidratada, deixando esta operação de filtragem com uma conotação problemática, havendo necessidade de duas ou três filtrações extras de passagem para reduzir as perdas de MAGs / DAGs a um mínimo patamar (cerca de 4-5% do total sobre o montante esperado) (CORMA *et al.,* 1998).

Ao se acrescentar todos os pontos controversos do processo e as perdas de produtividade, tais como alta temperatura, uso de catalisador básico, risco eminente de uma reversão da reação, as características indesejáveis dos produtos obtidos da mistura final, a grande quantidade de solvente e a filtragem problemática, todos estes pontos formam um rol de elementos críticos que devem ser considerados quando se discute sobre o desempenho real do processo químico e suas reais eficiência e eficácia.

A utilização de catalisadores enzimáticos para a reação enzimática com gorduras na presença de água em excesso (Figura 1) é uma das mais interessantes formas de hidrólise, uma vez que a reação prossegue sob condições suaves de pressão e temperatura com especificidade e baixa geração de resíduos. Esta tecnologia é atualmente utilizada na produção de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, agentes aromatizantes para produtos lácteos, sabões industriais e detergentes comerciais para lavanderias e usos domésticos, entre outros usos (VILLENEUVE *et al.,* 2000).

Existem três benefícios principais fornecidos pela hidrólise enzimática: especificidade, condições suaves e desperdício reduzido. No que se refere à especificidade: as enzimas são usadas para modificar cadeias químicas específicas, geralmente em uma parte específica da molécula, em contraste com as reações químicas gerais que ocorrem aleatoriamente levando em consideração as leis da termodinâmica. Pode ser possível, selecionando a enzima certa, gerenciar os produtos certos a serem produzidos. Se a enzima não catalisa a formação de outros produtos, essas reações secundárias são minimizadas. Um segundo benefício é que toda a reação ocorre em condições suaves (temperatura inferior a 70 ºC e pH entre 4,0 e 8,0). Mesmo assim, como são catalisadores eficazes, fornecem taxas de reação razoáveis nestas condições. Ao contrário, as reações químicas podem requerer alta temperatura ou pressão para conseguir taxas satisfatórias em uma planta de processo químico, o que significa operação a um custo de capital e energia muito mais alto (POSORSKE, 1984). De fato, as lipases podem catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (TAGs) levando à formação de ácidos graxos livres (FFAs), MAGs, DAGs e glicerol,

havendo, no entanto, a necessidade de um controle rigoroso de processo para evitar a hidrólise completa (ABDEL-FATTAH & GABALLA, 2008). Neste caso, o uso de lipases *sn*-1,3 específicas de *Mucor miehei*, que têm a atividade mais elevada em trioleína, garante previsibilidade maior de controle de processo (RAHMAN *et al.,* 2005).

Por fim, os processos enzimáticos tendem a ter custos de tratamento de resíduos mais baixos. As enzimas são biodegradáveis e, uma vez que normalmente são dosificadas a 0,1-1,0% por massa do substrato, a contribuição da enzima para a contabilização da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) na corrente de resíduos é negligenciável. O nível destes benefícios pode ser observado em várias indústrias que utilizam processos baseados em enzimas, incluindo a indústria de edulcorantes à base de milho, a de tratamento de esgotos, a indústria de sucos de frutas e a indústria de queijos (POSORSKE, 1984).

A título de exemplo, uma das melhores utilizações da hidrólise enzimática, sob a ótica do respeito ao meio ambiente, está no tratamento de resíduos de esgotos, onde o uso de lipases comerciais de várias fontes (animal, vegetal e microbiana) no pré-tratamento de efluentes de matadouros foi investigada. Tradicionalmente, os tratamentos físico-químicos reduzem a carga orgânica pela eliminação de proteínas e gordura com diferentes compostos químicos, como o sulfato de alumínio, cloreto férrico ou, mais comumente, a cal, quebrando a emulsão gordurosa e coagulando as partículas de gordura, por floculação, adicionando baixos níveis de polieletrolito (0,5-5,0 mg/L). Contudo, a viabilidade destes tratamentos é pouca devido ao elevado custo dos reagentes (cerca de US$ 800-900/kg), à baixa eficiência de remoção dos óleos e gorduras dissolvidos e/ou emulsionados (não mais do que 65%), além da geração de lodo altamente problemático para filtragem, produzido quando são utilizados os citados agentes floculantes. Todos esses fatores exigem o uso das caras instalações de resinas aniônicas e filtros de argila para remover tais compostos, o que significa 10-15% dos custos de produção total. Como exemplo da contabilização dos custos neste processo, as águas residuais de um matadouro contendo partículas de gordura foram pré-tratadas com 250 mg /L de lipase pancreática PL-250 (cotada a cerca de US$ 30-40/100g, dosificada a menos de 5% p/p da massa tratada). Aproximadamente 35% da gordura neutra foi hidrolisada durante o pré-tratamento. Assim, o pré-tratamento apresentou importante efeito global na digestão das partículas de gordura, marcado por diminuição de cerca de 5% (3 h) no tempo de digestão para alcançar 80% de redução de gordura neutra e ácidos graxos de cadeia longa, uma economia considerável (CAMMAROTA & FREIRE, 2006).

Além destas vantagens, pesquisadores podem explorar a seletividade das lipases em relação aos ácidos graxos e sua regioseletividade pelas posições sn-1,3 do glicerol em relação à posição sn-2 (BORNSCHEUER, 1995; FREGOLENTE, 2006).

Diversas técnicas de avaliação quantitativa vêm sendo aplicadas na determinação dos produtos das reações de hidrólise e/ou esterificação de óleos e gorduras. Os métodos químicos mais usados são o índice de acidez, índice de iodo, determinação de monoacilgliceróis e glicerol livre por oxidação de ácido

periódico e índice de hidroxila. Técnicas cromatográficas em coluna também são utilizadas, assim como em camada delgada (GIOIELLI *et al*., 1982).

1.5. Reações catalisadas por lipases

Pela hidrólise parcial dos triacilgliceróis (Figura 3), obtêm-se flavorizantes utilizados em alimentos, inclusive para uso humano (OLIVEIRA *et al*., 2004). A reação de esterificação é, em sua essência, a reação inversa à hidrólise, ocorrendo entre álcoois polihídricos e ácidos graxos livres do acilglicerol correspondente. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é normalmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação (CARVALHO *et al.*, 2006).

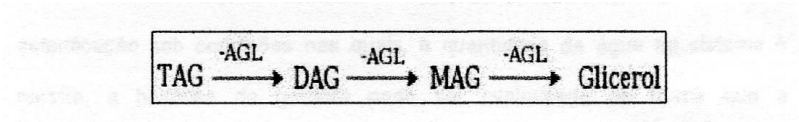


FIGURA 3 - Hidrólise catalisada por lipase. Triacilglicerol (TAG); diacilglicerol (DAG); monoacilglicerol (MAG); ácido graxo livre (AGL) (CASTRO, 2009)

O sítio ativo das lipases consiste da tríade catalítica formada Ser- Hist- Asp/ Glu, onde a hidrólise do substrato ocorre em duas etapas (Figura 4): inicia com um ataque do oxigênio hidrofílico pertencente ao grupo hidroxila do resíduo serina ao carbono da carbonila ativado do éster do lipídeo (Figura 4A). Forma-se um intermediário tetraédrico, sendo estabilizado o O-, pela interação com dois grupos peptídicos NH (QUEIROZ, 2002).

A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato (Figura 4B) restando, então, um intermediário covalente (enzima acilada), estando o componente ácido do substrato esterificado pelo resíduo serina da enzima. O resíduo de histidina ativa uma molécula de água na vizinhança e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente (Figura 4C). Um próton é doado pelo resíduo de histidina ao átomo de oxigênio do resíduo serina ativo, quebrando a ligação éster entre a serina e o componente acila, liberando o produto acilado, favorecendo a enzima, para que esta receba uma nova molécula de substrato (CASTRO, 2009).

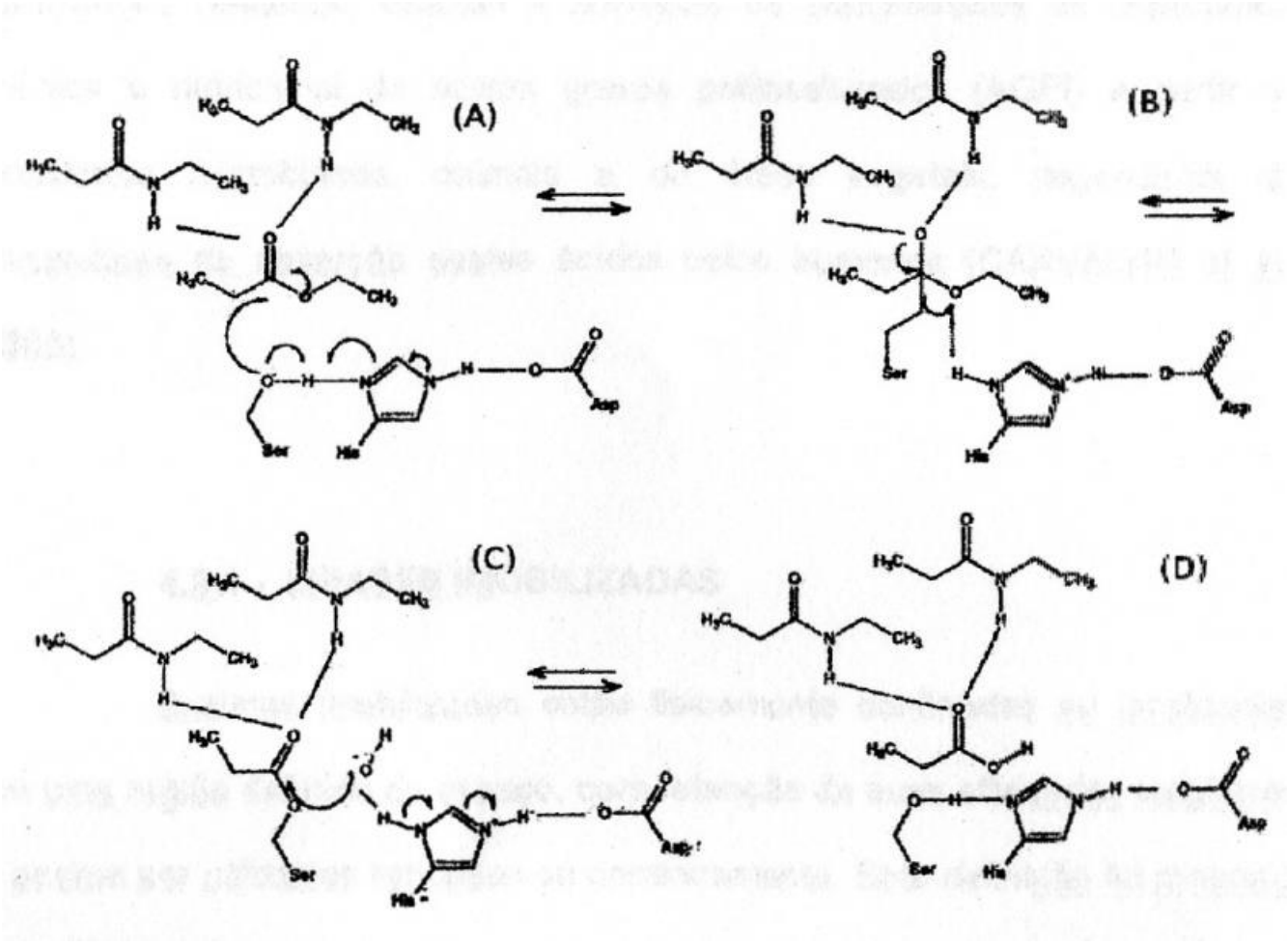


Figura 4 - Mecanismo de catálise por lipases (CASTRO, 2009)

As lipases triacilglicerídicas são mais ativas em substratos insolúveis do que solúveis. Entre as teorias que explicam a ativação na presença de interfaces água-lipídeo, a hipótese que aponta mudanças conformacionais na enzima está suportada para lipases de *Rhizomucor miehei*, pancreática humana e de *Geotrichum candidum*, que apresentam tampas que cobrem o sítio ativo e se abrem na presença do substrato, expondo-o (QUEIROZ, 2002; CASTRO, 2009).

As lipases atuam na interface água-lipídeo, contrariando o modelo cinético de Michaelis-Menten para a cinética enzimática, que é válido somente para reações catalisadas em fase homogênea. Geralmente o substrato lipídico é utilizado na forma de emulsão em análises da lipase e à medida que vão se formando os produtos e degradando o substrato ocorre variação na composição da interface água-lipídeo. Portanto a velocidade da reação é determinada pela área superficial da emulsão das partículas por unidade de volume e não pelo teor de lipídeos na emulsão (GONÇALVES, 2007).

A hidrólise de gorduras e óleos por lipases em meio aquoso (na forma de emulsões) segue um mecanismo bem conhecido: a chamada ativação interfacial. Em meio aquoso, as lipases têm o seu centro

ativo isolado do meio por uma cadeia polipeptídica chamada aba. A aba pode ser muito pequena e simples, não completamente isolando o centro ativo da enzima no formato fechado (por exemplo, este é o caso da lipase B de *Candida antarctica*) ou, como no caso da lipase de *Geobacillus thermocatenulatus*, uma estrutura bastante complexa envolvendo uma grande percentagem de aminoácidos da enzima e formando uma aba dupla. Na presença de uma emulsão de óleo, a aba se move para permitir a interação entre sua face interna hidrofóbica e os resíduos hidrofóbicos que habitualmente rodeiam o centro ativo de lipase com esta superfície hidrofóbica. Assim, a lipase torna-se adsorvida sobre esta superfície hidrofóbica, e o centro ativo fica exposto ao meio reacional (forma aberta). Outras superfícies hidrofóbicas podem "imitar" estas emulsões oleosas, permitindo a adsorção da forma aberta das lipases através da ativação interfacial: um suporte hidrofóbico, uma proteína hidrofóbica ou mesmo outras moléculas de lipase "abertas" (RODRIGUES & FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

1.6. Substrato

1.6.1. Triacilgliceróis

Os óleos e gorduras animais e vegetais (compostos principalmente por triacilgliceróis), *in natura* ou modificados, têm tido um papel importante em muitos segmentos, tais como alimentos, materiais poliméricos, lubrificantes, biocombustíveis, revestimentos e adesivos estruturais, entre outros. Devido às diferentes funcionalidades presentes em sua estrutura química, os triacilgliceróis exibem grande versatilidade reacional. Este potencial químico pode ser aproveitado para preparação de vários materiais com inúmeras aplicações comerciais, sendo que muitos dos processos químicos de transformação dos triacilgliceróis ocorrem na presença de catalisadores (SUAREZ *et al.*, 2007).

As matérias-primas e os processos para a obtenção desses produtos dependem da região considerada. As diversidades sociais, econômicas e ambientais, além da necessidade de inclusão social de trabalhadores pouco qualificados para a indústria, geram distintas motivações regionais para a sua produção e seu consumo. No Brasil, a mamona, a palma, a soja, o amendoim e o girassol, entre outras, podem ser abundantes fontes de energia e de inclusão social (LIMA, 2004). No país são cultivadas diversas espécies de oleaginosas – por exemplo, dendê, babaçu, soja, mamona, algodão, coco, milho, canola, girassol e amendoim - que possuem potencial para serem utilizadas como matéria-prima para a produção de produtos de química fina e para combustíveis alternativos (OLIVEIRA *et al*., 2006).

Nos Estados Unidos, por exemplo, o óleo de soja é considerado como matéria-prima primordial e, nos países tropicais, são importantes os óleos de palma, girassol alto ou médio oléico e amendoim, todos com altos teores de ácido oléico (FERRARI, 2005).

A investigação de matérias-primas mais baratas sempre representa uma estratégia associada à produção que tem sido utilizada para melhorar a viabilidade econômica dos produtos gerados de oleaginosas. No entanto, a composição destas matérias-primas pode exigir mudanças no processo e

modificações das tecnologias já existentes para a obtenção de um produto final de boa qualidade (MORETTO, FETT, 1998).

Óleos e gorduras são constituídos predominantemente por ésteres de ácidos graxos com glicerol, denominados triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAGs), substâncias constituídas por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos. A natureza física destes compostos é definida pelo comprimento da cadeia, pelo grau de insaturação e pela distribuição dos grupos acil. Dependendo da origem do óleo, o conteúdo em ácidos graxos e em TAGs pode variar significativamente (MORETTO, FETT, 1998). Portanto, a análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro procedimento para a avaliação preliminar da qualidade e aplicação do óleo e isto pode ser obtido através de vários métodos analíticos tais como a cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia em fase gasosa (GC) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (CONCEIÇÃO *et al*., 2005).

A Tabela 2 apresenta a distribuição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras de diversas fontes.

Tabela 2 – Distribuição de ácidos graxos de alguns óleos e gorduras

Óleo ou gordura	Composição em ácidos graxos (% em massa)						
	Láurico	Mirístico	Palmítico	Esteárico	Oléico	Linoléico	Linolênico
	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	$C_{17}H_{33}COOH$	$C_{17}H_{33}COOH$	$C_{17}H_{33}COOH$
algodão	-	1,5	22	5	19	50	-
amendoim	-	0,5	6,0 – 11,4	3,0 – 6,0	42,3 - 61	13 – 33,5	-
babaçu	44 - 45	15 – 16,5	5,8 – 8,5	2,5 – 5,5	12 - 16	1,4 – 2,8	-
côco	44 - 51	13 – 18,5	7,5 - 11	1 - 3	5 – 8,2	1,0 – 2,6	-
palma	-	0,6 – 2,4	32 - 45	4,0 – 6,3	38 - 53	6 - 12	-
girassol	-	-	3,6 – 6,5	1,3 - 3	14 - 43	44 - 68	-
linhaça	-	-	6	4	13 - 37	5 - 23	26 - 58
milho	-	-	7	3	43	39	-
oliva	-	1,3	7 - 16	1,4 – 3,3	64 - 84	4 - 15	-
soja	-	-	2,3 - 11	2,4 - 6	23,5 - 31	49 – 51,5	2 – 10,5
girassol alto oléico	-	-	4,4 – 7,6	2,5 – 5,5	63 - 86	19 - 24	-

FONTE: (RINALDI *et al*., 2007).

Assim como na produção de biodiesel, desde os anos 80 tem surgido crescente interesse na tecnologia de modificação dos óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (CASTRO *et al.*, 2004). Os óleos e gorduras naturais podem ser o único constituinte de um produto ou podem fazer parte da mistura de diversos constituintes em um composto.

Existem casos, entretanto, em que se torna necessário modificar as características desses materiais, para adequá-los a uma determinada aplicação. Portanto, o setor industrial de óleos e gorduras tem desenvolvido diversos processos para manipular a composição das misturas de TAGs. A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser modificada, por exemplo, por meio da síntese de ésteres para produção de emulsificantes (esterificação), pela modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do TAG (interesterificação) (HAMMOND, GLATZ, 1988).

Sem levar em consideração outros processos existentes, como o fracionamento, pode-se afirmar que as limitações na obtenção desses produtos estão associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e requerem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista ou contaminada, que requerem uma etapa posterior de purificação. Nesse contexto, o enfoque biotecnológico, com utilização de catalisador enzimático, vem se apresentando como uma alternativa atrativa para exploração na indústria de óleos e gorduras, principalmente quando são consideradas algumas das vantagens dessa rota, tais como maior rendimento do processo, obtenção de produtos biodegradáveis, menor consumo de energia, redução da quantidade de resíduos e introdução de rotas mais acessíveis de produção (CASTRO *et al*., 2004). O controle da quantidade de água na reação do sistema é importante para a orientação do processo e na determinação dos produtos de reação finais (LIMA, 2004).

Como uma rica fonte de TAGs insaturados e um dos substratos para a produção de MAGs / DAGs, a trioleína é um componente principal dos óleos oléicos, tais como o azeite de oliva, o óleo de girassol alto e médio oléico e o óleo de amendoim. Estes óleos contêm grandes percentagens de trioleoil-glicerol (OOO), além de dioleoil-linoleoil-glicerol (OOL), dilinoleoil-oleoil-glicerol (LLO) e dioleoil-palmitoil glicerol (OOP), compondo um montante de cerca de 83% na composição final. Estes óleos são utilizados devido à sua simplicidade em termos de composição em ácidos graxos e em TAGs (QINTAO, 1998).

Outro bom motivo para a utilização de trioleína como substrato de hidrólise se deve ao fato de ser uma fonte de TAGs isenta de outros interferentes (ceras, esfingolípides, tocoferóis, ácidos graxos livres e demais componentes menores) que possam existir nos substratos habituais, oriundos de fontes de óleos comerciais, que podem levar à turvação, aumento de viscosidade e competição do acesso da fonte lipídica

aos sítios ativos da enzima regioespecífica escolhida, o que interfere com a ação da lipase, prejudicando as reações intermediárias de formação dos mono e diacilgliceróis (MOYA-RAMIREZ, 2016).

Como alternativa de substrato trioleína, pode ser utilizado o óleo de girassol alto ou médio oléico, por ser um óleo vegetal refinado com alto perfil insaturado e grande teor de trioleína.

O óleo de girassol é um dos óleos vegetais mais populares e em alguns países é preferível aos óleos de soja, algodão e palma.

O girassol é a quarta maior fonte de óleo do mundo, depois da soja, de palma e da canola. Os mais importantes países produtores de girassol são a antiga União Soviética (ex-URSS), União Europeia (UE-15), Argentina, Europa Central, Turquia, EUA, África do Sul, Índia, China, Myanmar (Burma), Austrália e Paquistão (GUNSTONE, 2007).

Os teores de óleo, proteína, fibra e cinzas da semente de girassol são descritos a seguir, com base em estudo realizado na USDA Research Center (USDA, 2001): óleo: 44-51%; proteína: 17-19%; fibra: 15-20%; cinzas: 0,4%.

Óleo de girassol tradicional tem elevado teor de ácido linoléico. Apesar deste teor variar consideravelmente, o óleo da maioria das variedades comuns contêm cerca de 65-70% deste ácido graxo insaturado. Em contraste com a variedade tradicional, as variedades alto oléico (High Oleic) e médio oléico (Mid Oleic) apresentam teores bem menores de ácido linoléico, conforme pode-se conferir na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição típica de três variedades de óleo de girassol

	Óleo de girassol comum	Óleo de girassol alto oléico	Óleo de girassol médio oléico
Total de saturados (%)	11 - 13	9 - 10	< 10
Ácido oléico (%)	20 - 30	80 - 90	55 - 75
Ácido linoléico (%)	60 - 70	5 – 9	15 - 35
Ácido linolênico (%)	< 1	< 1	< 1
AOM (h)*	10 - 12	40 – 50	25 - 35
Índice de iodo aproximado	128	79	108

(* estabilidade oxidativa, medida pelo método do oxigênio ativo - AOM; Gunstone, 2007)

A composição típica de óleo de girassol desodorizado é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição típica do óleo de girassol desodorizado

Características	Parâmetros
Ácidos graxos livres (FFAs)	0,01–0,03%
Sabão	0
Fósforo	< 1 ppm
Cálcio	< 0,2 ppm
Clorofila	< 30 ppb
Cor vermelha Lovibond	< 1,5
Cold test (h, 0 °C)	Mín 5,5 h
Teor de cera	< 15 ppm

(Gunstone, 2007)

A Tabela 5 apresenta dados adicionais sobre as características físico-químicas do óleo de girassol normal e da variedade alto oléico.

Tabela 5 - Características físico-químicas do óleo de girassol comum e da variedade alto oléico

Características	Óleo de girassol comum	Óleo de girassol alto oléico
Densidade específica 25/25 °C (g/mL)	0,915-0,919	0,912-0,915
Índice de refração, 25 °C	1,472-1,475	1,467-1,469
Índice de saponificação (mg KOH/g óleo)	188-194	188-194
Índice de iodo (g iodo/100g óleo)	125-136	78-88
Matéria insaponificável (g/kg óleo)	0,3-1,3	0,8-2,0
Ponto de fusão (°C)	-18 -- -20	4,4 – 7,2
Ponto de solidificação (°C)	-17	-
Teor de cera (%)	0,02-0,35	0,2-0,35

Fonte: (O´Brien, 2005)

A chamada “winterização” de óleo de girassol é essencial quando o óleo é direcionado para usos em que a aparência e a ausência de turvação são essenciais. A presença de cera faz com que o óleo fique com aspecto turvo à temperatura ambiente. O óleo normalmente torna-se turvo em 5-6 h, mas com processamento adequado, pode permanecer límpido mesmo após 24 h de armazenamento a 0 °C (GUNSTONE, 2007).

1.7. Aspectos gerais sobre biorreatores

O tipo do reator e suas configurações de trabalho sempre são aspectos importantes a serem considerados, quando se deve decidir sobre a escolha do melhor método de biocatálise. Para produções industriais, a operação por batelada ou batelada alimentada é preferível à contínua por causa do melhor controle do processo, alta produtividade, e aumento de qualidade e rendimento. Existem vários tipos de reatores usados para estes processos como o de leito fixo (PBR) e o de leito fluidizado (FBR). Quando se acopla uma membrana de ultra ou microfiltração a um reator de leito fluidizado (tipo reator continuamente agitado, CSTR na sigla em inglês) este passa a ser denominado reator com membrana (RM), podendo ser empregado na condição de operação descontínua ou descontínua-alimentada (H-KITTIKUN *et al.*, 2008).

Entre os tipos mais empregados, o RM tem sido bastante usado em reações catalíticas, por causa de sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção/manutenção e de recuperação das enzimas. STEVENSON *et al*. (2001) reportaram a glicerólise de sebo bovino por Lipozyme® (lipase de *Mucor miehei* imobilizada) em reator de coluna com membrana sem adição de surfactante ou emulsificante a 50 ºC, para produção de monoacilgliceróis (MAGs) com rendimento da ordem de 20%.

Em estudo de KAEWTHONG *et al.* (2005), nove lipases comerciais foram pesquisadas por sua capacidade para produzir MAGs através da glicerólise de oleína de palma a 45 ºC em processo descontínuo. Foi encontrado que a lipase de *Pseudomonas* sp (lipase PS) foi a mais adequada para produção de MAGs, devido ao alto rendimento e custo comparativamente menores em relação às outras. O rendimento de MAGs em ambiente de sistema livre de solvente foi de 20,74% em 24 horas de processo no sistema por batelada.

Os ensaios no RM em regime descontínuo-alimentado são feitos de acordo com as melhores condições estabelecidas em reator simples em regime descontínuo (a concentração total de substrato a adicionar, a temperatura ótima de reação e o tempo de reação estabelecido será o tempo de enchimento do reator, partindo-se de um volume inicial e chegando a um volume final estabelecido) (VITOLO *et al*., 2015). A adição do substrato é feita de acordo com as leis de adição indicadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Leis de adição em reatores descontínuo-alimentados.

ADIÇÃO	LEI	FORMA INTEGRADA
CONSTANTE	$\phi = (V_f - V_o) \div t$	$\phi = (V_f - V_o) \div t$
LINEAR CRESCENTE	$\phi = \phi_o + k.t$	$(V - V_o) = \phi_o.t + k.t^2/2$
LINEAR DECRESCENTE	$\phi = \phi_o - k.t$	$(V - V_o) = \phi_o.t - k.t^2/2$
EXPONENCIAL CRESCENTE	$\phi = \phi_o.e^{k'.t}$	$(V - V_o) = (\phi_o/k').(e^{k'.t} - 1)$
EXPONENCIAL DECRESCENTE	$\phi = \phi_o.e^{-k'.t}$	$(V - V_o) = -(\phi_o/k').(e^{-k'.t} - 1)$

Onde:

ϕ = vazão de alimentação (L/h); ϕ_o = vazão de alimentação inicial (L/h);

k = constante de adição linear (L/h^2);

t = instante da adição do substrato;

k' = constante de adição exponencial (h^{-1});

V_f = volume final (L);

V = volume de meio no reator em um dado instante (L);

V_o = volume inicial de meio no reator (L). Fonte: (ROCHA FILHO & VITOLO, 2017)

Na Tabela 7 são mostrados alguns exemplos de processos para obtenção de MAGs via glicerólise enzimática.

Tabela 7 – Exemplos de processos para a obtenção de monoacilgliceróis via glicerólise enzimática (H-KITTIKUN *et al.*, 2008).

Processos					
Solvente	Tipo de processo	Tipo de óleo e gordura	Lipase	Razão molar (glicerol/óleo)	MAG (%)
Acetona/ isooctano	Batelada	Óleo de palma	*Burkholderia cepacia* imobilizada em Accurel EP 100	8 : 1	55,75
isento	Contínuo em biorreator de membrana	Gordura da manteiga	*Pseudomonas cepacia* imobilizada em polipropileno	1 : 2	21,87
Terc-butanol	Batelada/ contínuo em reator de leito empacotado	Óleo de girassol	*Candida antarctica*	4,5 : 1	60-70 70
Terc-pentanol	Contínuo em reator de coluna de leito empacotado	Óleo de girassol	*Candida antarctica* imobilizada em PMMA	4:1	47 - 56

1.8. Produtos e processos de identificação/ quantificação

1.8.1 - Técnicas para identificar e/ou quantificar mono, di e triacilgliceróis

As técnicas de identificação, caracterização e quantificação constituem procedimentos indispensáveis para o estudo de qualquer substância. No caso de mono, di e triacilgliceróis, bem como de suas misturas complexas (óleos e gorduras) existem várias técnicas, como as cromatografias gasosa [GC], líquida [HPLC], por diferencial de tamanho molecular [HPSEC], em camada delgada [TLC], calorimetria diferencial de varredura (DSC, na sigla em inglês) e métodos químicos convencionais (índice de acidez, índice de iodo e reações colorimétricas).

1.8.1.1. Calorimetria diferencial de varredura

Óleos e gorduras vegetais podem cristalizar em várias formas polimórficas (principalmente α, β-prima e β), que cristalizam a diferentes taxas. O DSC constitue-se em método direto para estudar as transições térmicas de óleos e gorduras. Através dos padrões de resfriamento (cristalização) e aquecimento (fusão) é possível diferenciar um óleo de outro. Nesta técnica o estabelecimento da posição do pico exotérmico (ou endotérmico) da temperatura de cristalização (ou fusão) no termograma é o aspecto mais importante, uma vez que cada óleo ou gordura tem sua temperatura típica de cristalização e de fusão. A posição do pico poderá ser deslocada pela variação da velocidade de resfriamento ou fusão. Em geral, as curvas de resfriamento e fusão são satisfatoriamente reprodutíveis. As características de cristalização ou fusão de uma amostra em varredura DSC podem ser indicadas por várias temperaturas (início de cristalização ou fusão – onset, temperatura de pico de cristalização ou fusão e final de cristalização ou fusão – endset). Para interpretar termogramas de DSC, aplica-se a estratégia de subdividir a curva de resfriamento ou de fusão de óleos e gorduras em diferentes regiões exotérmicas ou endotérmicas correspondentes a diferentes tipos de TAGs e de usar esta técnica para qualificar e quantificar certos parâmetros das amostras (TAN & CHE MAN, , 2002).

1.8.1.2. Acidez (% de hidrólise) como indicador do desempenho da reação

A hidrólise de TAGs, que produz ácidos graxos livres e glicerol, representa um grupo importante de reações químicas para o processamento industrial de óleos e gorduras naturais. A hidrólise é a primeira etapa da reação para a produção de ácidos graxos livres que podem, então, ser interesterificados ou convertidos em álcoois graxos de elevado valor. A hidrólise enzimática de gorduras tem sido extensivamente estudada utilizando enzimas imobilizadas em suportes poliméricos hidrofóbicos e também enzimas solúveis que atuam na interface líquido-líquido de uma emulsão.

A determinação da acidez pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera

quase sempre a acidez. Estes são frequentemente expressos em termos de índice de acidez, em mg de KOH por g de óleo ou em g/100g do principal ácido graxo componente, geralmente o ácido oléico (IAL, 2008).

ROONEY, WEATHERLEY (2001) analisaram a hidrólise enzimática de óleo de girassol alto oléico, evidenciando fenômenos que afetaram a viabilidade do processo**,** utilizando a via lipolítica como alternativa viável às técnicas convencionais. Observaram que o efeito da concentração de enzima na taxa e extensão de hidrólise foi de fundamental importância na avaliação das condições ótimas do processo. Um dos requisitos físicos primários é uma interface de acesso em que a lipase possa catalisar a reação, demonstrando que a velocidade global da reação pode ser aumentada usando dispersões de fase aquosa em substrato oleoso e vice-versa. Além disso, a determinação da acidez titulável de soluções oleosas aquosas foi empregada para determinar indiretamente o rendimento destes processos, com a avaliação de formação de ácidos graxos livres.

1.8.1.3. Cromatografia em camada delgada para detectar e quantificar mono, di e triacilgliceróis

A cromatografia em camada delgada (TLC, na sigla em inglês), mostrou-se ao longo do tempo ser uma técnica eficiente para detectar compostos químicos em geral, sendo, particularmente no campo dos óleos e das gorduras, muito utilizada por várias décadas (sobretudo antes do desenvolvimento da cromatografia a gás) (GIOIELLI *et al*., 1982).

A TLC é, basicamente, constituída por uma fase estacionária polar (grânulos de sílica com diâmetro entre 10 a 50 µm depositados sobre uma placa de vidro) e de uma fase móvel que precisa ser bastante apolar (geralmente constituída por um solvente ou misturas de solventes como hexano ou clorofórmio, em diferentes proporções). As placas às quais se aplicam as amostras são colocadas em uma câmara de vidro com a aresta da linha de base (constituída pela carreira de “spots” contendo os padrões e as amostras) mergulhada na solução de arraste (fase móvel). Finda a corrrida – quando a linha de frente da fase móvel atinge o limite superior da placa – as placas são secas em estufa e, a seguir, expostas a um agente de revelação (como o iodo metálico que origina vapores de iodo e forma um complexo marrom não-covalente com os lipídios). A identificação das manchas se dá pela determinação do parâmetro “R_f”, que é definido pela razão entre a distância percorrida pela mancha a partir da linha de base e o percurso total percorrido pela fase móvel. O componente da amostra cujo R_f coincide com o R_f do padrão passa a ser inequivocamente identificado (MANGOLD & MALLINS, 1960).

Como vantagens da TLC citam-se: a) simplicidade de execução; b) requer equipamentos de baixo custo e disponíveis no mercado; c) pelo fato de se utilizar placas independentes entre as diferentes corridas de separação de substâncias, não há risco de contaminação e/ou mescla de resultados entre medidas feitas em momentos anteriores e posteriores; d) requer quantidade menor de solventes do que outros métodos cromatográficos (cromatografia líquida de alta pressão); e) permite proceder à manipulação simultânea de várias amostras; f) a amostra a ser analisada não precisa sofrer tratamento prévio significativo (no máximo, se for preciso, uma concentração); para efeito de comparação, no caso da

HPLC, por exemplo, a amostra antes de ser injetada deve ser silanizada ou sofrer outro tratamento químico; g) pode ser usada como método de *screening* de amostras com o objetivo de identificar potenciais compostos capazes de danificar colunas de métodos cromatográficos de alta precisão (CG e HPLC) (FUCHS *et al*., 2011).

Como uma inovação, BANSAL *et al*. (2008) desenvolveram metodologia de quantificação a partir da análise de imagens obtidas em placas de TLC não-preparativas de sílica gel de 0,2mm de espessura registradas por um scanner comum. A área produzida pelas bandas de acilgliceróis, destacadas pelo reagente de permanganato de potássio, foram convertidas em valores de massa através de um software. De acordo com estes autores, explorou-se a possibilidade de realizar análise de imagens em quadros digitalizadas para quantificar a quantidade de compostos de glicerólise nas placas de TLC. A análise foi realizada utilizando o aplicativo Matlab (Mathworks Inc., Natick, MA).

1.8.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência para detectar mono, di e triacilgliceróis

A separação dos ácidos graxos (AGs), monoacilgliceróis (MAGs), diacilgliceróis (DAGs) e triacilgliceróis (TAGs) e sua determinação qualitativa/quantitativa é importante no estudo de reações catalisadas por lipase tais como hidrólise e esterificação.

A cromatografia a gás é muito utilizada na análise de lípidos, mas pode ser necessária a operação de silanização das amostras antes da injeção nas colunas de eluição, sendo que esta operação é demorada e que também pode causar erros. Em adição, para amostras que contêm diferentes classes de lipídios, a multiplicidade de picos no cromatograma faz sua atribuição e identificação ficar difícil e pouco precisa, pois não deve haver sobreposição de diferentes grupos de picos (FILLIÈRES *et al*., 1995).

Já o método de HPLC oferece várias vantagens, sendo o método de escolha para compostos termicamente lábeis, não voláteis e com elevado peso molecular para a separação à temperatura ambiente. As amostras aquosas e não aquosas podem ser analisadas sem pré-tratamento. Componentes separados podem ser recuperados a partir da fase móvel para posterior caracterização por índice de refração (RID), espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e por espectroscopia do infravermelho (IV). Além disso, vários solventes e materiais para empacotamento de coluna proporcionam um elevado grau de seletividade para uma análise específica (KADAM & BHOWMICK, 2006).

Como uma especialização de HPLC, a cromatografia de permeação em gel, também chamada cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC), é uma técnica apropriada aos estudos de grupos lipídicos, considerando sua simplicidade e sua alta confiabilidade. HPSEC baseia-se na retenção seletiva de moléculas de acordo com o seu tamanho quando entram nos poros de uma matriz de polímero. No caso de um meio gorduroso submetido à hidrólise, a diferença média de massa molar entre as classes de acilgliceróis é de cerca de 250, e o seu impedimento estérico é também muito diferente. Estas diferenças fazem do método HPSEC relativamente interessante, havendo apenas um pico médio para cada classe lipídica. Esta técnica é relativamente nova para a análise de lipídios, pois incorporou

progressos consideráveis em tecnologia de coluna. Além disso, nesta técnica, as amostras para injeção não precisam de nenhuma preparação, com exceção da diluição em tetrahidrofurano, ao contrário de outras técnicas analíticas (FILLIÈRES *et al*., 1995).

HPSEC foi usada para analisar TAGs, DAGs, MAGs e ácidos graxos livres (AGL) em óleos e gorduras (JACKSON & KING, 1997). Além disso, provou ser um método útil para avaliar os perfis de alteração de gorduras durante a hidrólise. Com HPSEC, materiais heterogêneos, tais como um óleo vegetal normal, podem ser fracionados em grupos principais de compostos que têm iguais volumes hidrodinâmicos. Sendo uma combinação de adsorção e cromatografia de exclusão por tamanho, permite a análise de diferentes produtos de reação, tais como polímeros, monômeros polares de TAGs, DAGs, MAGs e AGL (HOPIA *et al*., 1992).

HPSEC emprega colunas pré-empacotadas (diâmetro interno: 0,45-1 cm, comprimento: 25-60 cm) contendo partículas pequenas (diâmetro de 15 µm, ou menos), muitas vezes à base de sílica, resultando em dezenas de milhares de pratos teóricos por metro. Eles podem ser operados a taxas de fluxo de até 1 mL/min, dando tempos de eluição menores que 20 min (IRVINE, 2003).

No entanto, uma das desvantagens da metodologia HPSEC é uma separação incompleta de alguns produtos lipidicos em uma única coluna, especialmente MAGs e AGL, que possuem tamanhos moleculares muito próximos. Assim, AGL são determinados, neste caso, por simples titulação (KITTIRATTANAPIBOON *et al*., 2008).

Já a metodologia de detecção por índice de refração (RID), oferece a vantagem de detectar todos os componentes da reação, não apenas aqueles que tenham uma absorvância na região do UV. Embora eles sejam capazes de detectar todos os componentes na mistura e quantificar muitos deles, diferentes programas de solvente podem ser usados, a fim de manter tempos de eluição razoáveis (60 min ou menos), além de evitar casos de picos sobrepostos (ALLEN & OTT, 2012).

1.9. Justificativa

O presente trabalho visa o estudo da reação de hidrólise de TAGs (constituídos por um único tipo de ácido graxo monoinssaturado ou um óleo de valor econômico competitivo com alto teor do triacilglicerol estudado) por lipase imobilizada ou solúvel para obter mono (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs), os quais são compostos de interesse econômico pelos seus diversos usos nas indústrias alimentícia, química, cosmética e farmacêutica. Destaca-se a importância adicional da averiguação da viabilidade da utilização de metodologias de acompanhamento catalítico da hidrólise, pouco empregadas atualmente, de baixo custo e com baixo potencial de geração de resíduos poluidores, como a determinação da porcentagem de hidrólise (medida indireta da acidez) do meio reacional, da aplicação da cromatografia em camada delgada (TLC) com um programa de análise de imagens específico para a quantificação e identificação

dos produtos formados, do uso da calorimetria diferencial de varredura (DSC) para avaliar o comportamento dos reagentes e padrões, frente à fusão e a cristalização e pela cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC) para a caracterização final dos substratos trioleína técnica (empregada nas reações de hidrólise descontínua) e óleo de girassol médio oléico (empregada nas reações de hidrólise descontínua-alimentada), além de fornecer elementos comparativos de comprovação dos valores de quantificação direta dos produtos hidrolisados obtidos fornecidos pelas duas metodologias anteriores. Os dois aspectos comentados constituem-se em elementos originais nos estudos de conversão enzimática de compostos lipídicos pela conjunção de antigas metodologias utilizadas de forma inovadora para o acompanhamento de hidrólise de uma nova matéria prima e seu principal componente, na obtenção de valiosos produtos de mercado.

A abordagem do tema foi feita mediante o estudo dos efeitos das variáveis temperatura de reação, tempo de reação e porcentagem de TAGs em uma emulsão oleosa estabelecida como substrato inicial sobre o desempenho de biorreator com ou sem membrana, operado em regime descontínuo ou descontínuo-alimentado. Para tanto, foram empregados um planejamento experimental para estudo das correlações básicas entre as variáveis dependentes e independentes com elementos fatoriais 2^2 completos com ponto central e pontos axiais, visando à racionalização dos parâmetros de processo indicados por porcentagem inicial de óleo na emulsão a ser hidrolisada, que poderiam conduzir a bons rendimentos na obtenção de MAGs e DAGs, formação de ácidos graxos e consumo de TAGs, além da demonstração das interrelações entre as variáveis acompanhadas.

2. OBJETIVO

Realizar hidrólise de emulsão O/A catalisada por lipase imobilizada em reator com ou sem membrana, operado em processo descontínuo ou descontínuo-alimentado, respectivamente.

Obter, identificar e quantificar acilgliceróis parciais (mono e diacilgliceróis) obtidos a partir da trioleína ou outra fonte lipídica representativa de TAGs OOO, como o óleo de girassol médio oléico. Também se objetiva quantificar os ácidos graxos livres formados e o teor do substrato residual.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência da ferramenta de quantificação de percentual de compostos formados e residuais da hidrólise enzimática pelo emprego de analisador digital de imagens específico JustTLC^R para a metodologia cromatográfica de camada delgada (TLC).

- Demonstrar a adequação das metodologias empregadas para a caracterização e quantificação de classes lipídicas dos substratos gordurosos empregados e dos produtos hidrolisados obtidos pelos dois tipos de reações de hidrólise estudadas pelo emprego da cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC).

- A partir do estudo inicial da hidrólise enzimática descontínua de trioleína técnica, determinar o melhor teor inicial de substrato (óleo de girassol médio oléico) na emulsão O/A e de parâmetros reacionais de processo (tempo e temperatura) para o processo descontínuo-alimentado de hidrólise enzimática ("fed-batch");

- Avaliar o efeito do binômio tempo total de reação/intervalo de alimentação na hidrólise do substrato rico em trioleína, de modo a determinar seu perfil ótimo para as melhores condições de reação, no estudo comparativo entre o reator operado em regime descontínuo e descontínuo-alimentado;

- Avaliar a eficiência da hidrólise enzimática e a formação de compostos resultantes através do percentual de hidrólise obtido pela medida da acidez (% de hidrólise) e pelas técnicas de TLC e HPSEC, comparando os resultados obtidos e aplicando planejamento fatorial completo codificado com pontos central e axial analisados com a metodologia estatística ANOVA e determinação dos coeficientes de regressão para obtenção das superfícies de resposta e obtenção das curvas de contorno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Foram utilizados os seguintes compostos lipídicos:

- óleo de girassol refinado de médio teor oléico fornecido pela empresa Triângulo Alimentos, lote PD-0283.
- Glyceryl trioleate 65% Sigma T7752 (trioleína técnica).
- Glyceryl trioleate 99% Sigma T7140.
- 1-monolein > 99% Nu-Chek Prep.
- 1,3-diolein > 99% Nu-Chek Prep.
- oleic acid > 99% Sigma.

Solventes para extração dos lipídios: heptano e álcool etílico absoluto.

Reagentes para análise de acidez: solução de éter-álcool (2:1) neutra, solução de fenolftaleína, solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou 0,01 M.
Reagentes para análise da porcentagem de hidrólise: solução de acetona-álcool (1:1), solução de fenolftaleina, solução de hidróxido de sódio 0,05 N.
Reagentes para análise por HPSEC de padrões e produtos de hidrólise: fase móvel com tetrahidrofurano (THF).

Reagentes para análise de substratos por CG: solução 0,5 N de hidróxido de sódio em metanol anidro, reagente de esterificação (solução de cloreto de amônio e ácido sulfúrico em metanol), éter de petróleo.

Reagentes para análise de substratos por HPLC: fase móvel com tetrahidrofurano (THF).

Reagentes para análise por TLC de padrões e produtos de hidrólise: mistura de solventes de eluição: hexano/éter etílico/ácido acético (80/20/1) e agente revelador: iodo sólido em escamas.

Todos os reagentes e solventes necessários para a realização dos experimentos foram de grau cromatográfico.

A lipase em grânulos Lipozyme RM IM de *Rhizomucor miehei* (Novozymes) foi adquirida junto a Sigma Aldrich e utilizada como catalisador da reação de hidrólise. A atividade reportada da enzima era 63 U/g (especificação: > 30 U/g).

As membranas de ultrafiltração (PLGC07610; corte molecular de 10 kDa) e de microfiltração (TMTP09030; diâmetro do poro = 5 µm) foram adquiridas da Millipore.

Para as análises cromatográficas por camada delgada, foram utilizadas: placas de sílica gel 60 TLC Merck (sem indicador de fluorescência), dimensões 20 x 20 cm, espessura 0,25 mm.

3.2. Planejamento experimental

3.2.1. Planejamento experimental fatorial central codificado para criação de superfície de resposta para condição de hidrólise enzimática em regime de reator descontínuo

Os estudos da hidrólise das emulsões de trioleína com aplicação de superfície de resposta foram realizados seguindo um delineamento fatorial para otimização das condições da reação, pois permite não só estudar o efeito de diversas variáveis como também apreciar com mais profundidade a inter-relação entre elas, otimizando as melhores condições de processo, que serão aplicadas na segunda fase do projeto. Como são duas as variáveis selecionadas para o estudo da hidrólise da trioleína, o delineamento estatístico de 2^2 completo com ponto central foi utilizado para a obtenção de resultados suficientes para a determinação da melhor condição reacional (BARROS NETO *et al.,* 2001). Foram avaliados os principais parâmetros que influenciam na cinética da reação: temperatura de reação (35, 40, 50, 60 e 65 °C), tempo de reação (1,6, 2, 3, 4 e 4,4 h), em duas porcentagens de trioleína em emulsão com água (5 e 20%). Os valores mínimos e máximos das variáveis independentes foram mostrados nas Tabelas 8 e 9, sendo codificados, respectivamente, com os símbolos (-1,41), (-1), (0), (+1) e (+1,41), perfazendo um total de 28 eventos de hidrólise diferentes. A cada ensaio foram mensuradas as seguintes respostas: rendimento percentual de obtenção de MAGs e DAGs, percentual de trioleína residual e porcentagem de hidrólise.

Tabela 8 – Variáveis independentes codificadas dos parâmetros de processo para tratamento da superfície de resposta nas reações de hidrólise de substrato trioleína para 5 e 20% de óleo na emulsão inicial

Variáveis	**-1,41**	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
X1 = temperatura de hidrólise (°C)	**35**	**40**	**50**	**60**	**65**
X2 = tempo de hidrólise (h)	**1,6**	**2**	**3**	**4**	**4,4**

Tabela 9 - Matriz para planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central e pontos axiais para tratamento da superfície de resposta com as variáveis nas unidades codificadas e originais para 5 e 20% de óleo na emulsão inicial

Ensaios 5% O/A * Amostras	**Ensaios 20% O/A * Amostras**	**Variáveis originais**		**Variáveis codificadas**	
		V1	**V2**	**X1**	**X2**
		Temperatura de reação (°C)	**Tempo de reação(h)**		
13 (F1)	**21 (F3)**	**40**	**2**	**-1**	**-1**
14 (F4)	**22 (F5)**	**60**	**2**	**+1**	**-1**
15 (F20)	**23 (F9)**	**40**	**4**	**-1**	**+1**
16 (F21)	**24 (F10)**	**60**	**4**	**+1**	**+1**
17 (F22)	**25 (F13)**	**35**	**3**	**-1,41**	**0**
18 (F23)	**26 (F26)**	**65**	**3**	**+1,41**	**0**
19 (F24)	**27 (F27)**	**50**	**1,6**	**0**	**-1,41**
20 (F25)	**28 (F28)**	**50**	**4,4**	**0**	**+1,41**
2 (F11)	**8 (F14)**	**50**	**3**	**0**	**0**
2 (F11)	**8 (F14)**	**50**	**3**	**0**	**0**
2 (F11)	**8 (F14)**	**50**	**3**	**0**	**0**

2 (F11)	**8 (F14)**	**50**	**3**	**0**	**0**

* Na coluna de amostras, os códigos entre parênteses referem-se denominações empregadas nas placas de TLC e foram mantidas para facilitar a identificação nas várias figuras em que são referendadas.

3.2.2. Planejamento experimental fatorial central codificado para criação de superfície de resposta para condição de hidrólise enzimática em regime de reator descontínuo-alimentado

Os estudos da hidrólise das emulsões de óleo de girassol médio oléico com aplicação de superfície de resposta foram realizados através de um delineamento fatorial completo para otimização das condições da reação, pois permite não só estudar o efeito de diversas variáveis como também apreciar com mais profundidade a inter-relação entre elas, otimizando as melhores condições de processo. Como são duas as variáveis selecionadas para o estudo da hidrólise do óleo de girassol médio oléico, o delineamento estatístico de 2^2 completo com ponto central foi utilizado novamente para a obtenção de resultados suficientes para a determinação da melhor condição reacional (BARROS NETO *et al.,* 2001). Foram avaliados os principais parâmetros que influenciam na cinética da reação: tempo de enchimento (2,6; 3; 4; 5 e 5,4 h), intervalo de alimentação de substrato (0,1; 0,5; 1,5; 2,5 e 2,9 h), em porcentagem de lipídio em emulsão com água de 15%. Este valor de taxa de emulsão foi oriundo dos resultados da apreciação dos melhores parâmetros de processos, executados na primeira fase do projeto, que indicaram presenças de maiores teores de água na emulsão para melhores resultados de hidrólise enzimática, com base em substratos ricos em trioleína. Para este estudo, utilizamos o regime de alimentação constante, conforme podemos visualizar na Tabela 7. Os valores mínimos e máximos das variáveis independentes são mostrados nas Tabelas 10 e 11, sendo codificados, respectivamente, com os símbolos (-1,41), (-1), (0), (+1) e (+1,41), perfazendo um total de 28 eventos de hidrólise diferentes. A cada ensaio foram mensuradas as seguintes respostas: rendimento percentual de obtenção de MAGs e DAGs, percentual de triacilglicerol residual e porcentagem de hidrólise. As demais condições importantes de processos, como temperatura, pH e agitação, estão delineadas no item 4.2.3.2.

Tabela 10 – Variáveis independentes codificadas dos parâmetros de processo para tratamento da superfície de resposta nas reações de hidrólise de substrato óleo de girassol médio oléico para 15% de óleo na emulsão inicial.

Variáveis	**-1,41**	**-1**	**0**	**1**	**1,41**
X1 = tempo de enchimento (h)	**2,6**	**3**	**4**	**5**	**5,4**
X2 = intervalo de alimentação de substrato (h)	**0,1**	**0,5**	**1,5**	**2,5**	**2,9**

Tabela 11 - Matriz para planejamento fatorial 2^2 completo com ponto central e pontos axiais para tratamento da superfície de resposta com as variáveis nas unidades codificadas e originais para 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial.

Ensaios – 15% O/A	Variáveis originais		Variáveis codificadas	
Amostras *	V1	V2	X1	X2
	Tempo de enchimento (h)	Intervalo de alimentação substrato (h)		
F	3	0,5	-1	-1
H	5	0,5	+1	-1
A	3	2,5	-1	+1
B	5	2,5	+1	+1
I	2,6	1,5	-1,41	0
C	5,4	1,5	+1,41	0
G	4	0,1	0	-1,41
D	4	2,9	0	+1,41
E	4	1,5	0	0
E	4	1,5	0	0
E	4	1,5	0	0
E	4	1,5	0	0

* Na coluna de amostras, os códigos entre parênteses referem-se denominações empregadas nas placas de TLC e foram mantidas para facilitar a identificação nas várias figuras em que são referendadas.

3.2.3. Análise estatística dos resultados

As respostas foram analisadas pelo coeficiente de determinação, análise de correlação, aplicação de ANOVA e metodologia de superfície de resposta utilizando o programa Statistica versão 12.0 (Statsoft).

3.3. Procedimento experimental e métodos

3.3.1. Hidrólise de triacilglicerol em processo descontínuo

Os ensaios de hidrólise descontínua foram realizados em frasco Erlenmeyer de 250 mL com agitação proporcionada por barra magnética mantida a 180 rpm e pH 7,4 (tampão fosfato 0,01M) e mistura trioleína/água (5 e 20% de trioleína na emulsão). A concentração da enzima correspondeu a 10% da massa lipídica inicial.

Após a reação, o conteúdo do reator foi filtrado a vácuo, sendo o filtrado recolhido e conservado em geladeira, para análises posteriores. As etapas realizadas estão sumarizadas na Figura 5.

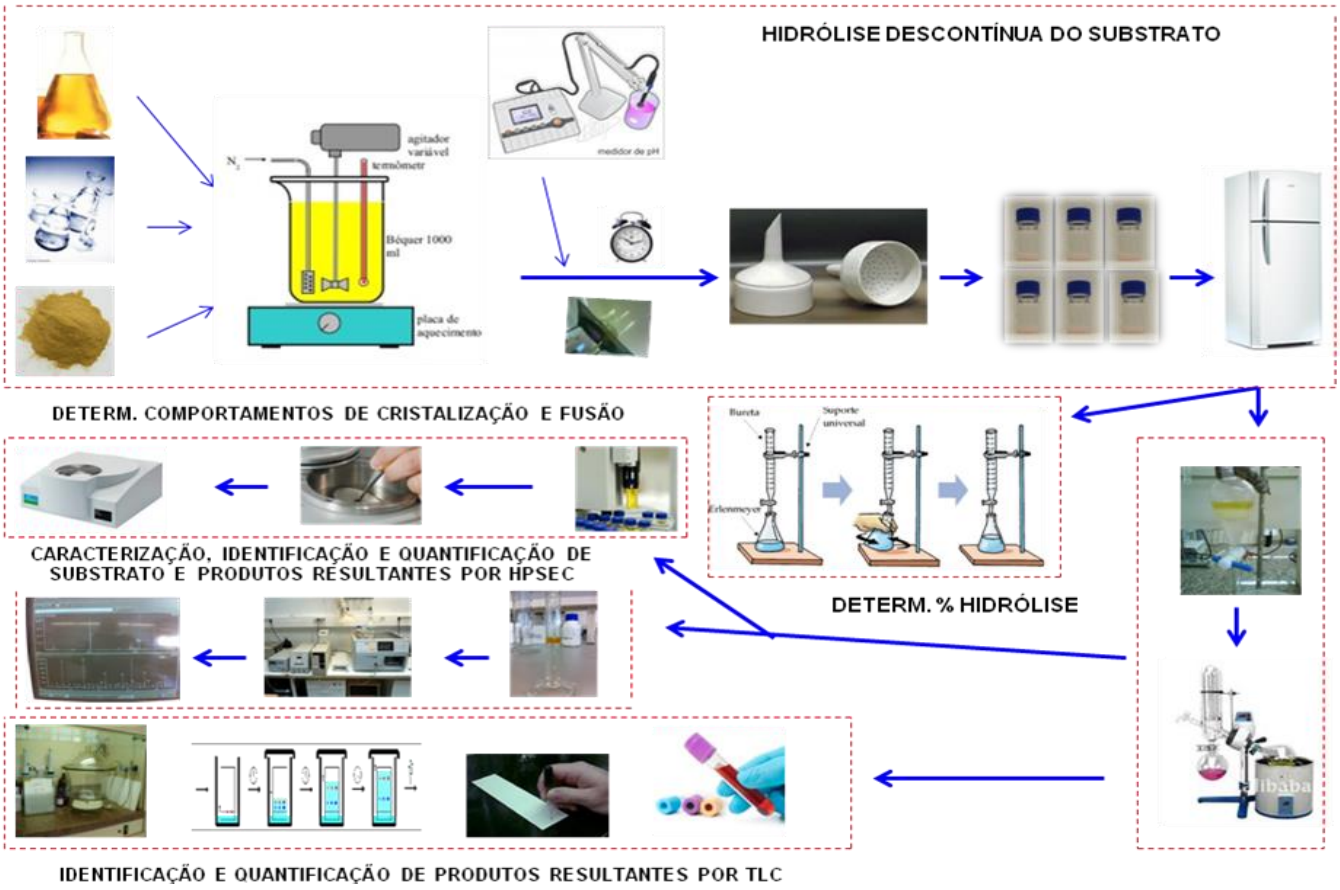


Figura 5 - Esquema de metodologia empregada para hidrólise descontínua do substrato lipídico (trioleína técnica).

3.3.2. Hidrólise de triacilglicerol por processo descontínuo-alimentado em reator com membrana

Inicialmente, o óleo de girassol médio oléico apresentou alto nível de turvação quando em temperatura ambiente, demandando uma filtração simples em papel de filtro Whatman n˚ 5, por cerca de 5 h, para eliminação de ceras, responsáveis pela turvação. Após este procedimento, a matéria-prima e padrões empregados, permaneceram sob refrigeração a 5 ˚C, até o momento de uso, quando eram deixados sob condições ambientais para equalização da temperatura com o requerido nas metodologias.

Em uma célula de ultrafiltração com capacidade nominal de 400 mL e munida com membrana de 76 mm de diâmetro (área de filtração efetiva de 40 cm^2; pressurização máxima de 6 bar), aos 100 mL da emulsão de óleo de girassol médio oléico em água tamponada (pH 7,4; tampão fosfato 0,01M) foi adicionada lipase imobilizada (de *Rhizomucor miehei*) calculada como 10% da massa total de triacilglicerol. A seguir, foi adicionada ao reator emulsão de óleo de girassol médio oléico até o volume final de 300 mL. A adição da emulsão de substrato foi feita segundo o regime de alimentação constante (Tabela - 7). A agitação foi mantida constante (180 rpm), sendo a porcentagem de óleo na emulsão de substrato e a temperatura da reação determinadas a partir das melhores condições de hidrólise resultantes da reação executada de modo descontínuo, ou seja, 15% O/A e 50 ºC. Amostras para fins analíticos foram retiradas do reator a intervalos de tempo pré-definidos. A Figura 6 apresenta as etapas executadas.

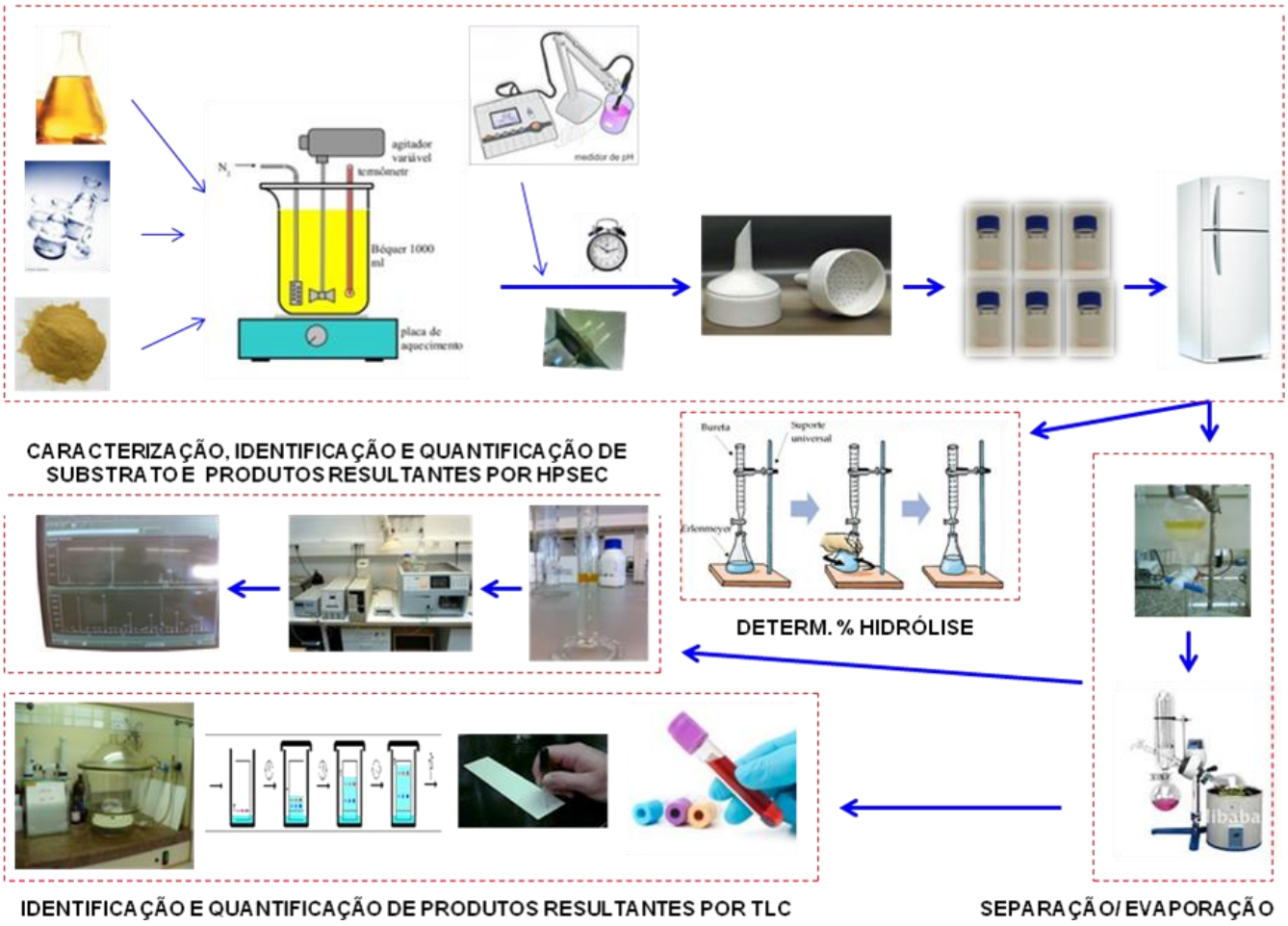


Figura 6 - Esquema de metodologia empregada para hidrólise descontínua-alimentada do substrato lipídico (óleo de girassol médio oléico).

3.3.3 Extração da fração oleosa

Amostras de 2,5 g do produto final da reação de hidrólise foram submetidas à extração com heptano, seguida pela lavagem com água destilada (AOCS, 1990).

O heptano foi eliminado em rotaevaporador em banho de água a 65 °C. A evaporação do solvente residual foi feita com nitrogênio em banho de água a 40 °C por 2 min, antes do armazenamento em ampolas de 10 mL e congelamento a -20 °C.

3.3.4. Comportamentos de cristalização e fusão

*A*s análises calorimétricas dos comportamentos de cristalização e fusão das amostras foram realizadas em Analisador Térmico Perkin-Elmer, modelo DSC 4000, equipado com sistema de

resfriamento Intracooler SP. Amostras fundidas (~5 mg) foram colocadas nos recipientes de 50 µL de alumínio do calorímetro (recipiente BO14-3017 e tampa BO14-3003, Perkin-Elmer), que foram hermeticamente fechados. Um recipiente vazio (o mesmo descrito acima) foi usado como referência. O instrumento foi calibrado com índio.

Foi utilizada a seguinte programação de temperatura, segundo o método Cj 1-94 da AOCS (AOCS, 1999; METIN & HARTEL, 1998; KALNIN *et al*., 2005): as amostras foram mantidas a 80 ºC por 10 min, resfriadas a -60 ºC à velocidade de 10 ºC/min e mantidas a esta temperatura por 30 min; posteriormente, as amostras foram aquecidas de -60 ºC a 80 ºC, à velocidade de 5 ºC/min. O tratamento de dados foi realizado pelo software Pyris. Os termogramas foram analisados quanto às temperaturas de início e final da cristalização e fusão e entalpias totais de cristalização e fusão (J/g) (RIBEIRO *et al*., 2009a; 2009b). As amostras foram analisadas em triplicata.

3.3.5. Determinação da porcentagem de hidrólise dos produtos resultantes da reação enzimática (ácidos graxos livres)

A determinação da acidez, expressa em percentagem de hidrólise, foi executada segundo metodologia proposta por ROONEY & WEATHERLEY (2001). Pela aplicação da Eq. 7 calculou-se a percentagem de hidrólise, definida como o peso percentual de ácidos graxos livres na amostra dividido pela quantidade máxima teórica e calculada.

$$\text{\% de hidrólise} = \frac{Na \times 0{,}05 \times 10^{-3} \times MM}{(Wt \times f_o)} \times \frac{100}{1} \qquad \text{Eq. 7}$$

Onde: Na é o volume da solução de hidróxido de sódio 0,05 N utilizada durante a titulação, MM é a massa molar média, Wt é o peso da amostra tomada e f_o é a fração de óleo (emulsão aquosa amostrada) no início da reação

As porcentagens empregadas na emulsão inicial com trioleína técnica foram 5% e 20% (ou f_O = 0,05 e 0,2, respectivamente) e 15% para a emulsão com óleo de girassol médio oléico.

3.3.6. Determinação de acidez de óleos e gorduras

Amostras dos padrões de tri, di e monoacilgliceróis puros foram analisadas utilizando a metodologia recomendada nas normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), com resultados expressos em índice de acidez (mg KOH/g).

3.3.7. Identificação e quantificação de padrões e dos produtos resultantes da hidrólise (ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis) por TLC

Foi utilizada a metodologia de Fuchs *et al*. (2011), com modificações. Foi empregada como padrão mistura de ácidos graxos livres, mono, di e triacilgliceróis (30 mg de cada, diluídos em 1,0 mL de hexano).

Foram depositados 10 µL de cada amostra por *slot*. Todas as micropipetas usadas eram descartadas após o uso. As análises foram feitas em triplicata.

Entretanto, como as frentes de eluição (Rf) das bandas correspondentes a 1,2-dioleína e 1,3-dioleína eram muito próximas, optou-se por considerá-las como banda única, chamada genericamente de dioleína.

Após desenvolvimento e revelação, as placas foram fotografadas, digitalizadas e as imagens analisadas pelo aplicativo Just TLC^{R} (Sweday).

Durante a detecção das manchas de cada corrida ou frente de eluição, os centros das mesmas foram mapeados, para se obter pontos com o "volume", avaliado em termos percentuais, correspondendo aos atributos de intensidade de cor, área de mancha gerada e posição de eluição, que foram quantificados pelo software.

Inicialmente, os resultados das porcentagens presentes nas frações estudadas (monoleína, dioleína, ácido oléico e trioleína), compuseram uma amostra padrão geral, que serviu de validação da correspondência para o método quantitativo digital, demonstrando desvios padrões menores que 1,5% ($p < 0,05$). O mesmo se observou para as amostras originadas dos produtos hidrolisados, com desvios padrões menores que 1,7% ($p < 0,05$).

3.3.8. Composição em ácidos graxos dos substratos oleosos

As análises do perfil de ácidos graxos foram realizadas em cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 6850 Series GC System), após a esterificação realizada segundo o método de Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram separados de acordo com o procedimento da AOCS Ce 1f-96 (2009) em coluna capilar DB-23 Agilent (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane), de dimensões: 60 m x 0,25 mm Ø interno x 0,25 µm filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo na coluna = 1,0 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura do detector = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura do forno = 110-215 °C (5 °C/min), 215 °C (24 min); gás de arraste: hélio; volume de injeção = 1,0 µL, *split* 1:50. A análise foi realizada em triplicata e os valores reportados são a média das três determinações.

3.3.9. Composição triacilglicerólica dos substratos oleosos

As composições em TAGs foram obtidas segundo o método AOCS Ce 5-86 (2009), em cromatógrafo gasoso capilar (CGC Agilent 6850 Series Gc System). A coluna capilar utilizada foi DB-17 HT Agilent Catalog: 122-1811 (50% phenyl-methylpolysiloxane), com dimensões de 15 m, Ø int: 0,25 mm e 0,15 µm filme. As condições de operação do cromatógrafo foram: fluxo na coluna = 1,0 mL/min.; velocidade linear = 40 cm/seg; temperatura do detector: 375 ºC; temperatura do injetor: 360 ºC; temperatura do forno: 280-340 °C (2 °C/min), 340 °C (40 min); gás de arraste: hélio; volume injetado: 1,0 µL; *split* 1:100; concentração da amostra: 10 mg/mL tetrahidrofurano. A análise foi realizada em triplicata e os valores reportados são a média das três determinações.

3.3.10. Teor de acilgliceróis parciais do substrato oleoso e dos produtos hidrolisados determinado por cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho (HPSEC)

As análises de classes de compostos acilglicerólicos foram realizadas segundo o método de Dobarganes, Velasco e Dieffenbacher (2000). A análise fez uso de cromatógrafo líquido Perkin Elmer LC-250 com detector de índice de refração Sicon Analytic. As colunas utilizadas foram: 1 - PL gel 300 x 7,5 mm, 5 mm, 500 Å; 2 - PL gel 300 x 7,5mm, 5mm, 100 Å. A fase móvel utilizada foi tetrahidrofurano grau HPLC com fluxo de 1mL/min. A análise foi realizada em triplicata e os valores reportados são a média das três determinações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Parâmetros de qualidade dos substratos triacilgliceróis e dos padrões lipídicos empregados.

A Tabela 12 apresenta o índice de acidez dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico e dos padrões trioleína, 1-monoleína, 1,3-dioleína e ácido oléico, todos 99% de pureza.

Tabela 12 - Índice de acidez dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico e dos padrões trioleína, 1-monoleína e 1,3-dioleína

Lipídios	Índice de acidez (mg KOH/g)*	Índice de acidez (mg KOH/g)**
Óleo de girassol médio oléico	0,3±0,03	< 0,34
Trioleína técnica	0,1±0,02	< 0,3
Trioleína 99%	0,04±0,02	< 0,1
1-monoleína 99%	0,03±0,01	< 0,1
1,3-dioleína 99%	0,03±0,01	< 0,1

* obtida de análise de índice de acidez; ** obtida dos boletins técnicos e certificados de qualidade dos fornecedores; Valores são as médias ± desvio padrão de três replicatas

A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), estabelece que a acidez máxima para óleos ou gorduras refinados deve ser de 0,6 mg KOH/g. Na prática, os óleos e gorduras refinados apresentam

normalmente acidez inferior a 0,2 mg KOH/g. Portanto, os resultados obtidos para a acidez estiveram de acordo com a legislação.

4.2 – Composição e qualificação das frações lipídicas nos substratos triacilgliceróis e nos padrões lipídicos empregados

4.2.1 – Qualificação e quantificação dos padrões e substratos por TLC

A identificação e os resultados da composição dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico e dos padrões de AGL, TAGs, DAGs e MAGs empregados para servir de referência para as identificações e quantificações das amostras hidrolisadas por lipase, estão apresentados na Tabela 13. As imagens das placas cromatográficas para a trioleína 99%, trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico, acilgliceróis parciais e ácidos graxos livres estão apresentadas, como exemplo, nas Figuras 7 e 8. A identificação pode ser conferida pela ordem de distribuição dos acilgliceróis na corrida, pelo formato/tamanho das manchas nos cromatogramas e, principalmente, pelos Rfs encontrados.

A mistura de solventes e do material da placa adotado e empregado para a identificação e quantificação das frações lipídicas, a partir de um substrato baseado em TAGs, foram semelhantes aos usados por Wu *et al*. (1996), onde as análises qualitativas por cromatografia em camada delgada (TLC) foram realizadas em placas de sílica gel 60 (Merck) utilizando um sistema de solvente (hexano:éter dietílico:ácido acético - 80:20:1). Após o desenvolvimento durante 1 h, o solvente das placas foi evaporado e a revelação foi feita com iodo sólido. Os Rfs, a sequência de aparecimento e o tamanho/fomato das manchas ficaram bem definidos em todas as placas desenvolvidas e reveladas, demonstrando correspondência com o padrão previsto na literatura (MANGOLD & MALLINS, 1960).

Tabela 13 – Valores de R_f do óleo de girassol médio oléico e das trioleínas com 99% e 65% de pureza, bem como dos padrões de monooleína, dioleína e ácido oléico.

Lipídios empregados	Rf
Óleo de girassol médio oléico	
trioleína	0,73 ± 0,01
dioleína (mancha superior)	0,29 ± 0,01
dioleína (mancha inferior)	0,21 ± 0,01
Trioleína 65%	
monoleína	0,01 ± 0,005
dioleína (mancha inferior)	0,12 ± 0,01
dioleína (mancha superior)	0,19 ± 0,005
trioleína	0,65 ± 0,01
Trioleína 99%	0,73 ± 0,01
1-monoleína 99%	0,03 ± 0,005
1,2-dioleína 99% (mancha inferior)	0,17 ± 0,01
1,3-dioleína 99% (mancha superior)	0,26 ± 0,005
Ácido oléico 99%	0,48 ± 0,01

* resultados obtidos em triplicata

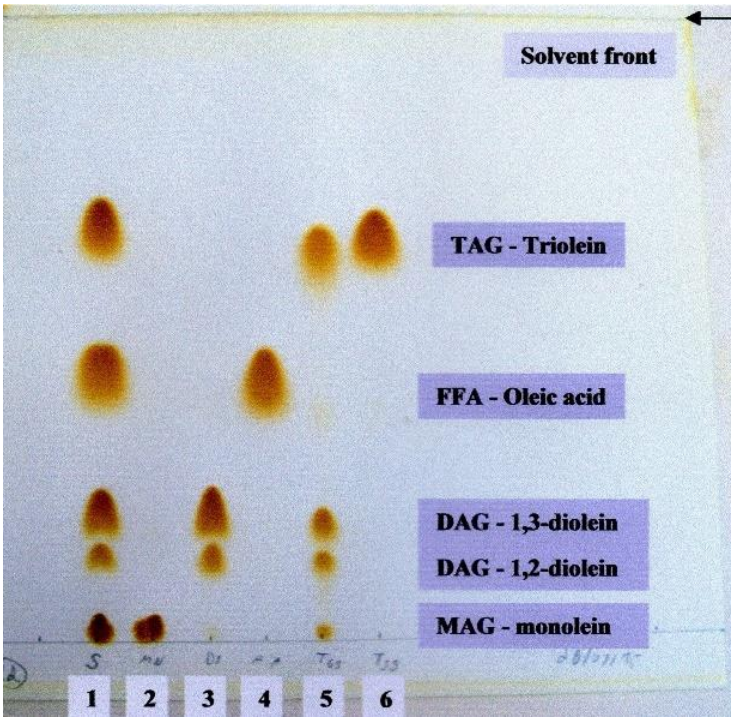


Figura 7 - Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão de ácidos graxos livres e acilgliceróis. Spot 1 = mistura em partes iguais dos padrões lipídicos puros (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína), Spot 2 = 1-monooleína, Spot 3 = 1,3-dioleína, Spot 4 = ácido oléico, Spot 5 = trioleína técnica e Spot 6 = trioleína pura); MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

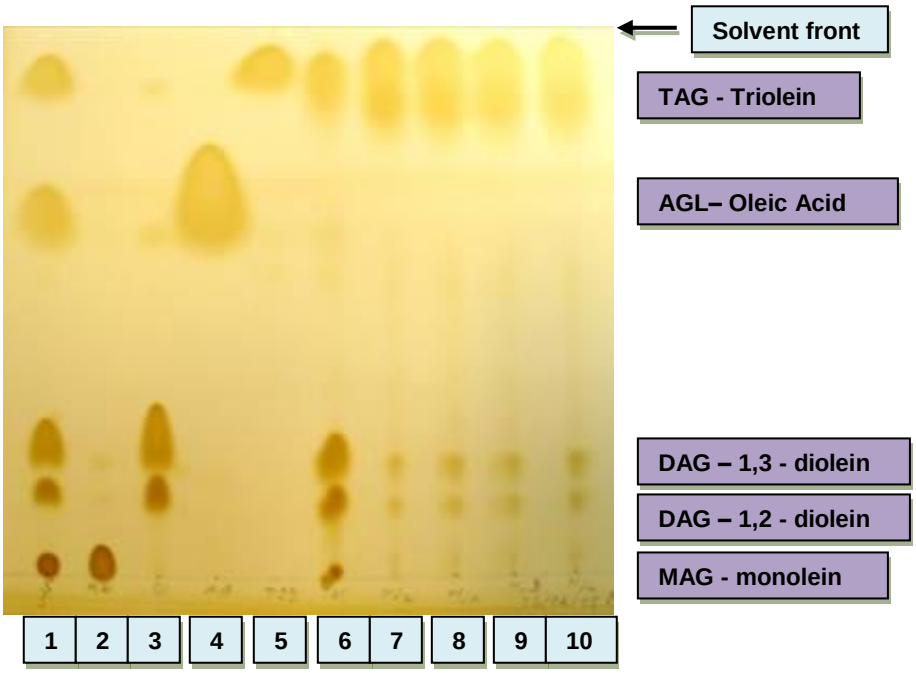


Figura 8 - Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão de ácidos graxos livres e acilgliceróis e óleo de girassol médio oléico. Spot 1 = mistura em partes iguais dos padrões lipídicos puros (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spot 2 = 1-monooleína, Spot 3 = 1, 3-

dioleína, Spot 4 = ácido oléico, Spot 5 = trioleína pura, Spot 6 = trioleína técnica e Spots 7-10 = óleo de girassol médio oléico; MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

Foi observada a mesma correspondência de solventes, proporções, placas e frentes de eluição (Rfs) nos estudos de Hassanein (1999), que também utilizou a técnica de TLC para separação, identificação e quantificação de componentes lipídicos extraídos de óleos originários de sementes de frutas como pêssego, ameixa e nectarina. O óleo obtido era predominante em triacilgliceróis (TAGs) e as frações menores continham diacilgliceróis (DAGs) e monoacilgliceróis (MAGs), bem como ácidos graxos livres (FFAs). O fracionamento foi realizado utilizando hexano / éter dietílico / ácido fórmico (70/30/1 v/v/v, respectivamente) como eluente. Foram localizadas as frações de TAG (Rf = 0,76), DAG (Rf = 0,25), MAG (Rf = 0,01) e AGL (Rf = 0,4).

Foi avaliado também o nível de correspondência entre a proporção em massa da mistura padrão em partes iguais dos acilgliceróis e ácido oléico empregada em todas as corridas das placas e a quantificação (em %) de composição fornecida em "volume" pelo programa JustTLC^{R}(Sweday), conforme se pode conferir na Tabela 14. Verifica-se boa correspondência entre a proporção em massa dos acilgliceróis e a quantificação (expressa em percentagem p/p) fornecida nos ensaios de TLC. Para validar esta correspondência, executaram-se testes de validação inter-amostras " Student T-test for dependable samples", índice de correlação e por elementos de atributos estatísticos descritivos (variância, desvio padrão, coeficiente de variação e coeficiente padrão). Observou-se que entre as amostras tomadas e as leituras dos resultados obtidos, os desvios padrões foram baixos ($\sigma < 2.5\%$), os índices de correlação (R^2) foram todos maiores que 0.85, os t – tests calculados foram inferiores que os t – previstos ($\upsilon = 7$) e que os coeficientes de variação (C.V.) também foram todos inferiores a 10 (C.V. máximo para $\upsilon = 7$). Ficou claro que o software JustTLC® indicou que os resultados eram significativos ($p<0,05$) e estatisticamente equivalentes (BARROS NETO *et al.,* 2001). Este comparativo serviu para demonstrar o potencial de uso da ferramenta de análise de imagens JustTLC® (Sweday) para identificar/quantificar o comportamento dos acilgliceróis ao longo do consumo do substrato empregado, em paralelo com os outros indicadores de desempenho de hidrólise e de composição das amostras.

Tabela 14 – Validação da metodologia JustTLC® pela comparação dos percentuais de ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triaciglicerói s presentes na mistura padrão com os percentuais de cada componente avaliados pelo *software*.

Componentes	Mistura padrão (% w/w)	JustTLC® (% w/w)*	Student t (calc t para 95% de confiança)	Student t (para σ = 7)	Índice de correlação amostras (R^2) (%)	Variância	Coeficiente de variação	Máx. C.V. (para σ = 7)
1-monooleína	24,72	23,13 ± 0,52	0,608	1,895	0,976	5,275	4,674	10
1,2/1,3-dioleína	23,92	24,01 ± 1,23	0,126	1,895	0,876	2,116	4,550	10
ácido oléico	27,43	28,33 ± 1,77	0,392	1,895	0,958	3,121	6,455	10
trioleína	23,92	24,47 ± 2,08	1,060	1,895	0,980	4,156	8,279	10

* dados em triplicata

4.2.2 – Composição em grupos lipídicos dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oleico por HPSEC

A separação dos componentes por cromatografia de exclusão foi proposta como uma avaliação complementar dos principais grupos de compostos que diferem em massa molecular, isto é, os TAGs, AGL, MAGs e DAGs, representativos de alteração por hidrólise enzimática. Esta metodologia tem contribuído cada vez mais para o desenvolvimento de aplicações em estudos de hidrólise, controle de qualidade de óleos refinados e caracterização de óleos brutos (MARQUEZ-RUIZ *et al*., 1996).

Os cromatogramas representativos de separação obtida por cromatografia de exclusão de óleo de girassol médio oléico e trioleína técnica são mostrados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Como se pode observar, os picos desenvolvidos por ordem de eluição inversa de massa molecular foram oriundos de TAGs, DAGs, MAGs e AGL, este último pico incluindo também frações de compostos insaponificáveis polares. A análise requisitou um tempo total de execução de aproximadamente 20 min. O último pico demonstrou em cada cromatograma uma sobreposição natural dos resultados de ácidos graxos e MAGs, resultado de um fenômeno natural de proximidade de níveis de polaridade dos compostos citados. Para que se possa separar estes efeitos de eluição e quantificar estes compostos, foi aplicada subtração do resultado quantificado obtido por metodologia de análise direta, como a medida de acidez (porcentagem de hidrólise), o que possibilita indicar a proporção de MAGs efetivamente encontrados, conforme apresentado na Tabela 15 (DOBARGANES *et al*.; 2000).

Nos casos em que melhor resolução é necessária, colunas adicionais podem ser utilizadas. Por outro lado, é importante verificar a eficácia da separação dos grupos lipídicos por TLC, antes da análise HPSEC, o que foi efetivamente realizado, uma vez que é a única prova de identificação eficiente dos

compostos acilglicerólicos não polares que, caso contrário, iriam eluir no mesmo tempo de retenção que o obtido para grupos de MAGs e DAGs (KITTIRATTANAPIBOON & KRISNANGKURA, 2008).

Tabela 15 - Composição e quantificação comparativa, por análise de TLC/HPSEC, dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico.

Ensaios	Resultados *			
	Mono e diacilgliceróis (TLC) (%)	Trioleína (TLC) (%)	Mono e diacilgliceróis (HPSEC) (%)	Trioleína (HPSEC) (%)
Óleo de girassol médio oléico	5,76±0,05	94,24±0,05	0,88±0,05	99,12±0,05
Trioleína técnica	42,72 ±0,05	57,28 ±0,05	47,92±0,05	53,06±0,05

* dados obtidos em triplicata

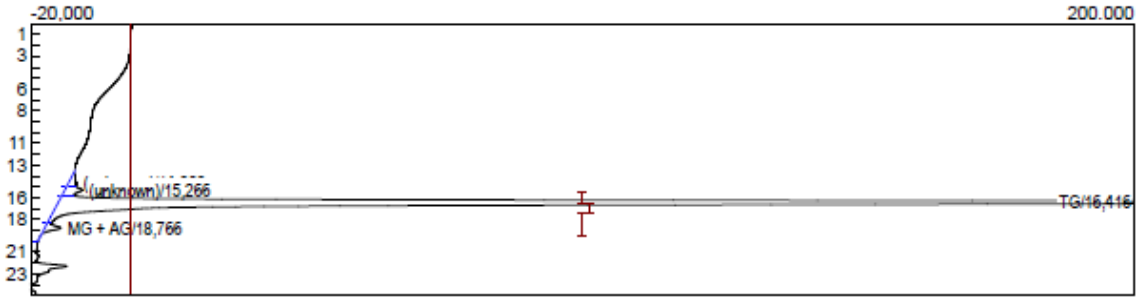


Figura 9 – Cromatograma HPSEC representativo de óleo de girassol médio oléico. Tempo de retenção (min): 16,41, triacilgliceróis; 18,76, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres.

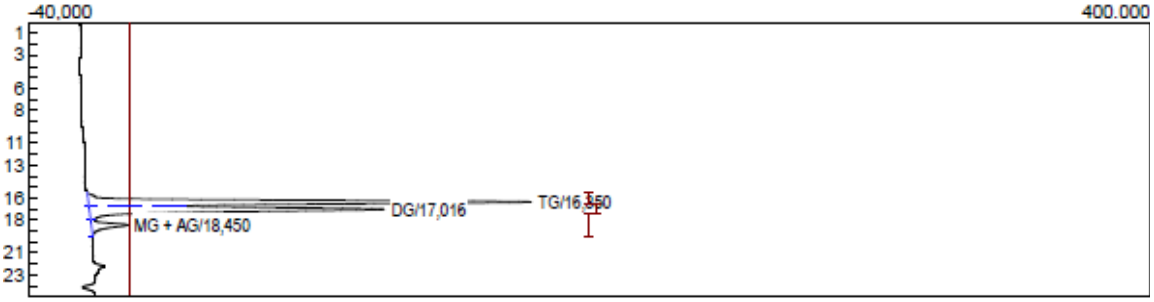


Figura 10 – Cromatograma HPSEC representativo de trioleína técnica. Tempo de retenção (min): 16,35, triacilgliceróis; 17,02, diacilgliceróis; 18,45, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres.

Verifica-se que a trioleína técnica, identificada como 65% de pureza, apresenta cerca de 55% de trioleína e 45% de MAGs e DAGs. A concordância entre os resultados obtidos por TLC e HPSEC pode ser considerada razoável.

4.2.3 – Identificação dos padrões e substrato trioleína técnica por DSC

Nas avaliações do comportamento térmico dos acilgliceróis empregados foram obtidas as curvas de cristalização e fusão, onde as temperaturas inicial (onset), final (endset) e as entalpias (ΔH) totais foram determinadas e confrontadas entre si e com dados da literatura para avaliação dos padrões de comportamento entre os picos, suas posições, formatos e dados calorimétricos.

As Figuras 11 e 12 apresentam as curvas de cristalização e fusão, respectivamente, enquanto a Tabela 16 mostra os valores das temperaturas onset, endset e das entalpias.

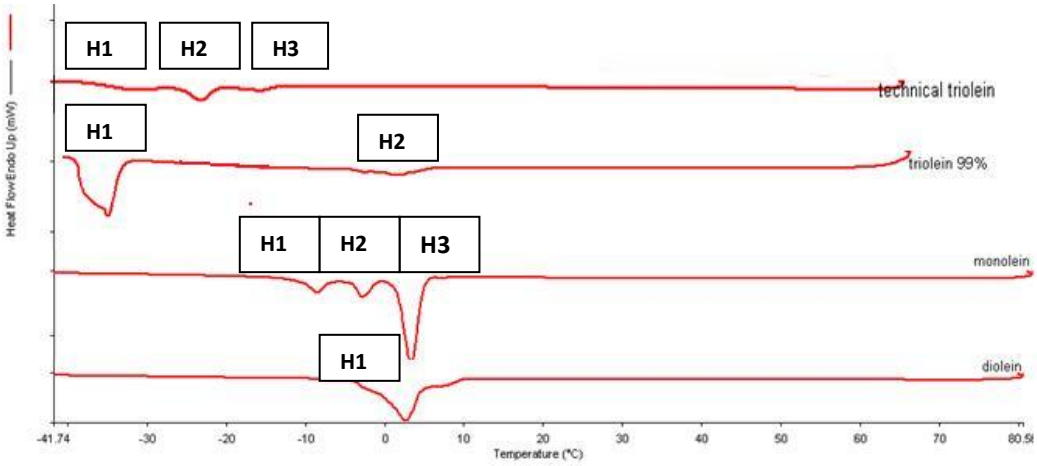


Figura 11 – Curvas de cristalização dos padrões empregados: trioleína técnica, trioleína 99%, 1-monoleína 99% e 1,3–dioleína 99%.

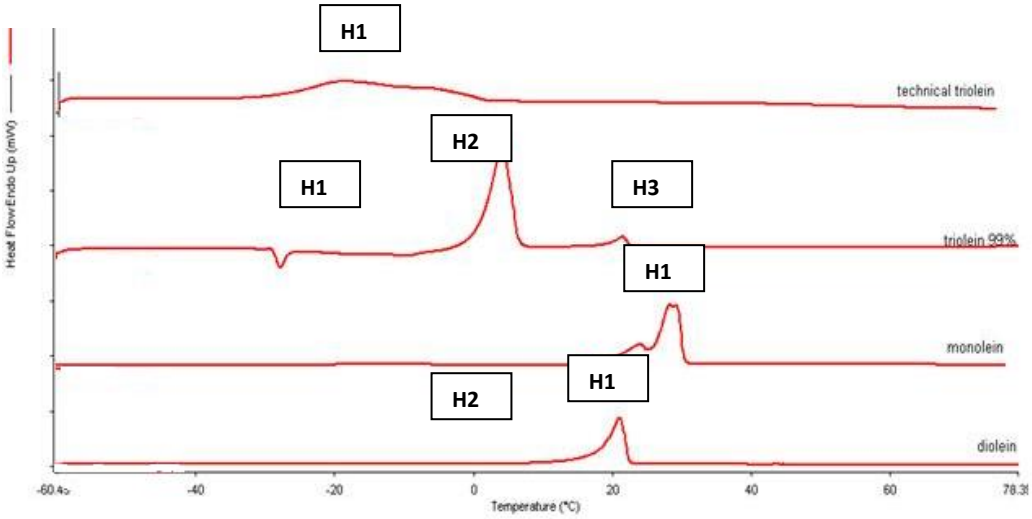


Figura 12 – Curvas de fusão dos padrões empregados: trioleína técnica, trioleína 99%, 1-monoleína 99% e 1,3–dioleína 99%

Tabela 16 – Dados calorimétricos (temperaturas onset e endset e entalpias) de cristalização e fusão do substrato trioleína técnica e padrões dos acilgliceróis.

Componente	Endset (ºC)			Onset (ºC)			ΔH total (J/g)
	cristalização						
	H1	H2	H3	H1	H2	H3	
1-monoleína	-11,88±1,41	-3,36±1,13	1,12±0,16	-8,06±0,58	-0,88±046	4,24±0,19	-60,65±6,98
1,3-dioleína	-1,21±0,76	----	-----	6,07±1,09	-----	-----	-63,51±0,47
trioleína técnica	-39,45±0,75	-27,33±0,25	-20,03±0,25	-29,66±0,38	-22,37±0,12	-13,17±0,06	-17,28±0,39
trioleína 99%	-45,29±0,21	0,58±0,16		-38,81±0,25	6,80±1,37		-91,38±1,57
	fusão						
	H1	H2	H3	H1	H2	H3	
1-monoleína	32,34±0,45			27,6±0,42			83,18±3,81
1,3-dioleína	22,33±0,08	0,22±0,06		17,92±0,03	-2,20±0,01		68,33±0,62
trioleína técnica	2,79±0,18			-28,22±0,12			46,34±0,54
trioleína 99%	-26,73±0,02	6,38±0,01	22,46±0,15	-29,24±0,58	0,58±0,02	19,32±0,18	170,27±0,97

* onde ΔH representa os valores de entalpia de cristalização ou fusão (J/g

Os resultados de temperatura de pico de cristalização da trioleína, 1,3-dioleína e 1-monooleína foram aproximadamente de -42, 2 e 3 °C, respectivamente, enquanto os resultados de temperatura de pico de fusão da trioleína, 1,3-dioleína e 1-monooleína foram aproximadamente de 4, 21 e 32 °C, respectivamente.

Segundo Silva *et al*. (2014) e Kodali *et al*. (1990), pode-se considerar que a trioleína cristalizou na forma α e fundiu na forma β. A 1,3-dioleína cristalizou na forma α e fundiu na forma β-prima ou β. A 1-monooleína cristalizou na forma α e fundiu na forma β-prima ou β. Como as temperaturas de cristalização da trioleína, 1,3-dioleína e 1-monooleína foram menores que as relatadas na literatura para a forma α, é possível que a cristalização tenha ocorrido em forma ainda mais instável (forma γ, por exemplo, mas não foram encontrados dados sobre esta possível forma polimórfica na literatura para estes compostos).

Estes dados de temperatura de pico de fusão são coerentes com o fato de que os MAGs e DAGs têm geralmente pontos de fusão maiores que os dos correspondentes TAGs, uma vez que os pontos de fusão de ésteres de ácidos graxos aumentam na seguinte ordem: 1,2-DAG < TAG < 2-MAG < 1,3-DAG < 1-MAG (BELITZ *et al*., 2009).

A discussão sobre os dados de DSC dos padrões é relativamente mais fácil, porque os picos são mais definidos, uma vez que são substâncias puras, e é possível a comparação com a literatura. Por outro lado, a discussão sobre a cristalização e fusão da trioleína técnica é mais difícil, porque ocorrem interações entre os diversos componentes presentes, como se pode verificar em Silva *et al*. (2014), em que mesmo pequenas quantidades de DAGs afetam a cristalização dos TAGs.

Esta dificuldade foi encontrada na análise das curvas de cristalização e fusão da trioleína técnica, que foi utilizada como substrato para as reações de hidrólise enzimática descontínua. Nas análises de composição feitas por TLC, obteve-se que o principal contaminante da trioleína técnica era dioleína, que deslocou as temperaturas onset e endset de cristalização entre -45 ºC e -40 ºC para níveis entre -20 ºC e -15 ºC. Da mesma forma, comparando as curvas de fusão da trioleína pura e da trioleína técnica, também observou-se um deslocamento das temperaturas onset e endset de fusão do pico principal do patamar de entre 2 e 3 ºC para entre -15 ºC e -20 ºC.

A trioleína é o componente principal do azeite de oliva e do óleo de girassol alto e médio oléico. A existência de três fases polimórficas de trioleína (β, ß-prima e α) foi confirmada por Akita *et al*. (2006), com base em estudos de difração de raios X e dados calorimétricos. Foram encontradas duas formas polimórficas para a 1,3-dioleína. Por difração de raios-X estas foram confirmadas como sendo α (de ponto de fusão 18 °C) e β (de ponto de fusão 25 °C). Na presente investigação foi encontrado o valor de 21 °C para o ponto de fusão da 1,3-dioleína. Para a 1-monooleína, várias formas polimórficas foram observadas. A forma I, uma modificação estável, fundiu a 32,0 °C, relatada como β-prima. A forma II fundiu a 25,0 °C, sendo relatada como α, enquanto a forma III fundiu a 12,5 °C. Além dessas, foi encontrada uma quarta forma, que funde a 35,0 °C, relatada como β. Portanto, os dados obtidos neste trabalho indicam a fusão da forma β-prima da 1-monooleína.

A trioleína analisada por DSC também demonstrou correspondência dos pontos de fusão com os estudos executados por KODALI *et al*. (1987), sinalizando a identificação de suas principais formas polimórficas, no caso a instável alfa e as estáveis beta-prima e beta, pelos seus pontos de fusão (α = -32 °C; ß-prima = -13 °C; β = 5,5 °C).

4.2.4 – Perfil de ácidos graxos do substrato óleo de girassol médio oléico

Os resultados da composição em ácidos graxos para óleo de girassol médio oléico, obtidos por cromatografia gasosa e para óleo de girassol comum, oriundo das referências consultadas, foram apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Composição em ácidos graxos do óleo de girassol comum e com alto e médio oléico

Ácido graxo (% em massa)	Óleo de girassol comum*	Óleo de girassol alto oléico*	Óleo de girassol médio oléico**
Palmítico (16:0)	5,6-7,6	3,0-4,8	5,79 ± 0,02
Esteárico (18:0)	2,7-6,5	2,7-6,5	3,21 ± 0,03
Oléico (18:1)	14,0-39,4	75,0-85,0	69,71 ± 0,01
Linoléico (18:2)	48,3-74,0	8,0-10,0	18,98 ± 0,02
Linolênico (18:3)	< 0,2	< 0,3	0,77 ± 0,02
Araquídico (20:0)	0,2-0,4	0,2-0,5	0,26 ± 0,03
Behênico (22:0)	0,5-1,3	0,5-1,1	0,84 ± 0,02
Lignocérico (24:0)	0,2-0,3	---	0,44 ± 0,01

(* dados de O'Brien, 2004; ** dados obtidos experimentalmente, em triplicata)

A composição do substrato óleo de girassol médio oléico está alinhada com o encontrado na literatura de referência (O´BRIEN, 2004) e na Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006). Os ácidos graxos saturados do óleo de girassol médio oléico constituem cerca de 11%, sendo predominante o ácido palmítico, enquanto os ácidos graxos insaturados representam cerca de 89%, sendo predominante o ácido oléico (70%).

4.2.5 – Composição em triacilgliceróis do substrato óleo de girassol médio oléico

A composição em TAGs dos óleos e gorduras é responsável pela maior parte das propriedades físicas que afetam a utilização do substrato pelas lipases, como disponibilidade de sítios ativos e orientação dos radicais carboxílicos de grupos oléicos (BESSLER & ORTHOEFER, 1983). Por isso, as corretas identificação e quantificação dos TAGs são necessárias para o entendimento das propriedades físicas, que podem influenciar a reatividade de um substrato oleoso e prover maior rendimento reacional (WANG *et al.*, 2011). Contudo, a identificação de TAGs é um difícil processo, no qual o número de possíveis formas estruturais é muito grande comparado ao número de ácidos graxos presentes (RIBEIRO *et al.*, 2007). Na Tabela 18, observa-se o resultado da análise de TAGs individuais obtida por cromatografia líquida de alta eficiência, a qual está alinhada com os dados fornecidos pelas referências consultadas (GUNSTONE, 2007). A presença predominante do grupo trioleína (correspondente a 32,7% dos TAGs identificados pela análise cromatográfica) e de demais grupos oléicos (PPO, POO, POO, OOL, StOO, OLO, OOBe, POL e OLL) na composição geral, confirma a pertinência da escolha desta variedade comercial do óleo de girassol para servir de substrato oleoso para a emulsão O/A utilizada para que se obtenha uma otimizada eficiência de conversão hidrolítica enzimática.

Tabela 18 - Composição em triacilgliceróis do óleo de girassol normal e óleo de girassol alto e médio oléico

TAG (% em massa)	Óleo de girassol comum*	Óleo de girassol alto oléico*	Óleo de girassol médio oléico**
PPO			0,7 ± 0,05
POO			8,1 ± 0,05
OOO	3,0	51,1	38,9 ± 0,05
POSt	3,5	8,7	---
POL			4,5 ± 0,05
OOL			28,6 ± 0,05
PStO			0,8 ± 0,05
PLL	9,6	2,5	0,8 ± 0,05
OLL	29,5	7,5	8,5 ± 0,05
LLL	27,2	5,6	1,3 ± 0,05
StOO			4,5 ± 0,05
OLO	11,0	9,5	---
POP	0,5		---
PLO	10,0	4,0	---
OOBe			1,1 ± 0,05
OLBe			0,6 ± 0,05

O = oléico, L= linoléico, P = palmítico, St= esteárico, Be= behênico

(* dados de Gunstone, 2007; ** dados experimentais obtidos em triplicata)

Para complementar o entendimento da composição de produtos, as propriedades físicas de uma gordura são mais facilmente interpretadas quando TAGs são designados pelo seu grau de saturação: trissaturados (S_3), dissaturados-monoinsaturados (S_2U), monossaturados-diinsaturados (SU_2) e tri-insaturados (U_3), ao invés de considerar cada espécie de triacilglicerol (NEFF *et al.*, 2001). Os ácidos graxos insaturados são representados pela letra U e os saturados pela letra S.

Desta forma, o óleo de girassol normal apresenta 26,6% de diinsaturados-monossaturados, 3,1% de monoinsaturados-dissaturados, 70,2% de tri-insaturados e 0,3% de trissaturados (O'BRIEN, 2004).

Por outro lado, com base nos dados experimentais obtidos, o óleo de girassol médio oléico apresentou 15,1% de diinsaturados-monossaturados, 7,6% de monoinsaturados-dissaturados, 77,3% de

tri-insaturados e 0% de trissaturados, demonstrando o alinhamento desta variedade de óleo de girassol no fornecimento de TAGs com forte presença de TAGs tri-insaturados ricos em ácido oléico, o que de fato interessa para que se obtenha um bom substrato com afinidade para conversão enzimática pela enzima escolhida. Lo *et al*. (2007) verificaram que a enzima Lipozyme RM IM apresentou elevada seletividade para a produção de DAGs ricos em ácido oléico.

4.3 – Identificação, caracterização e quantificação das frações lipídicas do substrato hidrolisado de trioleína técnica em regime descontínuo por cromatografia em camada delgada (TLC), acidez (porcentagem de hidrólise) e por HPSEC

Esta fase do projeto tem a finalidade de sinalizar os melhores atributos de processo de hidrólise enzimática (porcentagem de emulsão óleo/água, tempo e temperatura de reação), que foram empregados para a fase final de reação enzimática com fonte lipídica natural rica em trioleína disponível no mercado (no caso, óleo de girassol médio oléico). Desta forma, a identificação da composição e quantificação do substrato trioleína técnica hidrolisado por lipase, em suas frações de AGL, MAGs e DAGs e TAGs não consumidos foram realizadas inicialmente em placas de TLC, como no exemplo da Figura 13, onde as manchas das corridas cromatográficas foram reveladas e seguiram a mesma distribuição apresentada na Tabela 13.

A correspondência entre estes dados demonstra a presença das categorias de compostos esperados, ou seja, os MAGs e DAGs formados, a presença da trioleína não consumida e a crescente presença de ácidos graxos livres formados.

Na Figura 13, observa-se que as manchas das frações ficaram bastante evidentes, claras, com contornos e densidades marcantes, o que permitiu que pudessem ser tratadas por meio do software JustTLC® e extrair adequados resultados para a caracterização e quantificação das espécies lipídicas hidrolisadas.

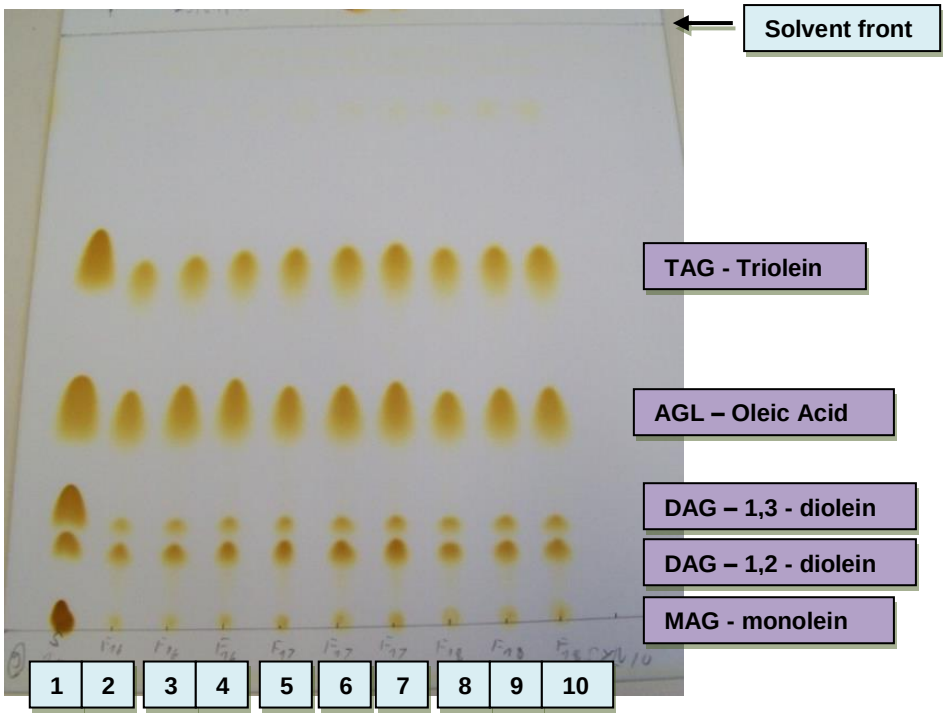


FIGURA 13 - Análise por cromatografia de camada delgada (TLC) de mistura padrão e produtos de hidrólise de emulsão 20% O/A de trioleína técnica. Spot 1 = mistura padrão (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spots 2-4 = hidrolisados a 60 ºC/2 h), Spots 5–7 = hidrolisados a 40 ºC/4 h), Spots 8-10 = hidrolisados a 50 ºC/3 h); MAG monoacilgliceróis, DAGs diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

Os resultados de composição e quantificação das amostras hidrolisadas, em suas frações de ácidos graxos, MAGs e DAGs formados e triacilgliceróis não consumidos, fornecidos pela ferramenta de análise de imagens de TLC, serão apresentados nas Tabelas 21 e 22, as quais já incluem elementos da análise de superfície de resposta. Nestas tabelas temos somados os valores correspondentes às manchas das frações 1,2 e 1,3-dioleína, chamada de dioleína total.

Apesar de ter sido empregada 1,3-dioleína como padrão, foi observado que a aplicação deste composto, sob a influência da mistura de solventes adotada e do tipo de fase fixa utilizada (no caso, sílica gel), provocava a isomerização, com a consequente formação de 1,2-dioleína por migração acil, conforme demonstrado no trabalho de Sedarevich (1967).

Como forma de acompanhar as tendências gerais dos resultados obtidos nas hidrólises executadas, alguns dos dados mais significativos das Tabelas 21 e 22 são apresentados nas Figuras 14 e 15, relatando o desempenho da reação nos substratos com 5% e 20% de óleo, respectivamente.

Para os cálculos de porcentagem de hidrólise, as massas molares médias dos ácidos graxos dos substratos trioleína técnica e óleo de girassol médio oléico foram, 282,47 e 283,15 kg/kmol,

respectivamente, calculados a partir dos dados de composição apresentados nas Tabelas 19 e 20. A Eq. (6) foi suficientemente precisa ($p < 0,05$) para quantificar a hidrólise.

Tabela 19 - Distribuição de ácidos graxos na trioleína.

Ácido graxo	Insaturação	% p/p	Fórmula	Massa molar (kg/ kmol)
oléico	18:1	100	$C_{17}H_{33}COOH$	282,47

Tabela 20 - Distribuição de ácidos graxos no óleo de girassol médio oléico.

Ácido graxo	Insaturação	% p/p	Fórmula	Massa molar (kg/ kmol)
palmítico	16:0	5,8	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	256,43
esteárico	18:0	3,3	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	284,48
oléico	18:1	68,0	$C_{17}H_{33}COOH$	282,47
linoléico	18:2	19,0	$C_{17}H_{33}COOH$	280,46
linolênico	18:3	0,8	$C_{17}H_{33}COOH$	278,42
araquídico	20:0	0,3	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	312,54
behênico	22:0	0,8	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	340,60

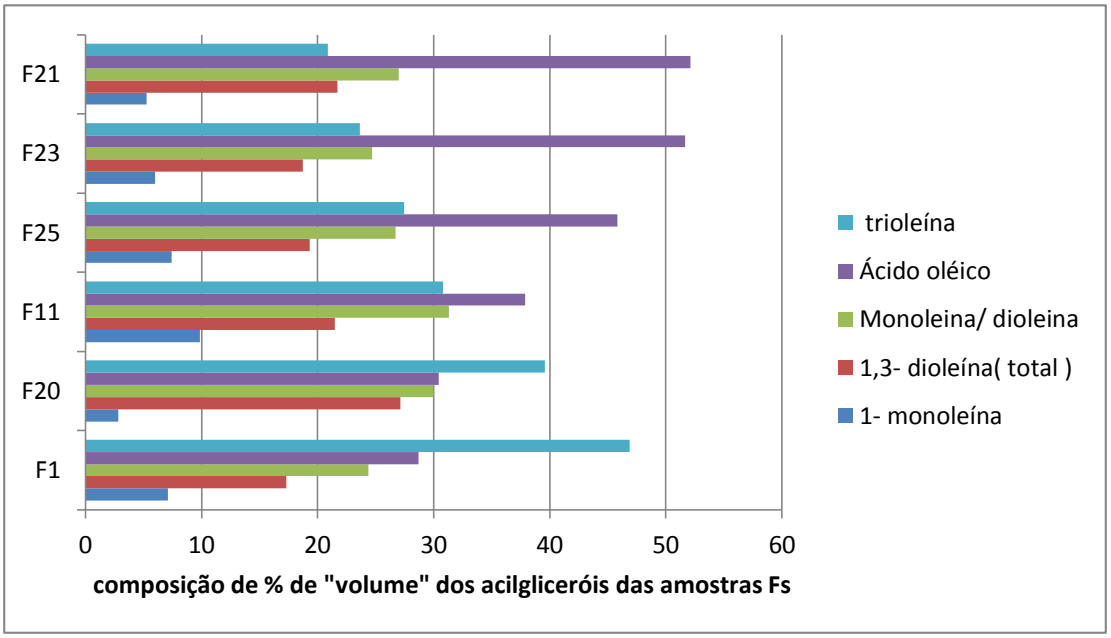


Figura 14 – Hidrólise enzimática descontínua da trioleína técnica (teor inicial de óleo na emulsão = 5%) e formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácido oléico (as condições de processos das fórmulas encontram-se explicadas na Tabela 21)

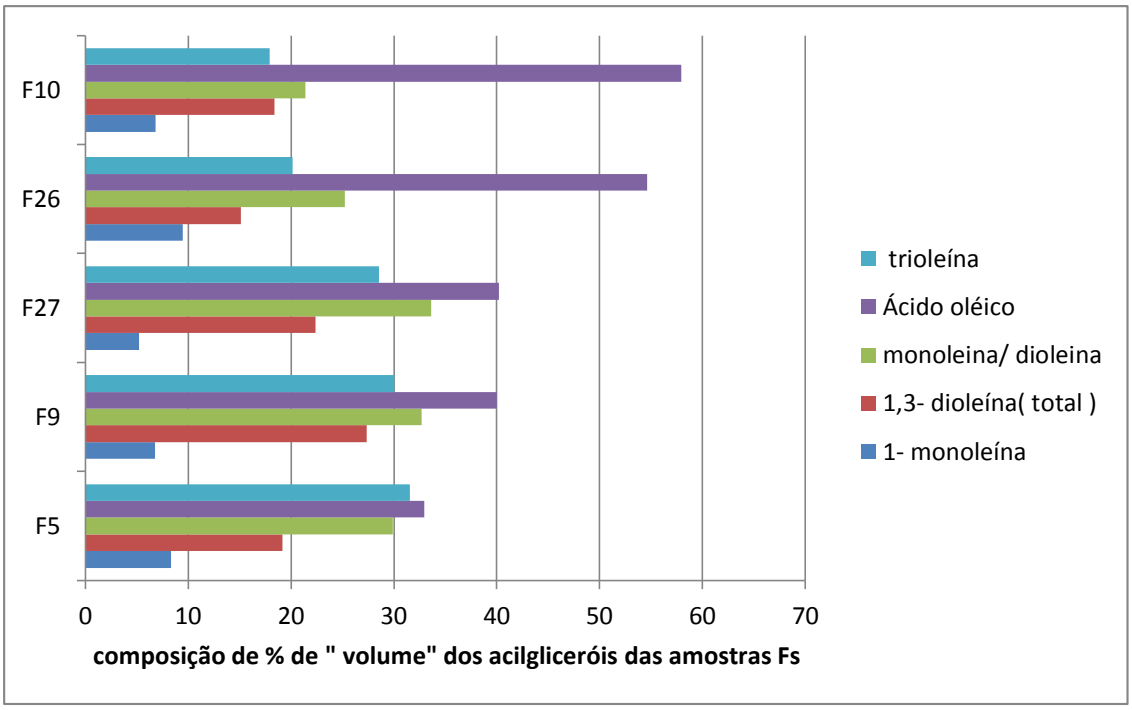


Figura 15 – Hidrólise enzimática descontínua da trioleína técnica (teor inicial de óleo na emulsão = 20%) e formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e ácido oléico (as condições de processos das fórmulas encontram-se explicadas na Tabela 22)

Desta forma, as Figuras 14 e 15 representam curvas características de reações consecutivas da hidrólise enzimática descontínua ocorrida, em que se verifica que a concentração dos intermediários desejados, MAGs e DAGs, separados e somados, crescem até um valor máximo e então caem, enquanto que a curva do substrato trioleína diminui gradativamente ao desenrolar da reação, ao contrário da do ácido graxo liberado, que aumenta continuamente.

FERGA *et al*. (1993) relataram que diacilgliceróis estão normalmente presentes em quantidade de 1-3% em óleos vegetais e são encontrados como isômeros 1,2- e 1,3-diacilgliceróis. A presença de 1,2-diacilgliceróis é conhecida por ser devido à biossíntese incompleta de TAGs, enquanto os 1,3-diacilgliceróis são derivados principalmente da hidrólise dos TAGs, aumentando com o crescente aumento do teor em ácidos graxos livres (FFAs) no óleo.

Observa-se também que a porcentagem de ácidos graxos livres formados foi influenciada pelo teor de óleo inicial na emulsão, com níveis 40-90% maiores de ácidos graxos livres para o teor de 20% de óleo na emulsão, para todos os parâmetros de processo (tempo/temperatura) empregados.

De forma similar, o consumo de trioleína também apresentou diferenças quanto ao teor de óleo no substrato inicial, havendo aumento de consumo entre 30-60% em todas as faixas de parâmetros empregados para o teor de 20% de óleo na emulsão inicial, demonstrando boa afinidade da enzima

escolhida em maior presença de substrato, o que melhora o rendimento de reação nos sítios ativos da enzima.

Quanto aos aspectos acima, é interessante notar também que os rendimentos de consumo de substrato oleoso e a formação de ácidos graxos livres foram bastante pronunciados nas faixas intermédiárias de reação, ou seja, entre 40 °C/4,0 h e 50 °C/4,0 h, tendendo a um equilíbrio, à medida que as condições de processo caminhavam para parâmetros de maior severidade de reação (65 °C/4,4 h).

Nota-se também que o teor máximo e intermediário de MAGs é, nas duas condições de teor de óleo, inferior ao dos DAGs, ocorrendo também em condições de tempo e temperatura maiores. Observou-se também uma quantidade de formação de MAGs sempre maior em todas as faixas de tempo/temperatura, quando o teor inicial de óleo no substrato é maior.

Com relação à fração ácido graxo livre (ácido oléico), a curva característica apresenta aspecto sigmóide, bastante pronunciada na Figura 15. Em se tratando de curva sigmóide, apresenta ponto de inflexão, que na Figura 14 e 15 ocorre nas condições de processo 40 °C/4,0 h.

Nas curvas de formação de dioleína observa-se um crescimento expressivo, para os dois teores de óleo na emulsão, na fase mais branda de reação, com pico de formação em 40 °C/4,0 h. A partir deste ponto, foi observado um decréscimo, até atingir patamares próximos ao obtido na primeira condição de processo (50 °C/3,0 h), com leve subida nas condições intermediárias de processo e estabilizando em 20% em massa, nas faixas mais severas de processo.

Kaewthong & Kittikun (2004) sinalizaram efeitos interessantes sobre a formação de MAGs e DAGs durante as reações de glicerólise, que geram estes produtos em condição intermediária, com perfis de desempenho e observações similares quanto às alterações de concentração de substrato e temperatura de reação. Na concentração de 10% (p/v) de oleína de palma em mistura de acetona:iso-octano (3:1, v:v) foi obtido o melhor rendimento de MAGs/DAGs (43,68%, correspondente a 1,2 mol MAGs/DAGs por mol de TAG inicial) após 24 h de incubação. Quando a concentração de oleína de palma foi inferior a 10% (p/v), o rendimento de MAGs/DAGs diminuiu ligeiramente. Isso pode ser devido a duas razões: (1) o solvente inibe a atividade da enzima no substrato de baixa concentração; e (2) adição de solvente diminui a quantidade de substrato disponível na interface entre o solvente e o triacilglicerol e, portanto, diminui o rendimento de MAGs/DAGs.

Da mesma forma, nos resultados deste trabalho, quando a temperatura foi controlada na faixa de 35-45 °C, a produção de MAGs aumentou com o aumento da temperatura para as duas porcentagens de óleo empregadas (Vide Figuras 14 e 15). Este resultado é uma consequência do aumento da velocidade de reação à medida que a temperatura aumenta. Em contraste, quando se aumenta temperatura para 45-65 °C, o rendimento de MAGs diminuiu.

Para a validação dos resultados obtidos e para melhor interpretação da interrelação entre os dados observados e as tendências indicadas pelos resultados já comentados, as técnicas da metodologia de superfície de resposta foram utilizadas para avaliar a influência das variáveis de processo sobre a hidrólise enzimática. Este planejamento colocou como objetivo avaliar o efeito da temperatura, da composição da emulsão e do tempo de reação (variáveis independentes) sobre as respostas taxa de formação de MAGs e DAGs, trioleína residual e obtenção de ácidos graxos livres.

Portanto uma equação polinomial de segunda ordem foi usada para estabelecer um modelo matemático preditivo, cuja equação geral (Eq. 8) foi:

$$Y = bo + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \qquad \text{Eq. 8}$$

onde:

Y= é a função resposta genérica
x= são as variáveis codificadas, obtidas a partir das variáveis originais
b= são os coeficientes estimados pelos métodos dos mínimos quadrados

As Tabelas 21 e 22 apresentam os ensaios codificados e realizados, assim como os resultados obtidos para o planejamento fatorial dos substratos de emulsões 5 e 20% óleo/água.

Para cada reação de hidrólise enzimática parcial da trioleína os dados obtidos foram tratados estatisticamente, sendo submetidos à regressão múltipla com a finalidade de propor um modelo polinomial que representasse cada sistema na região estudada, na superfície de resposta.

Tabela 21 - Trioleína residual (RT), MAGs/DAGs (M/D) e FFAs presentes no hidrolisado pela ação da lipase imobilizada em emulsão de trioleína/água a 5%. Os números entre parênteses (de -√2 a + √2) referem-se às variáveis codificadas relativas à temperatura e tempo de reação. Na coluna de amostras, os códigos entre parênteses referem-se denominações empregadas nas placas de TLC e foram mantidas para facilitar a identificação nas várias figuras em que são referendadas. * Valores calculados através de JustTLC®; ** valores teóricos; *** percentagem de hidrólise.

Amostra (n)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	M/D* (%)	M/D** (%)	RT* (%)	RT** (%)	AGL*** (%)	AGL** (%)
1 (F1)	40 (-1)	2 (-1)	26,39±0,03	27,62±0,05	47,76±0,04	51,65±0,05	15,41±0,19	17,04±0,05
2 (F4)	60 (+1)	2 (-1)	25,05±0,02	26,79±0,05	38,14±0,02	41,10±0,05	19,63±0,26	19,46±0,05
3 (F20)	40 (-1)	4 (+1)	29,93±0,03	34,66±0,05	42,36±0,03	42,62±0,05	30,92±0,36	27,80±0,05
4 (F21)	60 (+1)	4 (+1)	26,03±0,01	27,34±0,05	22,89±0,04	21,54±0,05	49,25±0,21	59,38±0,05
5 (F22)	35 (-√2)	3 (0)	28,71±0,04	26,17±0,05	46,89±0,04	46,11±0,05	27,15±0,07	15,95±0,05
6 (F23)	65 (+√2)	3 (0)	24,70±0,02	25,93±0,05	23,64±0,05	18,39±0,05	55,93±0,04	60,47±0,05
7 (F24)	50 (0)	1,6 (-√2)	34,19±0,03	36,10±0,05	43,27±0,01	45,75±0,05	14,79±0,13	18,92±0,05
8 (F25)	50 (0)	4,4(+√2)	29,17±0,01	26,81±0,05	28,93±0,01	29,06±0,05	39,91±0,19	37,37±0,05
9 (F11)	50 (0)	3 (0)	31,12±0,03	31,14±0,05	29,79±0,03	31,25±0,05	37,10±0,24	38,21±0,05
10 (F11)	50 (0)	3 (0)	31,33±0,02	31,14±0,05	30,80±0,02	31,25±0,05	38,80±0,34	38,21±0,05
11 (F11)	50 (0)	3 (0)	30,91±0,02	31,14±0,05	32,37±0,02	31,25±0,05	40,53±0,57	38,21±0,05
12 (F11)	50 (0)	3 (0)	31,51±0,03	31,14±0,05	31,81±0,02	31,25±0,05	39,52±0,57	38,21±0,05

Tabela 22 - Trioleína residual (RT), MAGs/DAGs (M/D) e FFAs presentes no hidrolisado pela ação da lipase imobilizada numa emulsão de trioleína/água a 20%. Os números entre parênteses (de -√2 a + √2) referem-se às variáveis codificadas relativas à temperatura e tempo de reação. Na coluna de amostras, os códigos entre parênteses referem-se denominações empregadas nas placas de TLC e foram mantidas para facilitar a identificação nas várias figuras em que são referendadas. * Valores calculados através de JustTLC®; ** valores teóricos; *** percentagem de hidrólise.

Amostra (n)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	M/D* (%)	M/D** (%)	RT* (%)	RT** (%)	AGL*** (%)	AGL** (%)
13 (F3)	40 (-1)	2 (-1)	31,52±0,04	33,52±0,05	42,93±0,04	42,55±0,05	25,19±0,13	29,25±0,05
14 (F5)	60 (+1)	2 (-1)	29,89±0,02	35,85±0,05	30,69±0,02	31,55±0,05	32,94±0,64	37,41±0,05
15 (F9)	40 (-1)	4 (+1)	32,67±0,03	36,49±0,05	30,03±0,03	33,4±0,05	40,03±0,24	47,17±0,05
16 (F10)	60 (+1)	4 (+1)	21,39±0,04	19,19±0,05	17,91±0,04	14,38±0,05	57,97±0,19	54,53±0,05
17 (F13)	35(-√2)	3 (0)	27,45±0,04	32,78±0,05	35,11±0,04	37,07±0,05	34,89±0,08	29,88±0,05
18 (F26)	65(+√2)	3 (0)	25,21±0,05	21,97±0,05	20,16±0,05	18,73±0,05	54,63±0,72	57,23±0,05
19 (F27)	50 (0)	1,6(-√2)	33,62±0,01	40,22±0,05	43,23±0,01	43,20±0,05	19,82±0,83	28,57±0,05
20 (F28)	50 (0)	4,4(+√2)	28,95±0,01	30,32±0,05	18,81±0,01	20,47±0,05	48,93±0,28	50,11±0,05
21 (F14)	50 (0)	3 (0)	27,19±0,03	27,38±0,05	20,32±0,03	22,03±0,05	49,54±0,17	50,13±0,05
22 (F14)	50 (0)	3 (0)	26,79±0,02	27,38±0,05	22,85±0,02	22,03±0,05	50,69±0,23	50,13±0.05
23 (F14)	50 (0)	3 (0)	27,58±0,02	27,38±0,05	21,72±0,02	22,03±0,05	49,13±0,23	50,13±0,05
24 (F14)	50 (0)	3 (0)	27,95±0,02	27,38±0,05	23,12±0,02	22,03±0,05	51,15±0,85	50,13±0,05

Os valores finais médios encontrados experimentalmente para a formação de MAGs e DAGs para 5% de porcentagem de óleo na emulsão inicial, apresentados na Tabela 21, variaram de 24,70 a 34,19%.

Para cada reação de hidrólise enzimática parcial de emulsão 5% O/A os dados foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão múltipla, a fim de propor um modelo polinomial representando cada sistema na região estudada.

Os coeficientes não significativos foram excluídos (p> 0,05), com as seguintes equações ajustadas:

$Y= 31,14 -5,01X_1^2 – 0,64 X_2$ (formação de MAGs/DAGs) (9)

$Y= 31,25 – 15,05X_1 – 10,28X_2 + 4,51X_1^2 + 6,19X_2^2 - 4,92X_1X_2$ (trioleína residual) (10)

$Y= 38,21 + 15,79X_1 + 19,96X_2 – 14,58X_2^2$ (formação de FFAs) (11)

(onde: X_1 = temperatura e X_2 = tempo)

As equações mostram que a formação de MAGs e DAGs, o nível de trioleína residual e a formação de ácidos graxos livres foram dependentes dos termos lineares de temperatura e tempo de reação e no termo quadrático de tempo.

Os coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e do erro padrão para a presença de MAGs e DAGs, trioleína residual e formação de ácidos graxos livres para a emulsão com 5% de óleo na emulsão inicial estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 5% de óleo (p≤0,05)

	b_0	Erro	b_1	Erro	b_2	Erro	b_{11}	Erro	b_{22}	Erro	b_{12}	Erro	R^2
MAG/DAG	**31,14**	**1,14**	-2,65	1,56	**-0,64**	**1,62**	**-5,01**	**1,64**	-0,86	1,84	-1,28	0,38	**0,7792**
Trioleína	**31,25**	**0,80**	**-15,05**	**1,09**	**-10,28**	**1,13**	**4,51**	**1,15**	**6,19**	**1,29**	**-4,92**	**1,59**	**0,9812**
FFAs	**38,31**	**2,19**	**15,79**	**3,11**	**19,96**	**3,11**	0,18	3,47	**-14,58**	3,47	7,31	**4,39**	**0,9364**

b_0, constante; b_1, coeficiente de temperatura linear; b_2, coeficiente de tempo linear; b_{11}, coeficiente de temperatura quadrática; b_{22}, coeficiente de tempo quadrático; b_{12}, regressão de produto cruzado de temperatura e tempo; R^2, coeficiente de determinação; Elementos significativos em negrito e não significativos em fonte normal.

Após a exclusão de fatores não significativos, a regressão mostrou-se significativa a um nível de confiança de 95% (p ≤ 0,05) pelo teste F na análise de variância (ANOVA). Os resultados revelaram altos coeficientes de determinação (R^2) com um bom ajuste de dados experimentais ao modelo, como confirmado pelo valor F calculado.

As amostras do ponto central foram utilizadas para avaliar o erro dos modelos (Tabelas 21 e 22). Os erros presentes para os coeficientes de correlação obtidos foram todos inferiores a 2% (valor aceitável 10%), confirmando assim que os modelos foram também preditivos e adequados para representar um modelo e gerar superfícies de resposta. Os ajustes de modelo foram considerados significativos, evidenciados pelos altos valores de coeficiente de determinação / regressão.

Os valores ajustados utilizando os modelos são também apresentados nas Tabelas 21 e 22 e encontram-se dentro do intervalo de confiança calculado.

A Tabela 24 representa os valores de F calculados e tabulados mostrando que o modelo apresentou regressão significativa (calculado F maior do que F tabulado) no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 5% de óleo ($p \leq 0,05$)

Variáveis	ANOVA	SS	DF	MS	F calculado	F tabelado
MAG/DAG	Regressão/ resíduo	76,00/ 21,16	5/ 6	35,2/ 3,52	10,0	3.20
Trioleína	Regressão/ resíduo	795,65/ 15,23	5/ 6	159,13/ 2,54	62,65	3.20
AGL	Regressão/ resíduo	1707,51/ 115,68	5/ 6	341,10/ 19,24	17,73	3.20

Outro indicador da preditividade de um modelo é quando o valor F calculado é mais de três vezes maior do que o valor F tabulado (Box & Hunter, 1978), sendo este o caso para todas as variáveis analisadas no presente estudo (Tabela 24). Portanto, os coeficientes obtidos indicam uma tendência ao comportamento confiável destas respostas para as variáveis estudadas. Dado que os modelos propostos são válidos, as equações de regressão permitem prever o efeito dos dois parâmetros estudados na hidrólise do substrato oleoso. A relação entre as variáveis independentes e dependentes é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta criada pelos modelos em cada amostra (Figuras 16, 17 e 18).

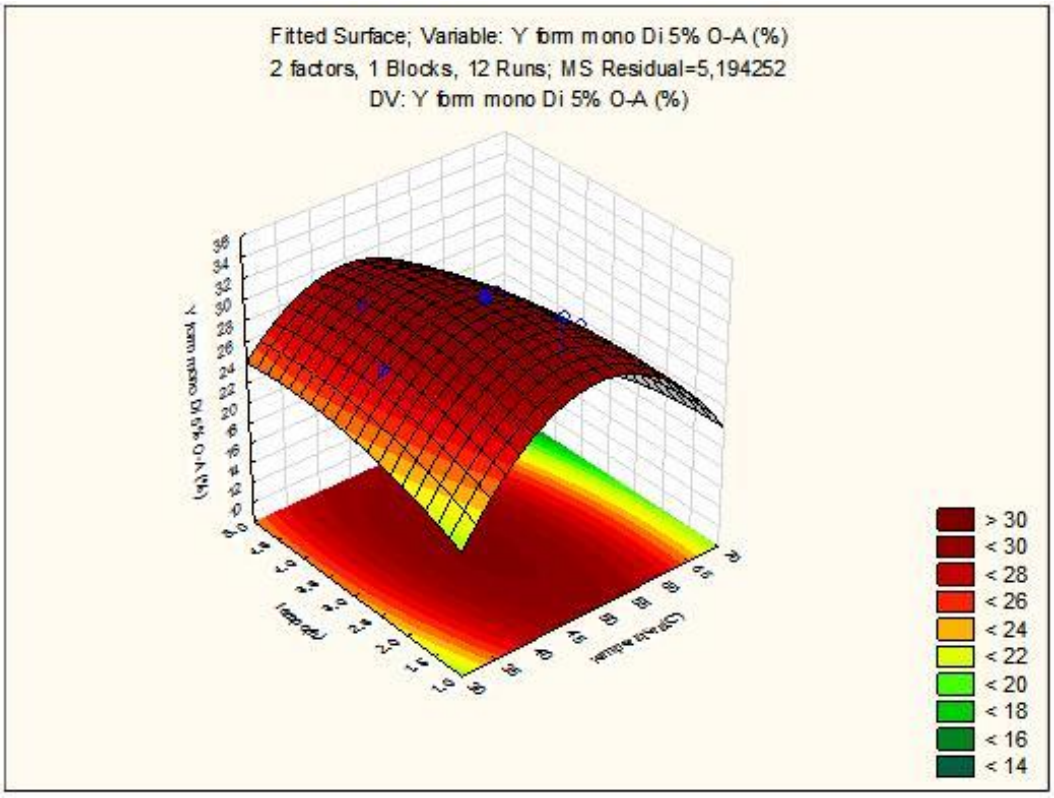


Figura 16 - Superfície de resposta para a formação de mono e diacilgliceróis para substrato com 5% de óleo na emulsão inicial. (parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC).

Nesta condição, tanto a temperatura quanto o tempo apresentaram influência sobre a formação de MAGs e DAGs, resultando em maior formação destes compostos em região próxima ao ponto central.

Este comportamento foi também assinalado por Coleman (1963), que demonstrou que os MAGs e DAGs atingem um valor máximo e depois tendem a diminiuir, com o progresso da reação de hidróise enzimática e a consequente formação de ácidos graxos livres.

Estes dados corroboram os desempenhos demonstrados na Figura 14, elaborada também com os dados do planejamento experimental fatorial adotado, com um desdobramento intenso de formação de mono e diacilgliceróis nas condições de processos intermediárias, em que o binômio temperatura-tempo influencia na potencialização da reação.

A Figura 17 apresenta o consumo de trioleína na hidrólise de emulsão com 5% de óleo.

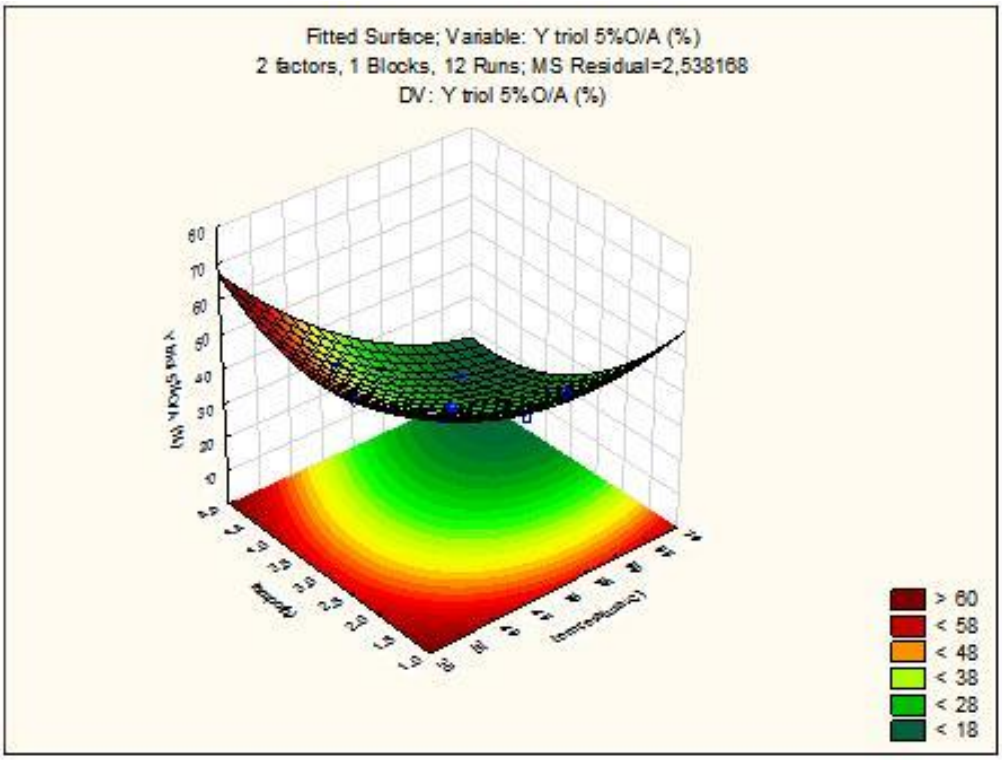


Figura 17 – Superfície de resposta para o consumo de trioleína na condição de 5% de óleo na emulsão inicial.

(parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC)

Nesta condição, observa-se que tanto a temperatura quanto o tempo apresentaram influência sobre o teor de trioleína residual, resultando em teor final abaixo de 18%. O maior consumo de trioleína ocorreu na condição de maior temperatura e maior tempo de reação, coerente com o progresso da hidrólise enzimática.

Cabe enfatizar que a temperatura apresenta papel importante no sistema reacional. Um aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e o processo de difusão entre os substratos, e assim, limitações de transferência de massa podem ser reduzidas acarretando em aumento da velocidade de reação (Pawongrat *et al*., 2007).

A Figura 18 apresenta a formação de ácidos graxos livres, resultante da hidrólise de trioleína com 5% de óleo na emulsão inicial.

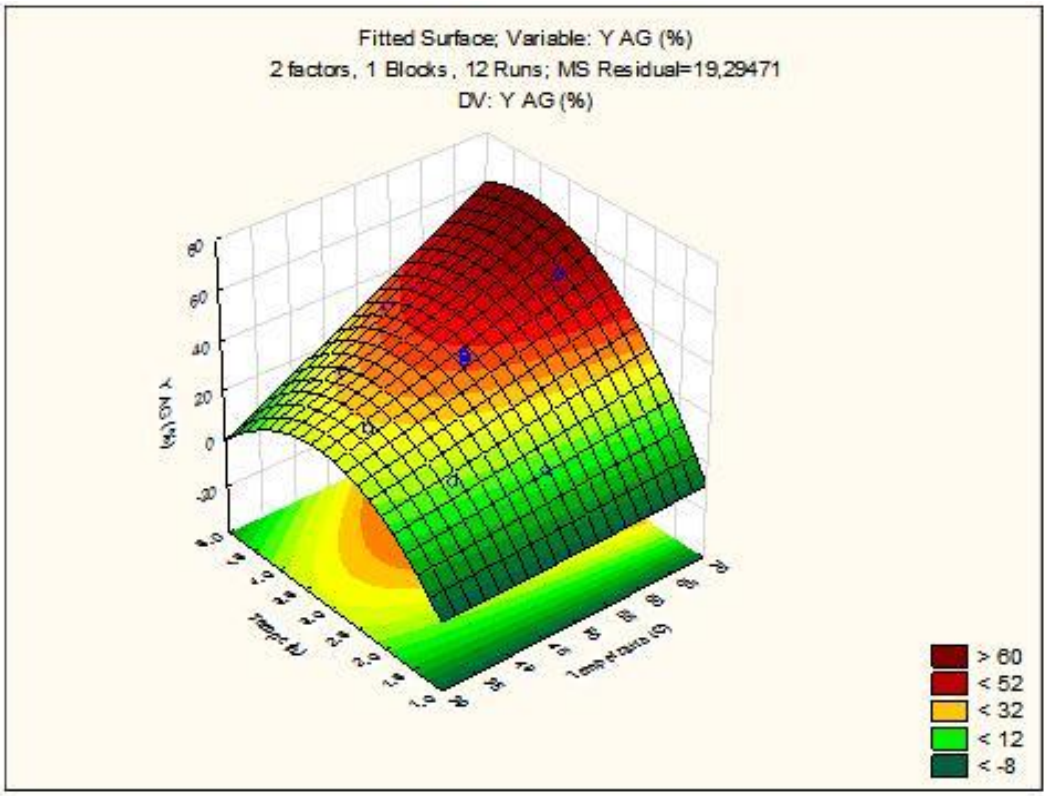


Figura 18 – Superfície de resposta para a formação de ácidos graxos livres para substrato com 5% de óleo na emulsão inicial. (parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC)

O tempo de reação e a temperatura apresentaram influência sobre a formação de ácidos graxos livres. A maior taxa de acidez ocorreu para temperaturas e tempos maiores, o que é coerente com o progresso da hidrólise enzimática.

Tais graus de hidrólise elevada já eram esperados devido à elevada atividade enzimática sobre a hidrólise de azeite de oliva e também em dados descritos por outros autores (Wu *et al*., 1996). O melhor desempenho conseguido pela lipase escolhida pode ser associado à sua capacidade para hidrolisar todos tipos de cadeias acil, independentemente da sua posição no triacilglicerol.

A temperatura foi a variável que apresentou maior influência sobre a formação de ácidos graxos livres ao final de 6,5 horas de hidrólise, resultando em aumento desta resposta. Este fato se deve à adequação da enzima ao trabalho em temperaturas crescentes dentro das faixas escolhidas de conversão, até 65 °C. Além disso, o aumento da temperatura acarreta um aumento de energia e na entalpia de reação de hidrólise do triacilglicerol escolhido, favorecendo a quebra das ligações dos acilgliceróis. Durante a ação das lipases, quaisquer tipos de interferências causadas na interface resultam em alterações na sua síntese e atividade.

O tempo também mostrou influenciar positivamente na progressiva formação de ácidos graxos livres durante a reação. Houve maior intensidade de reação, em especial a partir das 3 horas de reação, com uma faixa de efeito máximo entre 4 e 6 horas, demonstrando a reatividade da trioleína em relação aos parâmetros de tempo e temperatura definidos pelo planejamento experimental.

Para cada reação de hidrólise enzimática parcial de substrato com 20% de óleo na emulsão inicial, os dados também foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão múltipla para propor um modelo polinomial representando cada sistema na região estudada.

Os coeficientes não significativos foram excluídos (p> 0,05), com as seguintes equações ajustadas:

$Y= 27.38 - 3.83X_1 - 3.51X_2 + 3.97X_2^2 - 4.82X_1X_2$ (formação de MAGs/DAGs) (12)

$Y= 22.03 – 11.01X_1 – 15.12X_2 + 5.51X_1^2 + 9.87X_2^2$ (trioleína residual) (13)

$Y= 50.13 + 13.40X_1 + 20.26X_2 -5.63X_1^2 – 16.02X_2^2 + 5.09 X_1X_2$ (formação de FFAs) (14)

(onde: X1 = temperatura e X2 = tempo)

As equações mostram que a formação de MAGs e DAGs, o nível de trioleína residual e a formação de FFAs foram dependentes dos termos lineares de temperatura e tempo de reação, do termo quadrático de tempo de reação para formação de MAGs/DAGs e do termo quadrático de tempo e temperatura de reação para trioleína residual e formação de FFAs.

Os coeficientes de regressão estimados a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de MAGs e DAGs, trioleína residual e formação de ácidos graxos livres são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 20% de óleo (p≤0,05).

	b_0	Erro	b_1	Erro	b_2	Erro	b_{11}	Erro	b_{22}	Erro	b_{12}	Erro	R^2
MAG /DAG	**27.38**	**0.76**	**-3.83**	**1.04**	**-3.51**	**1.08**	-0.95	1.09	**3.97**	**1.23**	**-4.82**	**1.52**	**0.88**
Trioleína	**22.03**	**0.94**	**-11.01**	**1.29**	**-15.12**	**1.34**	**5.51**	**1.36**	**9.87**	**1.52**	0.06	1.88	**0.97**
AGL	**50.13**	**0.41**	**13.40**	**0.58**	**20.26**	**0.58**	**-5.63**	**0.65**	**-16.02**	**0.58**	**5.09**	**0.83**	**0.99**

b_0, constante; b_1, coeficiente de temperatura linear; b_2, coeficiente de tempo linear; b_{11}, coeficiente de temperatura quadrática; b_{22}, coeficiente de tempo quadrático; b_{12}, regressão de produto cruzado de temperatura e tempo; R^2, coeficiente de determinação; Elementos significativos em negrito e não significativos em fonte normal.

Após a exclusão de fatores não significativos, a regressão mostrou-se significativa a um nível de confiança de 95% (p ≤ 0,05) pelo teste F na análise de variância (ANOVA). Os resultados revelaram altos coeficientes de determinação (R^2) com um bom ajuste de dados experimentais ao modelo, como confirmado pelo valor F calculado.

As amostras do ponto central foram utilizadas para avaliar o erro dos modelos (Tabela 22). Os erros presentes para os coeficientes de correlação obtidos foram todos inferiores a 2% (valor aceitável 10%), confirmando assim que os modelos foram também preditivos e adequados para representar um modelo e gerar superfícies de resposta. Os ajustes de modelo foram considerados significativos, evidenciados pelos altos valores de coeficiente de determinação / regressão.

Os valores ajustados utilizando os modelos são também apresentados na Tabela 22 e encontram-se dentro do intervalo de confiança calculado.

A Tabela 26 apresenta os valores F calculados e tabulados mostrando que o modelo apresentou regressão significativa (calculado F maior do que F tabulado) no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 26 - Análise de variância (ANOVA) para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), trioleína residual (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 20% de óleo ($p \leq 0,05$).

Variáveis	ANOVA	SS	DF	MS	F calculado	F tabelado
MAG/DAG	Regressão/ resíduo	109.02/ 13.84	5/ 6	21.804/ 2.307	9.95	3.20
Trioleína	Regressão/ resíduo	884.93/ 21.39	5/ 6	176.99/ 3.56	49.72	3.20
AGL	Regressão/ resíduo	1626.54/ 4.10	5/ 6	325.31/ 0.68	478.39	3.20

Outro indicador da preditividade de um modelo é quando o valor F calculado é mais de três vezes maior que o valor F tabulado (Box & Hunter, 1978), onde este foi o caso para todas as variáveis analisadas no presente estudo (Tabela 26). Portanto, os coeficientes obtidos indicam uma tendência ao comportamento confiável desta resposta para as variáveis estudadas. Dado que os modelos propostos são válidos, as equações de regressão permitem prever o efeito dos dois parâmetros estudados na hidrólise do substrato oleoso. A relação entre as variáveis independentes e dependentes é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta criada pelos modelos em cada amostra (Figuras 19, 20 e 21).

Novamente, tanto a temperatura como o tempo exerceram efeitos com desdobramento intenso de formação de MAGs e DAGs, em que o binômio temperatura-tempo demonstra influência na potencialização da reação (Figura 19). A maior formação destes componentes ocorreu sob condições de temperatura e tempo de reação intermediários (no caso, faixa de temperatura entre 50-60 ºC e de tempo entre 3-4,5 horas), porém com rendimentos superiores que na condição de 5%, como pode-se constatar na Tabela 21.

Cabe enfatizar que a temperatura apresenta um papel importante no sistema reacional. Um aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade da mistura, aumentar a solubilidade e o processo de difusão entre os

substratos, e assim, limitações de transferência de massa podem ser reduzidas acarretando em aumento da velocidade de reação. Por outro lado, a redução da atividade da enzima pode ser acelerada com o aumento da temperatura (Pawongrat *et al.*, 2007).

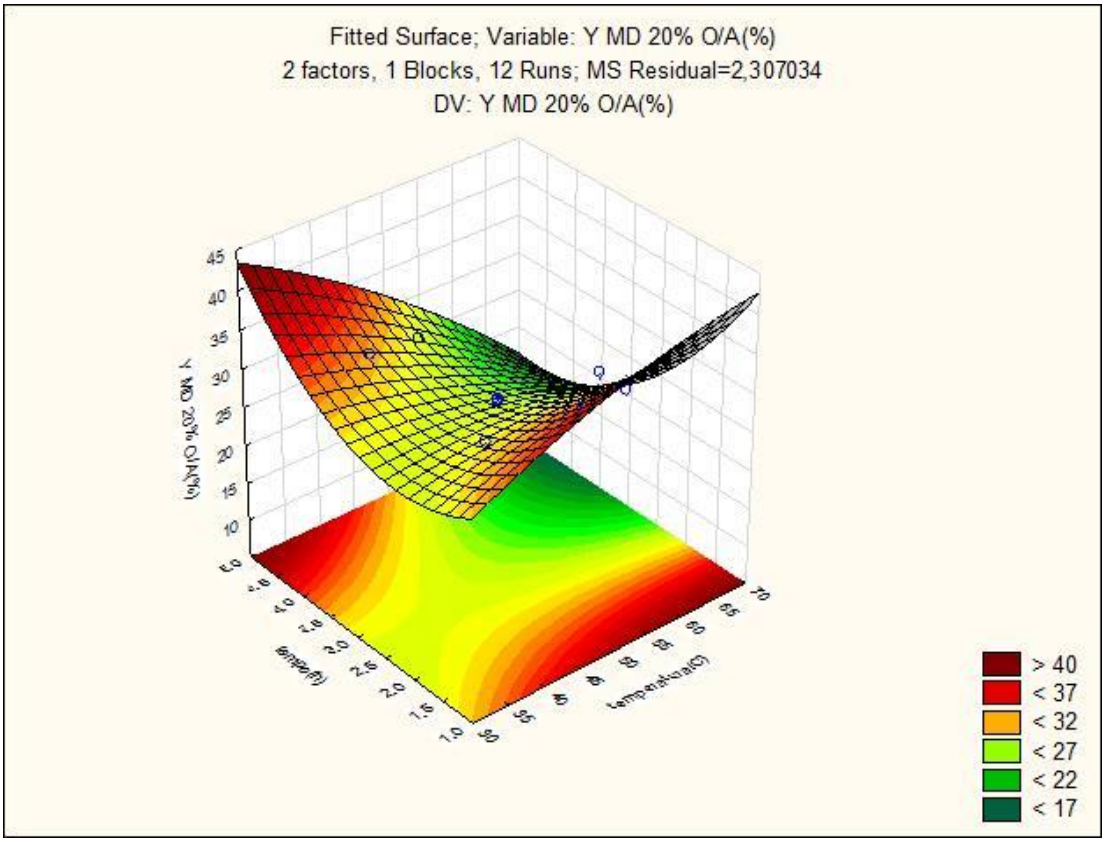


Figura 19 - Superfície de resposta para a formação de mono e diacilgliceróis para emulsão inicial com 20% de óleo. (parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC).

Novamente observa-se que à medida que a reação se processa, a desestruturação da trioleína em DAGs e MAGs fica intensificada, uma vez que as energias para hidrólise das ligações das posições na molécula de glicerol são atingidas, facilitando o rompimento das posições restantes.

Estudos indicam que uma lipase *sn*-1,3 específica hidrolisa os grupos acil das posições *sn*-1 e *sn*-3 da molécula de glicerol. Espera-se que a proporção de 2,3-dioleína aumente na quantidade total de MAGs e DAGs se a lipase for *sn*-1,3 específica. Baixa concentração de monooleína e alta concentração de dioleína foram encontradas quando a trioleína foi hidrolisada pela lipase *sn*-1,3 específica. A razão para a baixa concentração inesperada de monooleína pode ser devida à maior reatividade do ácido oléico. Este ácido é líquido à temperatura ambiente, o que pode afetar a estabilidade do acilglicerol, permitindo o rearranjo intramolecular. Os resultados na separação por TLC confirmaram que as concentrações de 1,2- (2,3-) e 1,3-diacilgliceróis eram semelhantes quando a trioleína foi hidrolisada pela lipase. O grupo oleato pode migrar da posição *sn*-2 para as posições *sn*-1 e *sn*-3 nos produtos intermediários, DAGs, assim como nos MAGs (QINTAO, 1998).

Além disso, esse comportamento também foi observado por MENDES *et al*. (2006), cujos resultados para a hidrólise de água residual com diferentes níveis de gordura indicaram maior rendimento de formação de composto intermediário, requerendo aplicação de maior calor para atingir rendimento de processo adequado, com declínio progressivo na formação de compostos intermediários e mudança na reação de hidrólise para formação progressiva de ácidos graxos livres, como também pode ser observado na Figura 20.

Em ambas as condições de teor de óleo na emulsão inicial, notou-se maior hidrólise nas condições intermediárias de processo, entre 40 °C/6 h e 60 °C/3 h, com porcentagem de hidrólise entre 33 e 55%, para emulsão com 5% de óleo e entre 43 e 57%, para emulsão com 20% de óleo.

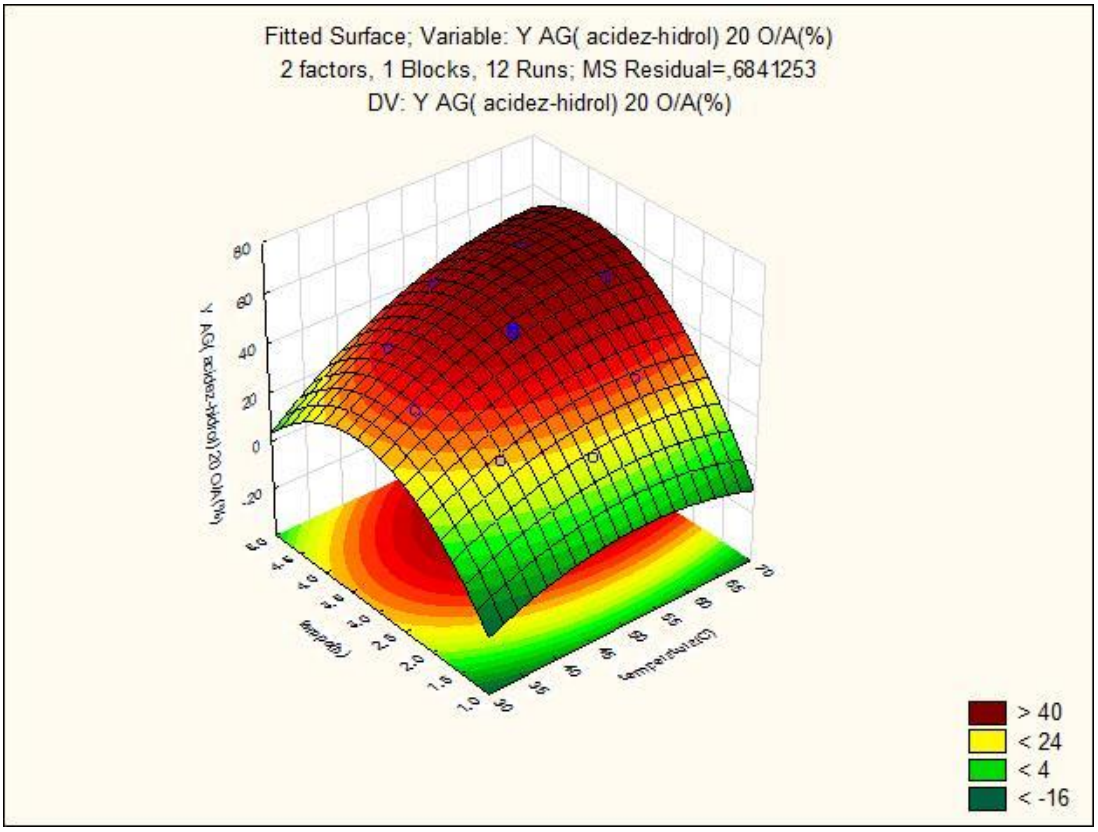


Figura 20 - Superfície de resposta para formação de ácidos graxos livres na emulsão com 20% de óleo. (parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC).

Na Figura 20, observa-se que ocorre maior formação de ácidos graxos livres para temperaturas e tempos maiores, o que é consistente com o progresso da hidrólise enzimática (WU *et al*., 1996). Nesta condição, tanto a temperatura como o tempo tiveram grande influência na formação de ácidos graxos livres no final de 6,5 h de hidrólise, resultando em quase 58% de formação de ácidos graxos livres. Deve ser considerado que uma extensão de hidrólise superior a 66,7% implica necessariamente a conversão de MAGs em ácidos graxos livres, o que é indesejável no sentido da obtenção de altos teores de MAGs e DAGs (MOYA-RAMIREZ *et al.*, 2016). Houve uma intensidade de reação mais elevada, em particular para 3,5 h de reação, com uma gama máxima de efeitos entre 4 e 5 h devido a uma elevada reatividade e afinidade com trioleína, uma vez que as reações intermediárias de

hidrólise, que geraram dioleína e monooleína, foram processadas. Em adicional, existem vários fatores que influenciam as propriedades da enzima, tais como a composição do meio de cultura, a utilização de indutores e inibidores, a concentração de oxigénio, nitrogênio e sais inorgânicos, a fonte de carbono, temperatura e pH do meio, agitação e agentes capazes de afetar a interface (DOMINGUEZ *et al*., 2003). A presença de produtos de reação, principalmente ácidos graxos livres, na superfície das gotículas da emulsão expulsa moléculas de lipase, reduzindo gradualmente a velocidade de reação e conduzindo a um desempenho de hidrólise mais baixo. A eficiência do dispositivo de mistura no equipamento experimental, conduzida em agitadores magnéticos, certamente contribui para esta acumulação. O fato de outros estudos de hidrólise conduzidos num dispositivo semelhante terem alcançado uma extensão de hidrólise de 56-75%, patamar próximo do que foi obtido neste estudo, apoia esta conclusão. As condições de reação encontradas na literatura para a hidrólise enzimática de TAGs em emulsões O/A são altamente variáveis e dependem do dispositivo experimental e da regiosseletividade da enzima utilizada. (MOYA – RAMIREZ *et al.,* 2016)

Conforme esperado, o maior consumo de trioleína ocorreu sob condições de temperatura mais alta e tempo de reação mais longo, coerentes com o progresso da hidrólise, resultando em nível final de trioleína ao redor de 18% (Figura 21).

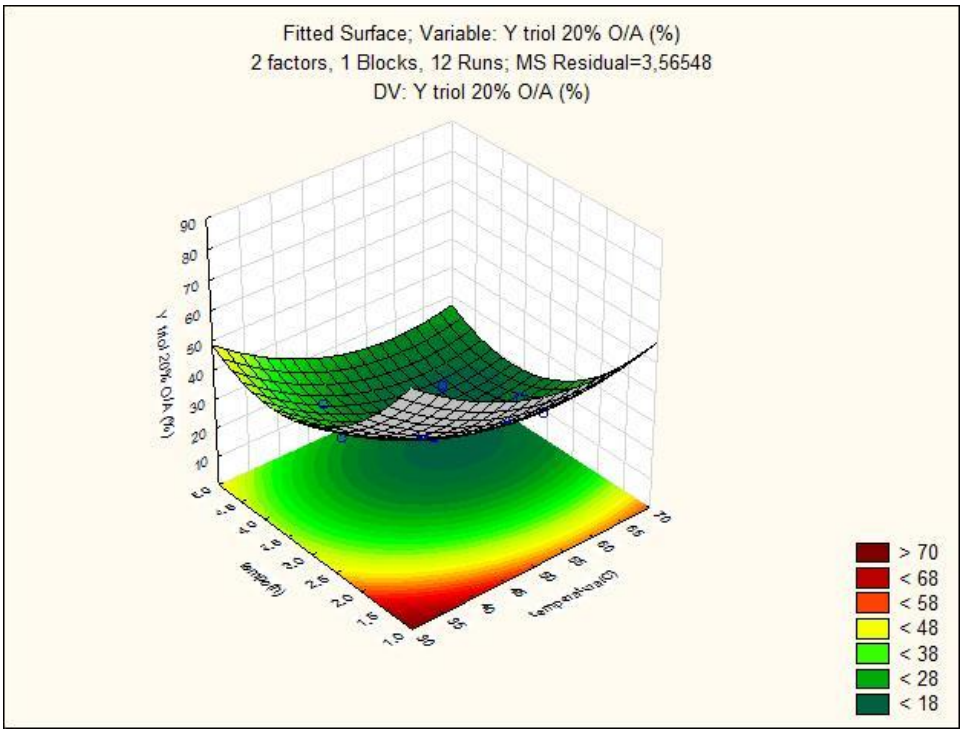


Figura 21 - Superfície de resposta para trioleína residual para emulsão com 20% de óleo. (parâmetros: tempo em horas X temperatura em ºC).

Constatou-se boa eficiência da enzima utilizada, respeitadas as condições de uso quanto às faixas de temperaturas de reação, pela elevada atividade hidrolítica sobre a trioleína, confirmando observações feitas por YANG & LOWE (2000).

Os resultados acima reforçam o aspecto relatado por RAHMAN *et al*. (2005), em que a lipase escolhida sempre está associada à especifidade de substrato. De fato, na indústria de oleoquímicos, usando uma enzima de boa especifidade para a hidrólise enzimática de óleos e gorduras, ocorre um processo que acarreta economia de energia em comparação com processos convencionais de alta temperatura e pressão e com ácidos graxos insaturados, que serão produzidos sem oxidação. Conforme relatado, a lipase de *Rhizomucor miehei* foi observada como possuindo grande atividade para trioleína, que contém ácido graxo insaturado de cadeia longa.

Desta forma, a taxa de hidrólise obtida por ação da lipase de *Rhizomucor miehei*, determinada por porcentagem de hidrólise do substrato inicial trioleína, forneceu boa forma de monitoramento comparativo com os resultados obtidos por TLC.

Assim sendo, a determinação da acidez de emulsões oleosas por percentagem de hidrólise foi utilizada para determinar diretamente a eficiência da hidrólise enzimática, pela determinação da formação de ácidos graxos livres, tal como apresentado nas Tabelas 21 e 22 e pelas Figuras 22 e 23, onde foi estudado um padrão de correlação entre os dois métodos, mostrando resultados correspondentes, consistentes e representativos ($p < 0,05$).

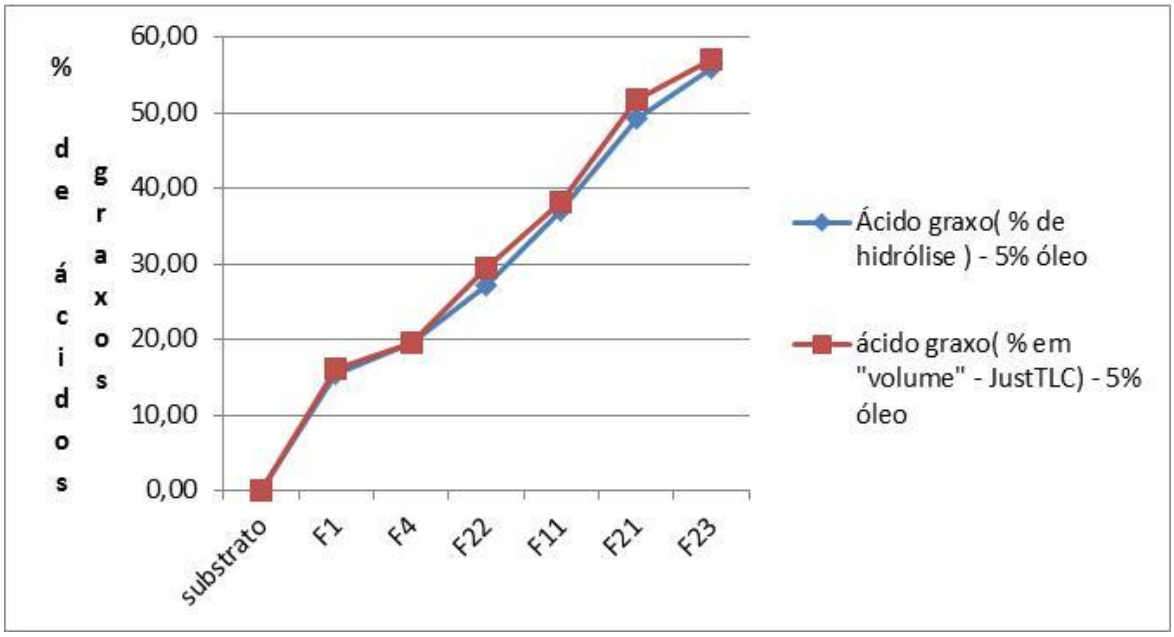


Figura 22 – Correlação entre resultados de TLC e percentual de hidrólise para a formação de ácidos graxos livres, para emulsão com 5% de óleo

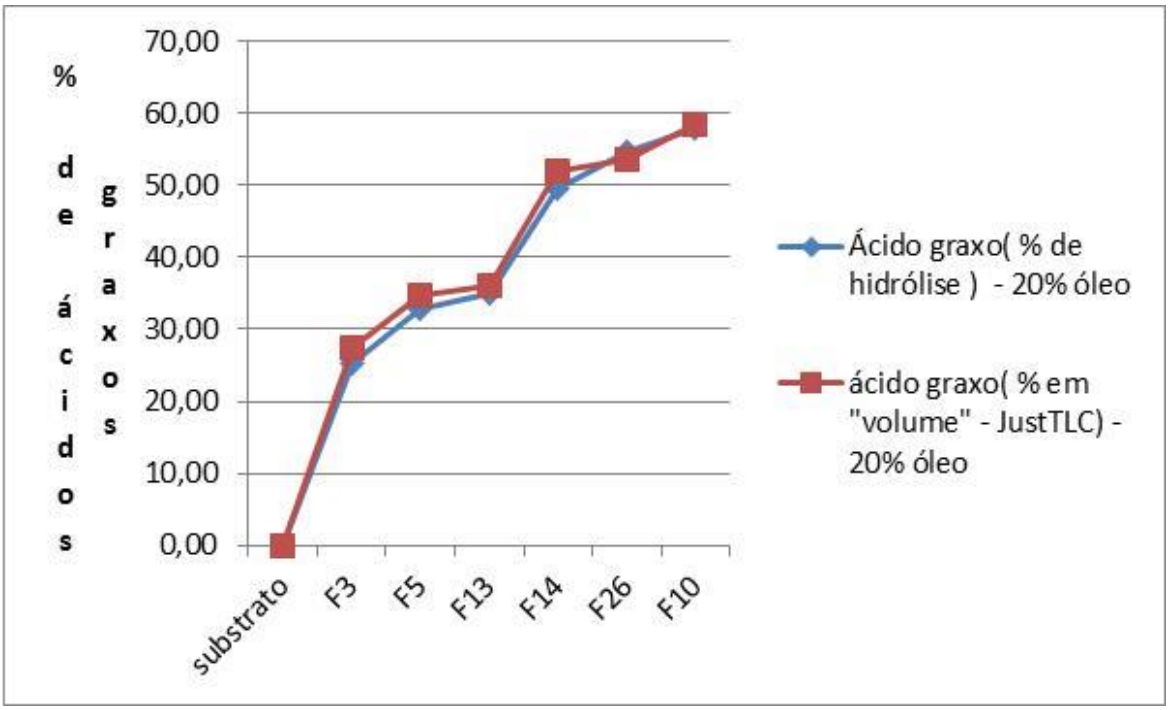


Figura 23 – Correlação entre resultados de TLC e percentual de hidrólise para a formação de ácidos graxos livres, para emulsão com 20% de óleo

Contudo, os resultados da hidrólise enzimática descontínua mostraram que não foi possível aumentar os teores de MAGs e DAGs já presentes na trioleína técnica inicial, uma vez que a hidrólise se processa tanto na trioleína como nos acilgliceróis parciais.

Tão importante quanto os resultados de hidrólise obtidos, a escolha e a adequação das metodologias sugeridas de baixo custo para monitoramento de processos reforçaram uma abordagem mais sustentável para o meio ambiente e foram alinhadas com a expectativa de significância estatística estabelecida e comparada pelo uso de uma técnica cromatográfica avançada, HPSEC.

A cromatografia de exclusão de tamanho de alta performance (HPSEC) é normalmente usada para analisar TAGs, DAGs, MAGs e grupos de AGL em óleos e gorduras. Além disso, provou ser um método útil para avaliar perfis de alteração de gordura por hidrólise. Com HPSEC, materiais heterogêneos, como os óleos vegetais, podem ser divididos em grupos principais de compostos que têm os mesmos volumes hidrodinâmicos. Sendo uma combinação de adsorção e cromatografia de exclusão de tamanho, permite a análise de diferentes produtos de reação, tais como polímeros, monômeros polares, TAGs, DAGs, MAGs e AGL (MOQUIN *et al*., 2005).

Para estabelecer a representatividade dos resultados, foram realizados análises dos hidrolisados para substratos 5 e 20% O/A em reações de hidrólise descontínuas, por HPSEC, mais especificamente para as hidrólises enzimáticas a 60 °C durante 2,0 h para substrato 5% O/A (Figura 24), a 50 °C durante 3,0 h para substrato 5% O/A (Figura 25) e a 60 °C durante 4,0 h para substrato 5% O/A (Figura 26), assim como para as

hidrólises enzimáticas a 60 °C durante 2,0 h para substrato 20% O/A (Figura 27), a 50 °C durante 3,0 h para substrato 20% O/A (Figura 28) e a 65 °C durante 3,0 h para substrato 20% O/A (Figura 29). Observa-se a boa correlação entre as análises de TLC, percentagem de hidrólise e HPSEC, que estão apresentadas na Tabela 27. Os dados foram consistentes (p <0,05) com os obtidos para as amostras por TLC e percentagem de hidrólise, conforme esperado.

Tabela 27 - Composição e quantificação comparativa por análise de TLC, acidez e HPSEC dos produtos hidrolisados por via descontínua a partir do substrato trioleína técnica

Ensaios	Variáveis originais			Respostas					
	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2 (*)	Z3
1 (F1)	40	2	5	24,40±0,63	59,56±1,05	16,04±0,41	15,41±0,87	----	----
2 (F4)	60	2	5	31,30±0,84	49,24±1,01	19,46±0,62	19,63±1,24	30,76±0,3	48,44±1,2
5 (F22)	35	3	5	24,70±0,87	45,78±0,12	29,52±0,06	27,15±1,61	---	---
9 (F11)	50	3	5	30,98±0,51	30,81±0,62	38,21±0,48	37,10±2,07	31,56±0,2	40,38±1,0
4 (F21)	60	4	5	26,73±0,67	21,61±0,84	51,66±0,54	49,25±1,59	26,28±0,5	22,38±0,9
6 (F23)	65	3	5	24,00±0,52	20,07±0,69	57,1±0,37	55,93±0,26	---	---
13(F3)	40	2	20	27,46±0,22	44,98±0,30	27,56±0,33	25,19±0,82	---	---
14(F5)	60	2	20	28,96±1,35	36,31±1,41	34,73±1,14	32,84±1,68	28,62±0,8	37,69±0,7
17(F13)	35	3	20	26,39±0,49	37,49 ±0,74	36,12 ±0,26	34,89±0,57	---	---
21(F14)	50	3	20	34,08±0,82	14,02 ±1,20	51,90 ±0,66	49,54±1,35	33,89±1,1	15,46±0,8
18(F26)	65	3	20	25,34±1,05	21,21 ±1,70	53,45 ±0,30	54,60±1,64	24,92±0,9	23,05±1,3
16(F10)	60	4	20	24,89±0,19	16,69 ±0,26	58,42 ±1,21	57,97±0,71	---	---

(*) formação de MAG e DAG HPSEC = soma result HPSEC (DG / MG+AG) - form AGL por % hidrólise.

Valores são as médias de três replicatas * X1 = temperatura de reação (°C); X2 = tempo de reação (h); X3 = emulsao O/A (%); Y1 = Formação de mono e diacilgliceróis (TLC) (%); Y2 = Trioleína residual (%) (TLC); Y3 = Formação de ácidos graxos livres (%) (TLC); Z1 = Formação de ácidos graxos livres (%) (% hidrólise); Z2 = Formação de mono e diacilgliceróis (HPSEC) (%)(*); Z3 = Trioleína residual (%) (HPSEC);

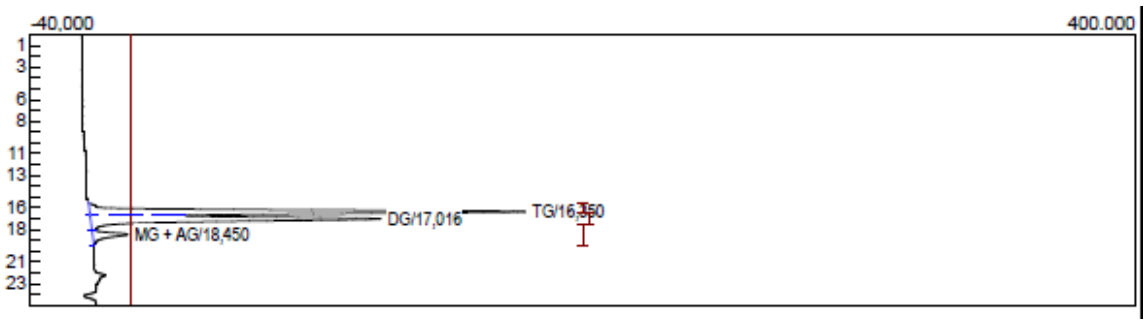


Figura 24 - Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (60 °C/2 h)

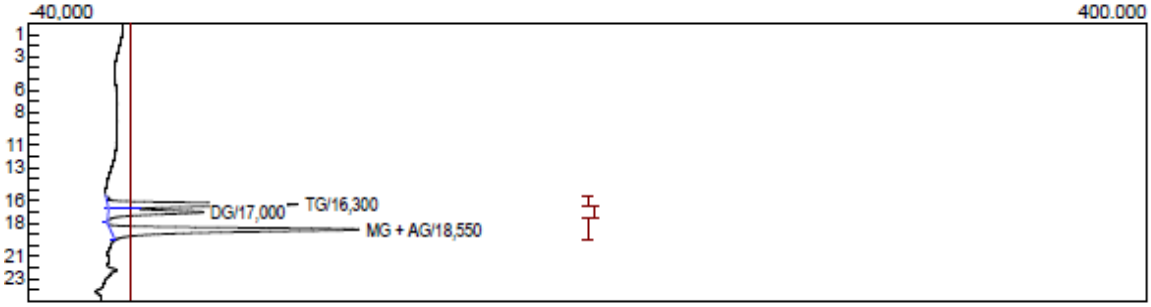


Figura 25 - Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (50 °C/3 h)

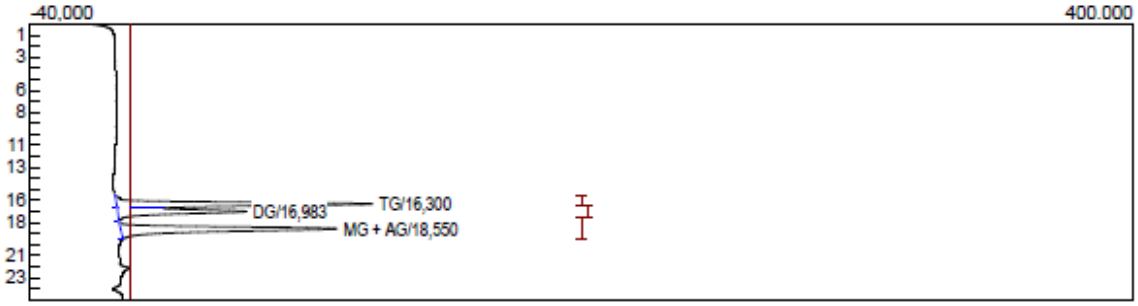


Figura 26 - Análise por HPSEC da amostra 5% O/A (60 °C/4 h)

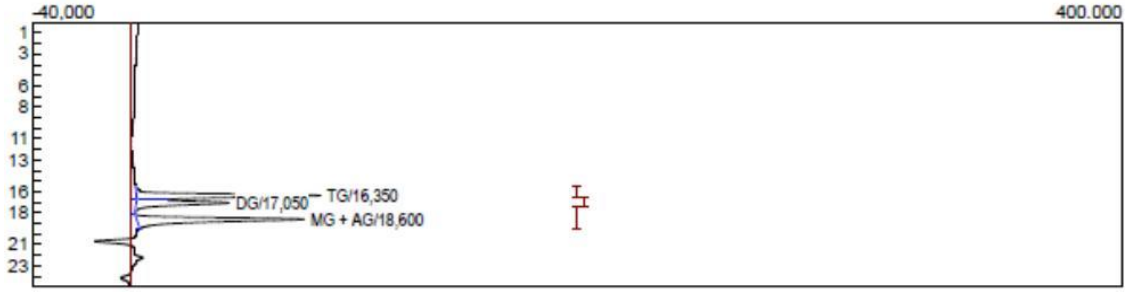


Figura 27 - Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (60 °C/2 h)

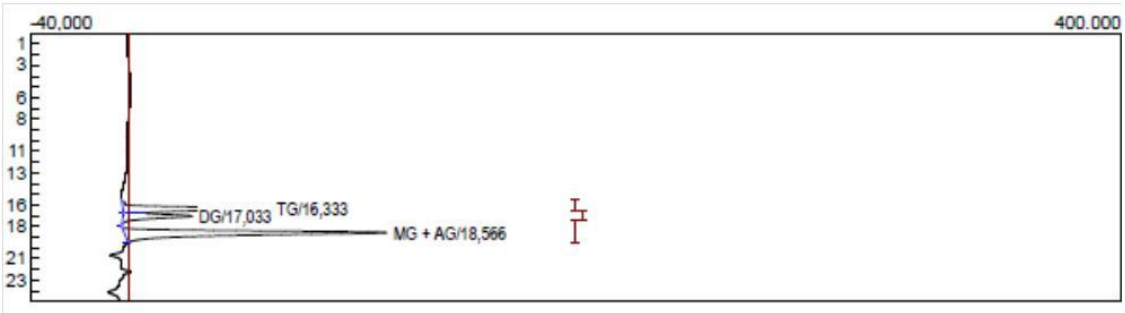


Figura 28 - Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (50 °C/3 h)

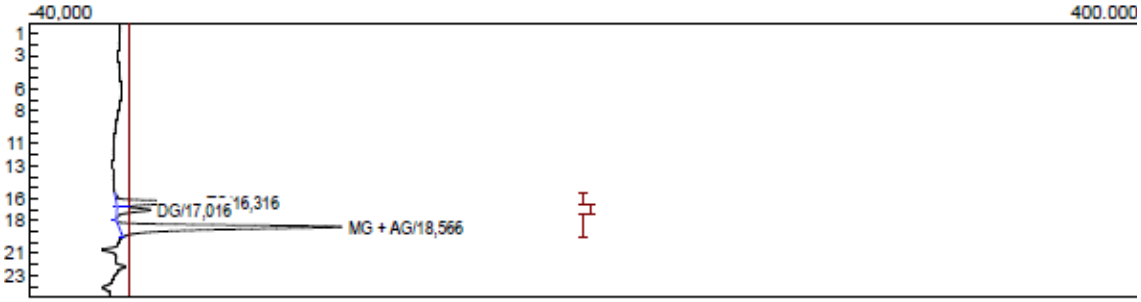


Figura 29 - Análise por HPSEC da amostra 20% O/A (65 °C/3 h)

Com os resultados obtidos nestas avaliações de desempenho, considera-se que as emulsões com maior porcentagem de fração oleosa (no caso, 20% O/A) e com parâmetros de temperatura e tempo de hidrólise tendendo às condições usuais de trabalho da enzima (no caso, 45-50 ºC/3-4 h) poderiam contribuir para maiores e mais consistentes perfis de desempenho de formação de MAGs e DAGs, de consumo de TAGs e de obtenção de ácidos graxos livres, sinalizando pré-requisitos para que se possa aplicar estas premissas na segundo etapa do projeto, que foi a aplicação em matéria-prima razoavelmente rica em trioleína e de uso comercial e que possa ter sua hidrólise enzimática otimizada pela técnica “fed-batch” ou descontínua-alimentada, o que não havia sido pesquisado anteriormente, conforme os levantamentos bibliográficos feitos.

4.4 – Identificação, caracterização e quantificação das frações lipídicas do substrato hidrolisado de óleo de girassol médio oleico em regime de reação descontínuo-alimentado por cromatografia delgada (TLC), acidez (porcentagem de hidrólise) e por HPSEC

Nesta fase do projeto foram consolidados os melhores atributos de processo de hidrólise enzimática (porcentagem de emulsão óleo/água: 15%, agitação: 180 rpm e temperatura de reação: 50 ˚C), oriundos da fase preliminar e que foram empregados para a fase final utilizando uma fonte lipídica natural rica em trioleína disponível no mercado (no caso, óleo de girassol médio oléico).

Como substrato em uso comercial para obtenção de produtos finais ricos em ácido oléico, o óleo de girassol de alto ou médio teor oléico mostra maior estabilidade oxidativa para armazenamento do que o óleo de girassol regular. Óleos ricos em ácido oléico são úteis para cardioproteção, têm boas propriedades de fritura e superior estabilidade oxidativa (LI *et al*., 2010).

Por se tratar de matéria-prima com alto teor de ceras, foi necessário proceder uma filtração simples em papel de filtro, como forma de se diminuir a natural turvação que o óleo de girassol médio oléico apresenta à temperatura ambiente, de modo a se remover possíveis interferentes que poderiam afetar a catálise enzimática (XENAKIS *et al*., 2010).

Vários compostos podem ser implicados na inibição do agente de hidrólise enzimática, em especial quando se emprega um óleo comercial refinado como substrato inicial de hidrólise. Vários compostos organofosforados, como os encontrados nos óleos de girassol e canola, inibem a lipase via fosforilação irreversível do resíduo de serina no sítio ativo da enzima. Além disso, é geralmente reconhecido que os ácidos graxos livres e álcoois inibem a hidrólise catalisada por lipase. Acredita-se que este fenômeno é devido à acumulação destes compostos na interface lípido / água bloqueando assim o acesso das moléculas de TAGs ao sítio ativo da enzima. Isto porque a água de hidratação (ou seja, fortemente ligada) é necessária para a integridade estrutural das lipases e, portanto, imprescindível para sua potência catalítica. As lipases não são ativas em solventes miscíveis com água, como álcoois, porque esses solventes deslocam espontaneamente as moléculas de água das estruturas proteicas das lipases (PAIVA *et al*., 2000).

Na concepção do melhor esquema de reação de hidrólise enzimática, procura-se no projeto de processos enzimáticos em escala comercial uma compreensão quantitativa dos fenômenos físicos e químicos envolvidos. Assim, um passo crítico nesta concepção do projeto do reator empregado é a determinação das equações dos modelos que descrevem o desempenho da enzima e relacionam este desempenho com as principais condições de operação (as concentrações de substratos e / ou produtos, tempo de enchimento total, intervalos de alimentação, pH e temperatura) (MALCATA *et al*., 1992).

Usualmente, as reações de hidrólise enzimática são estudadas nos formatos descontínuo ou contínuo. No entanto, não foram encontradas pesquisas na literatura especializada em que fosse relatada a influência da adoção de intervalos de alimentação de substrato no formato descontínuo-alimentado sobre o desempenho de formação de MAGs e DAGs, ácidos graxos livres e consumo de TAGs.

Da mesma forma que nas etapas preliminares, a identificação da composição e quantificação dos compostos hidrolisados por lipase do substrato emulsão de óleo de girassol médio oléico, em suas frações de AGL, MAGs e DAGs e TAGs não consumidos foram realizadas também inicialmente em placas de TLC, como no exemplo da Figura 30, onde as manchas das corridas cromatográficas foram reveladas e seguiram a mesma distribuição de Rfs apresentada na Tabela 13.

Na Figura 30 observa-se que as manchas das frações ficaram evidentes, claras, com contornos e densidades marcantes, o que permitiu que pudessem ser tratadas por meio do software JustTLC® e extrair adequados resultados para a caracterização e quantificação das espécies lipídicas hidrolisadas, apresentados na Tabela 28.

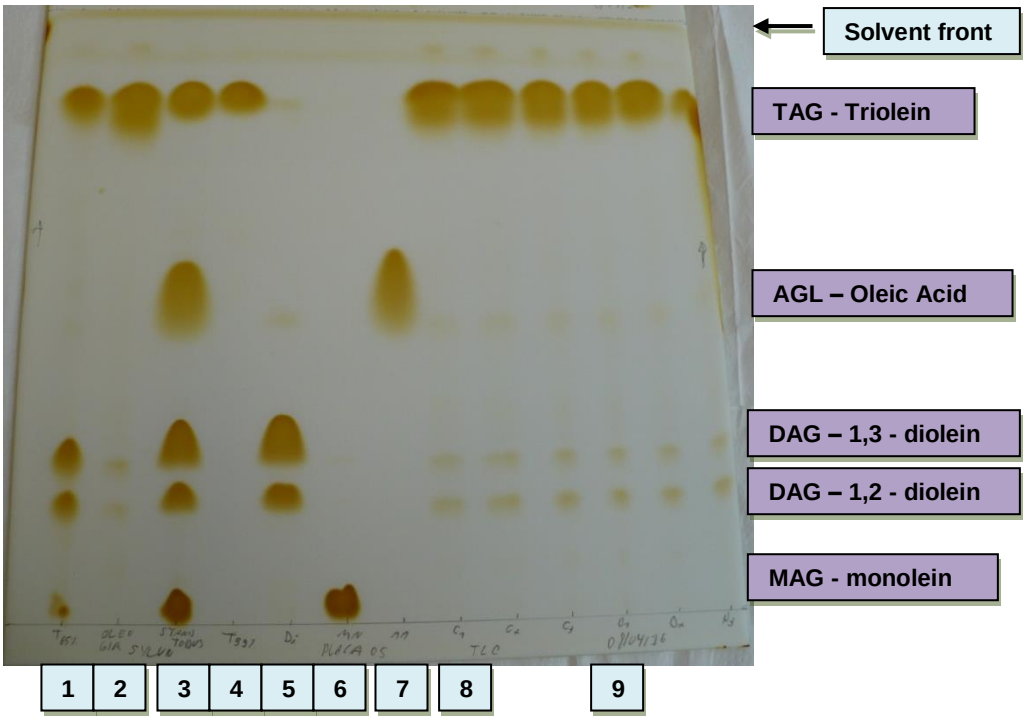


FIGURA 30 - Análise por cromatografia em camada delgada (TLC) de mistura padrão, padrões de acilgliceróis, óleo de girassol médio oléico e produtos de hidrólise de emulsão 15% O/A de óleo de girassol médio oléico. Spot 1 = trioleína técnica, Spot 2 = óleo de girassol médio oléico, Spot 3 = mistura padrão (1-monooleína, 1,3-dioleína, ácido oléico e trioleína pura), Spot 4 = trioleína 99%, Spot 5 = 1,3-dioleína 99%, Spot 6 = 1-monoleína 99%, Spot 7 = ácido oléico 99%, Spots 8 = hidrolisados em tempo total de 5,4 h/1,5 h de intervalo de alimentação, Spots 9 = hidrolisados em tempo total de 4,0 h/2,9 h de intervalo de alimentação; MAG monoacilgliceróis, DAG diacilgliceróis, TAG triacilgliceróis, AGL ácidos graxos livres.

Para verificar o efeito de cada variável na resposta avaliada, a hidrólise da emulsão oleosa foi otimizada usando o software Statistica 12.0. O esquema codificado apresentado na Tabela 28 foi aplicado para os dados experimentais correspondentes à reação de hidrólise enzimática efetuada.

Desta forma, a identificação e os resultados da composição e quantificação do substrato óleo de girassol médio oléico hidrolisado por lipase imobilizada, em suas frações de AGL, MAGs e DAGs e TAGs não consumidos estão representados na Tabela 28.

Tabela 28 - TAGs residuais, formação de MAGs/DAGs e de ácidos graxos livres (FFAs), após hidrólise enzimática descontínua-alimentada a 50 ºC de emulsão de óleo de girassol médio oléico/água a 15%.

Amostra (n)	Tempo de enchimento (h)****	Intervalo de alimentação (h)	MAGs/DAGs * (%)	MAGs/DAGs ** (%)	TAGs* (%)	TAGs** (%)	FFAs*** (%)	FFAs** (%)
1a (F1)	3 (-1)	0,5 (-1)	26,75±0,03	27,30±0,05	45,95±0,04	47,89±0,05	29,51±0,19	31,59±0,05
2a (F4)	5 (+1)	0,5 (-1)	31,75±0,02	33,52±0,05	51,17±0,02	48,91±0,05	16,39±0,26	19,45±0,05
3a (F20)	3 (-1)	2,5 (+1)	9,74±0,03	6,32±0,05	67,50±0,03	68,83±0,05	23,42±0,36	21,49±0,05
4a (F21)	5 (+1)	2,5 (+1)	10,68±0,01	13,54±0,05	64,31±0,04	67,09±0,05	23,42±0,21	25,63±0,05
5a (F22)	2,6 (-√2)	1,5 (0)	7,92±0,04	8,48±0,05	72,85±0,04	74,75±0,05	19,23±0,07	21,31±0,05
6a (F23)	5,4 (+√2)	1,5 (0)	17,04±0,02	18,98±0,05	58,79±0,05	59,27±0,05	25,42±0,04	21,31±0,05
7a (F24)	4 (0)	0,1 (-√2)	27,93±0,03	29,31±0,05	40,06±0,01	42,94±0,05	34,01±0,13	31,36±0,05
8a (F25)	4 (0)	2,9(+√2)	13,68±0,01	14,50±0,05	69,93±0,01	71,77±0,05	19,96±0,11	18,81±0,05
9a (F11)	4 (0)	1,5 (0)	15,58±0,03	15,48±0,05	61,19±0,03	61,27±0,05	21,15±0,24	21,31±0,05
10a (F11)	4 (0)	1,5 (0)	14,92±0,02	15,48±0,05	61,02±0,02	61,27±0,05	21,75±0,34	21,31±0,05
11a (F11)	4 (0)	1,5 (0)	15,27±0,02	15,48±0,05	61,47±0,02	61,27±0,05	20,99±0,57	21,31±0,05
12a (F11)	4 (0)	1,5 (0)	15,73±0,03	15,48±0,05	60,92±0,02	61,27±0,05	21,17±0,57	21,31±0,05

* Valores obtidos pelo software JustTLC®; ** valores previstos (obtidos das equações teóricas); *** percentagem de hidrólise. ****Os números entre parênteses (de -√2 a + √2) referem-se às variáveis codificadas relativas a tempo de enchimento e intervalo de alimentação. Na coluna de amostras, os códigos entre parênteses referem-se às denominações empregadas nas placas de TLC e foram mantidas para facilitar a identificação nas várias figuras em que são referendadas.

Um detalhe importante na hidrólise de óleos é observado quanto à inibição pela concentração do substrato, em especial, quando a razão da fase do óleo e da fase aquosa é maior que 3-5% (v/v). No estudo de NOOR *et al*. (2003), o efeito da concentração de óleo na taxa inicial de hidrólise foi estudado. A concentração de substrato variou de 2,5 a 25,0 g/L. Nesta faixa de concentração de subtrato, a taxa inicial de hidrólise variou linearmente com a concentração do substrato.

Os valores finais médios encontrados experimentalmente para a taxa de formação de MAGs e DAGs para 15% de porcentagem de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial, apresentados na Tabela 28, variaram de 7,92 a 31,75%.

Para a avaliação dos resultados obtidos, foi feita otimização pela metodologia de superfície de resposta, que apresenta várias vantagens em relação à otimização clássica, pois permite observações dos efeitos de interação de múltiplos parâmetros na resposta (LING-ZHI *et al.,* 2007).

Para cada reação de hidrólise enzimática descontínua-alimentada de emulsão 15% O/A, os dados foram analisados estatisticamente e submetidos à regressão múltipla, a fim de propor um modelo polinomial representando cada sistema na região estudada.

Os coeficientes não significativos foram excluídos (p> 0,05), com as seguintes equações ajustadas:

$Y= 15,48 + 4,61X_1 – 11,49X_2 + 4,94X_2^2$ (formação de MAGs/DAGs) (15)

$Y= 61,27 – 5,49X_1 + 19,23X_2 + 4,07X_1^2 – 7,85X_2^2 - 4,14X_1X_2$ (TAGs residuais) (16)

$Y= 21,31 – 2,98X_2 + 2,73X_2^2 + 4,57 X_1X_2$ (formação de FFAs) (17)

(onde temos: X_1 = tempo de enchimento de substrato e X_2 = intervalo de alimentação de substrato)

As equações mostram que a formação de MAGs e DAGs, o nível de TAGs residuais e a formação de FFAs foram sempre dependentes dos termos lineares do intervalo de alimentação e do termo quadrático do intervalo de alimentação.

Os coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e do erro padrão para a presença de MAGs e DAGs, TAGs residuais e formação de AGL estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Coeficientes estimados de regressão a partir do modelo polinomial e erro padrão para a presença de mono e diacilgliceróis (TLC), triacilgliceróis residuais (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 15% de óleo de girassol médio oléico (p≤0,05)

	b_0	Erro	b_1	Erro	b_2	Erro	b_{11}	Erro	b_{22}	Erro	b_{12}	Erro	R^2
MAGs/ DAGs	7,78	1,03	9,51	0,48	**-14,17**	3,4	-0,74	0,58	**3,47**	0,58	-0,87	0,72	**0,8978**
TAGs	**59,16**	1,22	-11,44	0,57	**29,68**	0,45	**1,54**	0,68	-3,93	0,68	-2,07	0,86	**0,9102**
FFAs	**57,17**	1,59	-8,11	0,73	**-21,72**	0,52	0,33	0,89	**1,86**	0,89	**3,28**	1,11	**0,7824**

b_0, constante; b_1, coeficiente de tempo de enchimento linear; b_2, coeficiente de intervalo de alimentação linear; b_{11}, coeficiente de tempo de enchimento quadrática; b_{22}, coeficiente de intervalo de alimentação quadrático; b_{12}, regressão de produto cruzado de tempo de enchimento e intervalo de alimentação; R^2, coeficiente de determinação; Elementos significativos em negrito e não significativos em fonte normal.

Após a exclusão de fatores não significativos, a regressão mostrou-se significativa a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) pelo teste F na análise de variância (ANOVA). Os resultados revelaram altos coeficientes de determinação (R^2) com bom ajuste de dados experimentais ao modelo, como confirmado pelo valor F calculado, observado na Tabela 30.

As amostras do ponto central foram utilizadas para avaliar o erro dos modelos (Tabela 29). Os erros presentes para os coeficientes de correlação obtidos foram todos inferiores a 2% (valor aceitável até 10%), confirmando assim que os modelos foram também preditivos e adequados para representar um modelo e gerar superfícies de resposta. Os ajustes de modelo foram considerados significativos, evidenciados pelos altos valores de coeficiente de determinação/regressão. Os valores ajustados utilizando os modelos são também apresentados na Tabela 28 e encontram-se dentro do intervalo de confiança calculado.

A Tabela 30 representa os valores de F calculados e tabulados mostrando que o modelo apresentou regressão significativa (calculado F maior do que F tabulado) no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 30 - Análise de variância (ANOVA) para a formação de mono e diacilgliceróis (TLC), triacilgliceróis residuais (TLC) e formação de ácidos graxos livres (% de hidrólise) para a emulsão inicial com 15% de óleo de girassol médio oléico ($p \leq 0,05$)

Variáveis	ANOVA	SS	DF	MS	F calculado	F tabelado
MAGs/DAGs	Regressão/ resíduo	1645,11/ 187,21	30/5	54,84/ 3,74	14,65	3,20
TAGs	Regressão/ resíduo	2756,93/ 265,75	30/5	91,89/ 5,31	17,29	3,20
FFAs	Regressão/ resíduo	858,25/ 12,94	30/5	28,61/ 2,59	11,05	3,20

Outro indicador da preditividade de um modelo é quando o valor F calculado é mais de três vezes maior do que o valor F tabulado (BOX & HUNTER, 1978), onde este foi o caso para todas as variáveis analisadas no presente estudo (Tabela 30). Portanto, os coeficientes obtidos indicam tendência ao comportamento confiável destas respostas para as variáveis estudadas.

A análise de variância foi aplicada para verificar a validade dos modelos representados pelas equações. Os resultados são apresentados na Tabela 30. Os resultados da análise de variância associado aos resultados de formação de MAGs/DAGs, de FFAs e consumo de TAGs indicam que o valor F entre a regressão e os resíduos foram quase 4 vezes superiores ao valor F indicado na tabela.

Dado que os modelos propostos são válidos, as equações de regressão permitem prever o efeito dos dois parâmetros estudados na hidrólise do substrato oleoso. A relação entre as variáveis independentes e dependentes é representada tridimensionalmente pela superfície de resposta criada pelos modelos em cada amostra (Figuras 31, 32 e 33).

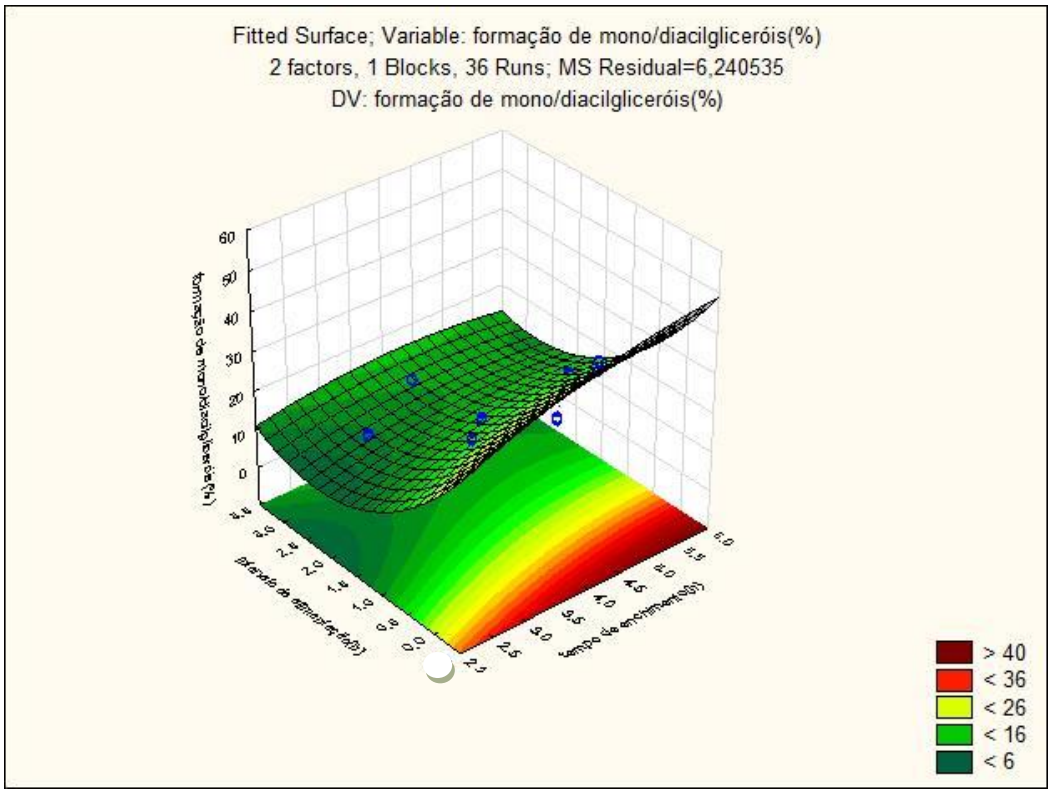


Figura 31 - Superfície de resposta para a porcentagem de formação de mono e diacligliceróis para substrato com 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial (parâmetros: intervalo de alimentação em horas X tempo de enchimento em horas)

Na Figura 31, o conteúdo de MAGs/DAGs foi positivamente afetado pelos dois parâmetros variáveis de reação. Entre os dois parâmetros, o intervalo de alimentação de substrato teve o maior efeito sobre formação de MAGs/DAGs. Durante a fase de aplicação dos intervalos curtos de alimentação, houve efetiva aceleração da reação, aumentando a formação de MAGs/DAGs. Existem duas possíveis razões para isso. Primeiro, os DAGs, que contêm um grupo hidroxila livre, são mais hidrofílicos. Assim, são mais suscetíveis à hidrólise em relação aos TAGs (KATSURAGI *et al*., 2004). Deste modo, a formação de MAGs/DAGs aumentou significativamente, acompanhando o incremento de ciclos curtos de alimentação de substrato. Em segundo lugar, a adição de óleo de girassol médio oléico em intervalos de tempo mais curtos propicia a renovação de substrato para ser hidrolisado, aumentando a formação de MAGs/DAGs. Assim sendo, é desejável selecionar um baixo intervalo de alimentação de substrato, pelo nível de incremento no rendimento de processo de formação de MAGs/DAGs.

A reação de hidrólise enzimática descontínua-alimentada foi realizada a 50 °C. Na faixa de 40 – 60 ºC a velocidade de uma reação catalisada por lipase aumenta com a temperatura de acordo com o modelo de Arrhenius. No entanto, em temperaturas elevadas (acima de 65 ºC), este modelo não se aplica devido à extensa desnaturação irreversível da lipase. Os valores das energias de ativação relatados para os regimes de baixa e mediana temperatura variam de 0,97 a 74,9 kJ mol^{-1} (MALCATA *et al.,* 1992).

YAMAGUCHI & MASE (1991) avaliaram a formação de MAGs/DAGs catalisada por lipase. Mesmo em condições ideais (que podem ser expressas como as de desempenho ótimo da lipase) e sem adoção de elementos promotores de conversão, como surfactantes, o rendimento máximo de MAGs/DAGs foi cerca de 40%, tendo como substrato uma fonte rica em trioleína. Na hidrólise descontínua-alimentada realizada neste estudo, o rendimento máximo de MAGs/DAGs obtido experimentalmente foi comparável, de cerca de 32%.

PLOU *et al*. (1996) relataram a alta produção de MAGs (80% de rendimento) pela hidrólise de óleo de palma com lipase de *Rhizopus delemar*, usando um sistema de microemulsão. No entanto, problemas surgem da necessidade de remover o surfactante adicionado ao meio, para aumentar a produção de MAGs e DAGs. Desta forma, a maioria dos estudos referentes à hidrólise de gorduras catalisada por lipase se concentra na produção de ácidos graxos, mas não de MAGs e DAGs.

Os DAGs apresentam poder emulsionante inferior aos MAGs, mas como são co-produtos do processo de obtenção de MAGs e devido aos custos de separação das duas frações, os produtos são comumente comercializados em misturas conhecidas como MAGs e DAGs, com adequado desempenho como emulsificantes. No entanto, empregando um processo de destilação da mistura de MAGs e DAGs, pode-se obter MAGs concentrados em até 90% (FONSECA, 2015).

O desempenho para o consumo da fonte de TAG está demonstrado na Figura 32 e seguiu um perfil alinhado com expectativas observadas em estudos de vários autores, que empregaram modelos bifásicos de emulsão óleo-água. Em tais modelos, a hidrólise ocorre na interface óleo-água, de modo que as diferenças nas concentrações interfacial e em massa da enzima, substratos e produtos e a reação na interface são aspectos a serem considerados. No entanto, a hidrólise de TAGs por lipase é conhecida por seguir o mecanismo Ping Pong Bi Bi, havendo inibição por ácidos graxos, quando a concentração do mesmo assume mais de 40% do total de acilgliceróis produzidos, mesmo considerando intervalos de alimentação de curta duração. Em HERMANSYAH *et al*. (2006), observa-se que à medida que as taxas iniciais da fonte de trioleína diminuiram, as taxas de reação diminuíram também para a formação de MAGs e DAGs, após atingir um máximo de formação. Verificou-se que tempos mais espaçados de alimentação de substrato trioleína e consequente massiva formação de ácido oléico rendeu taxas de reação mais baixas e a diminuição da concentração máxima dos intermediários. As velocidades de reação mais lentas foram consideradas como devidas à inibição por aumento da formação da fração de ácidos graxos livres no meio reacional.

A Figura 32 apresenta a superfície de resposta para o consumo de TAGs na hidrólise enzimática descontínua-alimentada.

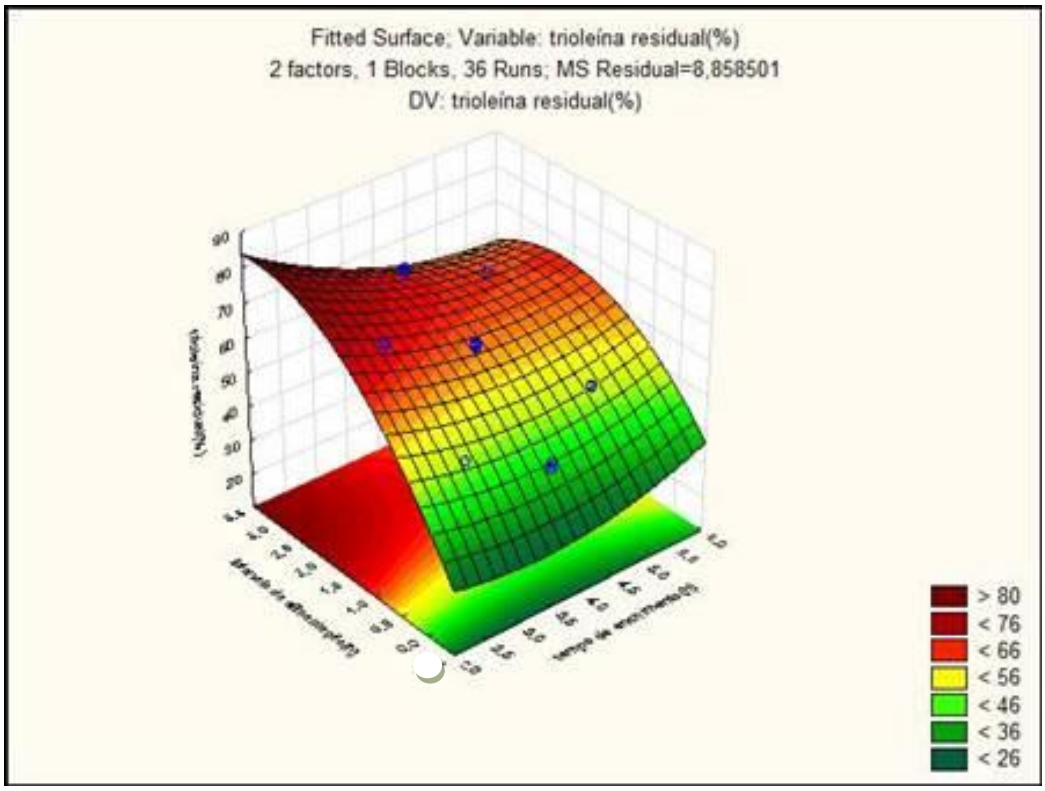


Figura 32 – Superfície de resposta para a porcentagem de consumo de triacilgliceróis para condição de 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial (parâmetros: intervalo de alimentação em horas X tempo de enchimento em horas).

Neste caso, o parâmetro de interação mais significativo para consumo de TAG foi a interação entre tempo de enchimento e intervalo de alimentação (Tabela 28). Baseado na Figura 32 de superfície de resposta que foi construída com base no nível central de tempo de enchimento e intervalo de alimentação, foi observado que o nível de TAG diminuiu para níveis maiores de tempo de enchimento e para intervalos de alimentação menores, conjuntamente. Por conseguinte, observa-se que quanto menor for o intervalo de alimentação de substrato, maior será a hidrólise. No entanto, após atingir aproximadamente 32% em peso de MAGs/DAGs, o aumento em tempo de enchimento e intervalo de alimentação não causou diminuições adicionais marcantes de TAG. O teor de TAGs residuais foi de cerca de 50% para a maior formação de MAGs/DAGs, da ordem de 32%, resultados compatíveis aos obtidos por LING ZHI *et al*. (2007). A possível explicação para isto é que a absorção de excesso de água sobre enzima completamente submersa resulta na incapacidade dos substratos para atingir a lipase ligada à superfície, além da já relatada presença crescente de ácidos graxos livres entre os produtos finais.

A Figura 33 apresenta o desempenho de formação de ácidos graxos livres durante a hidrólise enzimática descontínua-alimentada.

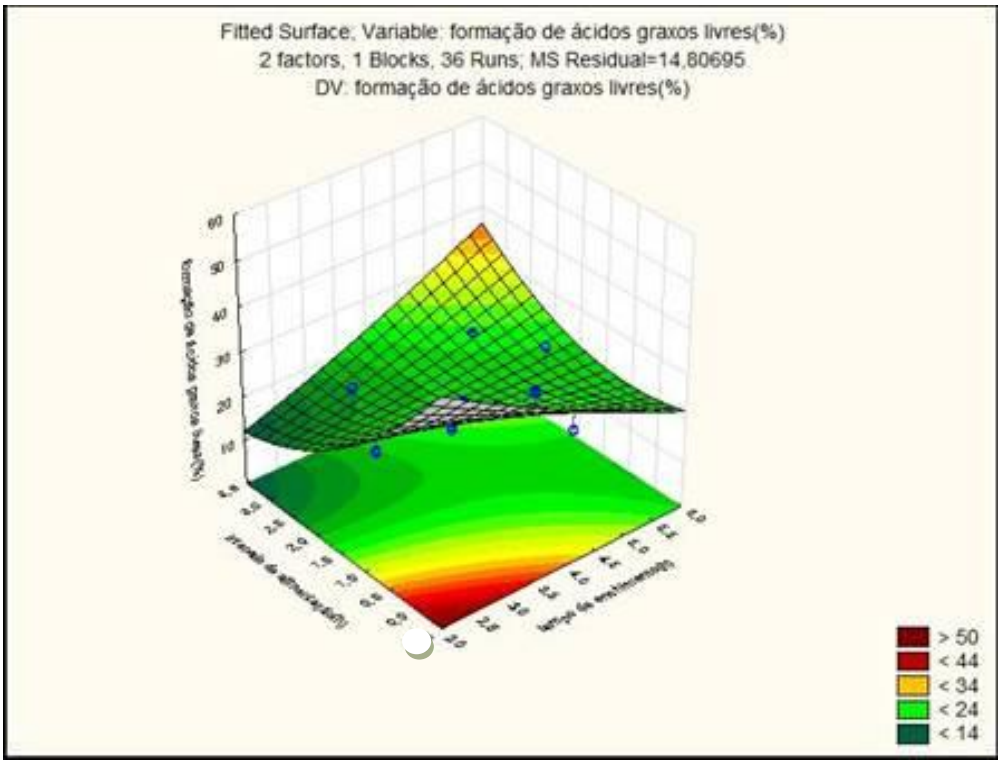


Figura 33 – Superfície de resposta para a porcentagem de formação de ácidos graxos livres (acidez) para substrato com 15% de óleo de girassol médio oléico na emulsão inicial (parâmetros: intervalo de alimentação em horas X tempo de enchimento em horas)

Conforme se pode ver nesta figura, as maiores taxas de acidez (da ordem de 30%) ocorreram para tempos de enchimento intermediários (3–4 h), assim como para os menores intervalos de alimentação (0,1–0,5 h), coerentes com boa formação dos MAGs e DAGs. Ocorre inibição da atividade enzimática por conta do acúmulo progressivo de ácidos graxos livres (PAIVA *et al*., 2000).

Tais graus de hidrólise menores (não maiores que 31,8%), já eram esperados devido à retração da atividade enzimática por conta do acúmulo progressivo de ácidos graxos que acabam se interagindo com elementos secundários da composição do óleo de girassol médio oléico, situação descrita também por outros autores (MALCATA *et al*., 1992; PAIVA *et al*., 2000; XENAKIS *et al.,* 2010).

Um resultado de hidrólise similar de fonte oleosa oriunda de óleo de girassol com alto teor de ácido oléico por lipase imobilizada em condições de tempo por até 6 horas e temperatura de 45 – 50 ºC em reator semi – alimentado com membrana foi obtido, demonstrando perfis de curvas de desempenho de formação dos compostos estudados muito alinhadas com os resultados deste trabalho (Figuras 31, 32 e 33), onde se nota uma evolução de formação de MAGs e DAGs até um ponto máximo nas condições intermediárias das variáveis, com queda da curva à medida que o tempo de reação se prolongou para além de 6,0 h de processo. Em adicional, observa-se que a concentração de TAGs (T) diminuiu de forma constante em função da conjução de tempo de reação e

volumes de alimentação, o que pode ser comparável à nossa variável, intervalo de alimentação. No caso de formação de MAGs e DAGs, o máximo obtido pode ser observado no seu percurso de tempo como um resultado do complexo mecanismo de reação com múltiplas etapas. A quantidade de ácidos graxos livres aumentou continuamente e em cerca de 5 horas de tempo de reação, a conversão alcançou 45%. Posteriormente, a concentração dos ácidos graxos livres aumentou ainda mais, mas a velocidade da reação diminuiu (BÉLAFE-BAKÓ *et al*., 1994).

É geralmente reconhecido que os ácidos graxos livres tendem a inibir reações de hidrólise catalisadas por lipase. O mecanismo exato pelo qual esta inibição ocorre ainda não é claro, mas acredita-se que as moléculas de ácido graxo se acumulem na interface lípidio / água, bloqueando assim o acesso da enzima a moléculas de TAGs não reagidas (MALCATA *et al*., 1992).

Desta forma, a metodologia de superfície de resposta foi aplicada com sucesso para modelar e otimizar a hidrólise parcial descontínua-alimentada de substrato emulsionado de óleo de girassol médio oléico. As melhores condições para obtenção de MAGs e DAGs foram: tempo de enchimento entre 3–4 h e intervalo de alimentação entre 0,1 - 0,5 h.

Em complementação aos acompanhamentos feitos utilizando as metodologias de TLC/ JustTLC® e porcentagem de hidrólise, a composição dos hidrolisados da emulsão de óleo de girassol médio oléico foi novamente verificada quanto à representatividade dos resultados, utilizando cromatografia de exclusão de tamanho de alta performance (HPSEC), uma vez que foi utilizada esta metodologia de cromatografia anteriormente para assegurar a consistência da validade obtida nas correlações entre os resultados obtidos com as técnicas de TLC e acidez. Padrões de referência de ácidos graxos livres e acilgliceróis em trioleína foram usados para determinar o intervalo de tempos de retenção a que estes compostos foram eluídos. Devido às limitações do instrumento HPSEC disponível, uma separação distinta da eluição das regiões de AGL e MAG não pode ser obtida, como se pode observar nas Figuras 34, 35 e 36. Assim, estes compostos foram quantificados como um grupo e depois separados, por aplicação de resultados de leituras de porcentagem de hidrólise, que forneceram as quantidades de ácidos graxos livres obtidos. O tempo de retenção da soma de AGL e MAG variou de 19,32 a 23,71 min, enquanto que os de DAG e TAG variaram de 17,40 a 17,73 min e de 16,80 a 18,86 min, respectivamente. Os produtos da reação foram analisados com base na sua soma de total de AGL e MAG, total de DAG e de conteúdo total de TAG. Os conteúdos de AGL e MAG, DAG e TAG foram expressos como % em peso total da amostra, como se pode conferir na Tabela 31.

Foram demonstrados, com exemplo, alguns resultados dos hidrolisados para substrato 15% O/A em reações de hidrólise descontínua-alimentada, em duplicata, por HPSEC, mais especificamente para as hidrólises enzimáticas submetidas às variáveis (tempo de hidrólise 3 h e intervalo de alimentação 0,5 h) (Figura 34), variáveis (tempo de hidrólise 4 h e intervalo de alimentação 0,1 h) (Figura 35), variáveis (tempo de hidrólise 5 h e intervalo de alimentação 0,5 h) (Figura 36), para os melhores parâmetros de formação de MAGs e DAGs. Observa-se também a afinidade destas correlações, que estão melhor demonstradas na Tabela 31, uma vez que

estão alinhadas com os correspondentes dados em acidez e TLC. Novamente, os resultados foram consistentes ($p < 0,05$) com os obtidos para as amostras por TLC e percentagem de hidrólise, conforme havíamos observado anteriormente na primeira parte do projeto, na hidrólise descontínua.

Tabela 31 - Composição e quantificação comparativa, por análise de TLC/acidez/HPSEC, dos produtos hidrolisados a partir do substrato emulsão a 15% de óleo girassol médio oléico via hidrólise descontínua-alimentada.

Ensaios	Variáveis originais							
	V1	V2	MAGs/DAGs (TLC) (%)	TAGs (TLC) (%)	FFAs (TLC) (%)	FFAs (% hidrólise)	MAGs/DAGs (HPSEC) (%) (*)	TAGs (HPSEC) (%)
	tempo de hidrólise (h)	intervalo de alimenta-ção (h)						
óleo de girassol médio oléico	-	-	5,76±0,05	94,24±0,05	---	----	0,88±0,05	99,12±0,05
A	3	2,5	9,74±0,63	67,50 ±1,05	22,76 ±0,41	23,42 ±0,36	11,52±0,05	65,06±0,05
B	5	2,5	10,68±0,84	64,31 ±1,01	25,01 ±0,62	23,42 ±0,21	15,23±0,05	63,97±0,05
C	5,4	1,5	17,04±0,87	58,79 ±0,12	24,17 ±0,06	25,42 ±0,04	18,32±0,05	56,23±0,05
D	4	2,9	13,68±0,51	69,93±0,62	8,36 ±0,48	19,96 ±0,11	12,53±0,05	71,08±0,05
E	4	1,5	15,58±0,67	61,19±0,84	23,23 ±0,54	21,15 ±0,24	14,74±0,05	63,58±0,05
F	3	0,5	26,75±0,52	45,96 ±0,69	27,29 ±0,37	29,51 ±0,19	24,15±0,05	46,34±0,05
G	4	0,1	27,93±0,22	40,06 ±0,30	31,47 ±0,33	34,01 ±0,13	26,90±0,05	39,10±0,05
H	5	0,5	31,75±1,35	51,17 ±1,41	17,08 ±1,14	16,39 ±0,36	32,61±0,05	49,00±0,05

(*)formação de MAGs/DAGS HPSEC = soma result HPSEC (DAG/MAG+AG) - form AGL por % hidrólise

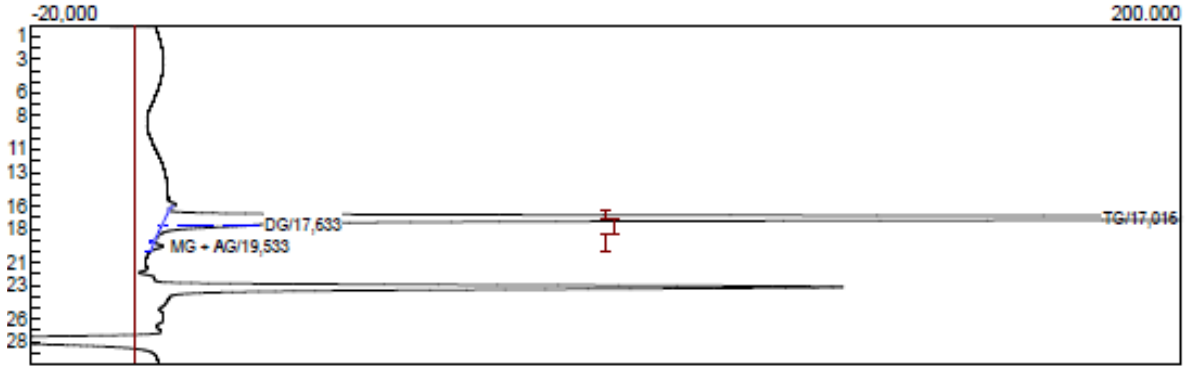


Figura 34 – Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 3 h/ intervalo de alimentação 0,5 h)

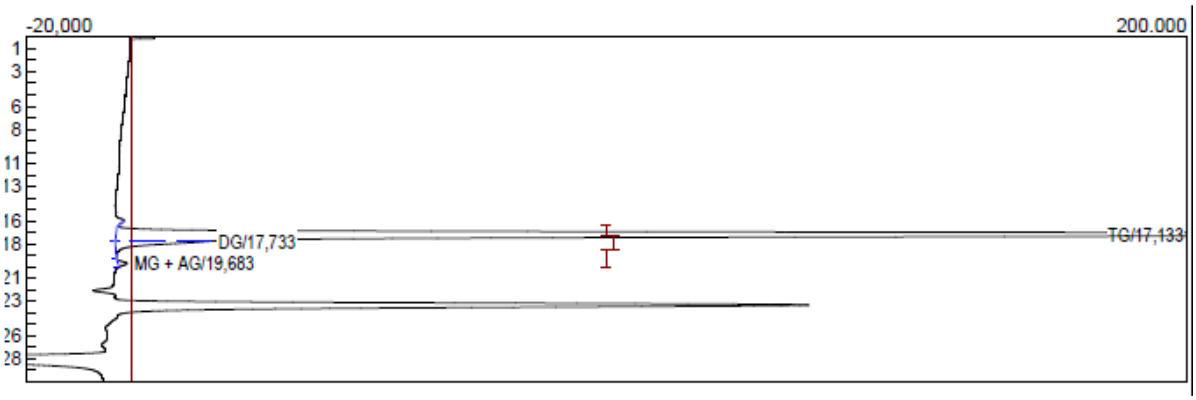


Figura 35 – Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 4 h/ intervalo de alimentação 0,1 h)

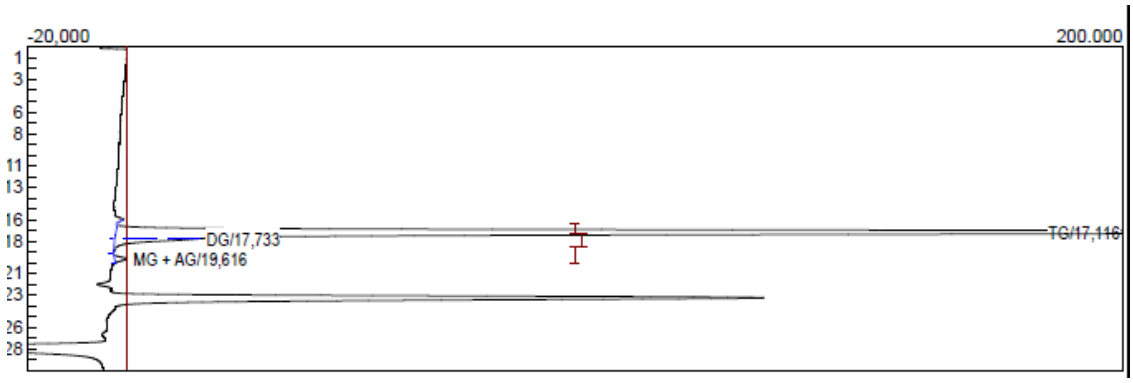


Figura 36 – Análise por HPSEC da amostra 15% O/A (tempo de hidrólise 5 h/ intervalo de alimentação 0,5 h)

Ling Zhi *et al*. (2007) avaliaram a produção de DAGs a partir de oleína de palma por hidrólise parcial enzimática com Lipozyme RM IM. As condições ótimas de reação foram 50% de teor de água, 10% de enzima imobilizada, temperatura de 65 °C e 12 h de reação, com formação de 32% de DAGs e 23% de TAGs residuais, além de MAGs e AGL. A purificação por destilação molecular propiciou a obtenção de produto final com 60% de DAGs e 40% de TAGs, adequado para aplicação em margarinas, cremes vegetais e gorduras plásticas. Os AGL e MAGs podem ser facilmente separados do produto final por destilação molecular, mas a separação de DAGs e TAGs é difícil devido à pequena diferença de pressão de vapor entre estes compostos.

Considerando a hidrólise enzimática descontínua-alimentada, as duas amostras com maiores teores de MAGs e DAGs apresentaram os seguintes valores: 31,8% de MAGs/DAGs, 51,2% de TAGs e 16,4% de FFAs (para tempo de enchimento 5 h e intervalo de alimentação de 0,5 h) e 27,9% de MAGs/DAGs, 40,1% de TAGs e 31,4% de FFAs (para tempo de enchimento 4 h e intervalo de alimentação de 0,1 h). Caso estas amostras sejam submetidas à neutralização dos ácidos graxos livres e posterior eliminação dos sabões formados, elas

apresentarão teores de 38,3% de MAGs/DAGs e 61,7% de TAGs e de 41,0% de MAGs/DAGs e 59,0% de TAGs, respectivamente.

A hidrólise parcial enzimática de óleo de girassol médio oléico utilizando lipase imobilizada *sn*-1,3 específica pode ser considerada uma alternativa às vias químicas para a produção de misturas de MAGs e DAGs insaturados para utilização como aditivos químicos.

5. CONCLUSÕES

- Houve boa correlação ($p \leq 0,05$) entre os resultados do teor de ácidos graxos livres determinados pelas análises de percentual de hidrólise, cromatografia em camada delgada e HPSEC, tanto para a trioleína técnica, quanto para o óleo de girassol médio oléico.

- O emprego da técnica TLC tradicional, em conjunção com a tecnologia de interpretação de imagens JustTLC®, assim como a técnica de porcentagem de hidrólise (como medida de acidez), bastante empregada em análises de resíduos gordurosos em emulsões aquosas de estações de tratamento de efluentes industriais, mostraram-se adequadas e confiáveis para a identificação e quantificação de TAGs, DAGs, MAGs e AGL.

- No estudo da hidrólise enzimática descontínua de emulsão de trioleína técnica, a aplicação da metodologia de superfície de resposta demonstrou adequado ajuste dos resultados das respostas para a formação de ácidos graxos livres, formação de MAGs e DAGs e trioleína residual, para as condições de 5 e 20% de óleo na emulsão inicial. Os resultados também se mostraram preditivos, gerando equações que forneceram gráficos de superfície de resposta adequados para a representatividade das informações geradas. A formação de MAGs e DAGs apresentou maior rendimento em emulsões com 20% de óleo em condições intermediárias de tempo e temperatura, com rendimento na faixa de 26–34%, para condições de processo entre 40–50 °C e 3–4 h de reação.

- Na etapa posterior do projeto, os dados apresentados nos planejamentos fatoriais feitos para a avaliação das reações de hidrólise enzimática da emulsão aquosa a 15% de óleo de girassol médio oléico, sob regime *fed-batch* (descontínuo-alimentado), sinalizaram um perfil de desempenho positivo das respostas reacionais coletadas face às variáveis escolhidas (tempo total de enchimento do substrato e intervalo de alimentação), como um consumo progressivo e consistente dos TAGs presentes nas emulsões iniciais, sinalizando uma consistente formação de MAGs e DAGs (de 26-27% a 31-32%), na faixa ótima e de tempo intermediário de alimentação e baixos intervalos de alimentação de substrato, 4–5,4 h e 0,1–0,5 h, respectivamente. Por conta de haver sido empregada uma fonte natural mais rica em TAGs do que na etapa preliminar do projeto e da reposição de substrato no processo descontínuo-alimentado, observou-se que houve diminuição na tendência de formação de ácidos graxos livres Tal comportamento está alinhado com os poucos resultados encontrados na literatura para reações de hidrólise enzimáticas descontínuas-alimentadas e são dados novos quando se refere a uma condição reacional executada a partir de um óleo natural filtrado e sem emprego de coadjuvantes de processos, como surfactantes.

- A hidrólise parcial enzimática de TAGs utilizando lipase imobilizada *sn*-1,3 específica pode ser considerada uma alternativa às vias químicas para a produção de misturas de MAGs e DAGs para utilização como aditivos químicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACEVEDO, N.C.; BLOCK, J.M.; MARANGONI, A.G.; Unsaturated emulsifier-mediated modification of the mechanical strength and oil binding capacity of a model edible fat crystallized under shear., *Langmuir*, v.28, p.16207-16217, 2012.

AKITA, C.; KAWAGUCHI, T.; KANEKO, F., Structural study on polymorphism of cis unsatureted triacylglycerol: triolein, *Journal of Physics Chemicals*, v.110, p.1316-1353, 2006.

ALLEN, S.J.; OTT, L.S., HPLC Method for rapidly following biodiesel fuel transesterification reation progress using a core-shell column, *Analysis Bioanalytic Chemistry*, 404, p.267-272, 2012.

AOCS, AMERICAN OIL CHEMISTS´ SOCIETY. Official methods and recommended practices of the AOCS. 4ª.ed. Champaign, 1989, 1990, 1997, 1999, 2003, 2009, 2010.

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

BANSAL, K.; MCCRADY, J.; HANSEN, A.; BHALERAO, K., Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel, *Fuel*, 87, p. 3369-3372, 2008.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da UNICAMP ; 2001, P. 171-215.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; DOMBI, Á.; SZABÓ, L.; NAGY,E.; Triacylglycerol hydrolysis by lipase in a flat membrane bioreactor. *Biotechnology Techniques.*, v.8, n.9, p.671-674, 1994.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE,P., Food Chemistry, Springer GmBH , 4th edition revised (2009). p. 938-970.

BESSLER, T.R., ORTHOEFER, F.T. Providing lubricity in food fat systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 60, n. 10, p. 1765-1768, 1983.

BLASI, F.; COSSIGNAMI, L; SIMONETTI, M.S.; Biocatalysed syntesis of *sn*-1,3-diacyglycerol oil from extra virgin olive oil; *Enzyme Microb. Technol.*, v.41, p.727-732, 2007.

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

BOYLE, E.; GERMAN, J.B.; Monoglycerides in membrane systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* , v.36, p.785-805, 1996.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; Statistics for Experimenters. John Wiley & Sons ; 1978, P. 203-214.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Resolução-RDC Nº 270 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [On-line] Available: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word= [outubro 21, 2005].

CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; A review on hydrolytic in treatment of wastewater with high oil and grease content., *Bioresource Technology.,* v.97, p.2195-2210, 2006.

CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; D'ADDIO NOFFS, M.; OLIVEIRA, J.G.; Aplicação de lipases na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados; *Química Nova.*, v.26, n. 1, p.75-80, 2006.

CASTRO ARAUJO, L T. Aplicação de lipases. Belo Horizonte, 2009. Monografia apresentada para Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. (Orientador: Prof.Dr. Ary Corrêa Júnior).

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

CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. ; Fine chemical by biotransformation using lipases; *Química Nova.*, v.18, n. 6, p.544-554, 1995.

TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B.; Comparative differential scanning calorimetric analysis of vegetable oils, Phytochemical analysis of vegetable oils: effects of cooling rate variation, *Phytochemical analysis*, 13, p. 142 – 151, (2002).

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

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

COLEMAN, M. H., The Pancreatic Hydrolysis of Natural Fats. III The Influenceof the Extent of Hydrolysis on Monoglyceride Composition, *The Journal of the American oil Chemists' Society*, VOL. 40, p. 568-571, 1963

CONCEIÇÃO, M.M.; CANDEIA, R.A.; DANTAS, H.J.; SOLEDADE, L.E.B.; FERNANDES, V.J; Rheological behaviour of castor oil biodiesel ; *Energy and Fuel.*, v.19, p.2185-2188, 2005.

CORMA, A.; IBORRA, S.; MIGUEL, S.; PRIMO, J.; Catalysts for the production of fine chemicals production of food emulsifiers, monoglycerides by glycerolysis of fats with solid base catalysts. *Journal of Catalysts*, v.173, p.315-321, 1998.

COTERON, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.; Reation of olive oil and glycerol over immobilized lipases. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.75, n.5, p.657-660, 1998.

DALLAVECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V.; Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros; *Química Nova.*, v.27, p.623-630, 2004.

DAMSTRUP, M.L.; JENSEN, T.; SPARSO, F.V.; KIIL, S.Z.; JENSEN, A . D.; XU, X.; Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.82, n.8, p.559-564, 2005.

DOBARGANES, M. C. VELASCO, J. DIEFFENBACHER, A.. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure and Applied Chemistry.* New York. v. 72, p.1563-1575, 2000.

DOMINGUEZ, A.; DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A.; LONGO, M.A., Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*, *J Chem Technol Biotechnol.*, v.78, p.1166-1170, 2003.

DURLI, E.; Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderia cepacea LTEB11 . Curitiba, Paraná, 2007. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Química da Universidade Federal do Paraná. Departamento de Química – área de concentração em Química Orgânica , UFPR.

FERGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G., High-resolution gas-chromatograph determination of diacylglycerols in common vegetable oils, *The Journal of the american oil chemists´ society*, 70, no. 2, p.246-252, 1993.

FERRARI, R.A; OLIVEIRA, V.D.; OSCABIO, A.; Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização fisico-quimica e consumo em gerador de energia; *Química Nova.*, v.28, n.1, p.19-23, 2005.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A.C.; BAPTISTA, F.O. ; FONSECA, M.M.R.; Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalysed by commercial immobilized lipases; *J. Mol. Catal. B. Enzym..*, v.11, p.699-711, 2001.

FILLIÉRES, R.; BENJELLOUN-MLAYAH, B.; DELMAS, M.; Ethanolysis of Rapeseed Oil: Quantitation of Ethyl Esters, Mono-, Di-, and Triglycerides and Glycerol by High-Performance Size-Exclusion Chromatography; *J. Am. Oil. Chem. Soc*, v.72, n.4, 1995.

FLENKER, J.; SPENER, F.; Hydroxy-monoglycerides by lipases-catalyzed partial hydrolysis of castor oil; DECHEMA Biotechnol. Conf, Hamburg, 2008.

FONSECA, S.B.C.; Aspectos técnicos e avaliação de metodologia para o acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo derivado enzimático Lipozyme TL IM. Florianópolis, Santa Catarina, 2015. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química , UFSC.

FREEDONIA STRATEGIC PLAN FOR NEXT FOUR YEARS. Available at: www.freedoniagroup.com/brochure/25xx/2506smwe.pdf. > Accessed on: 27 april 2017.

FREGOLENTE, L.V. Obtenção de monoglicerídeos de alta concentração através do processo de destilação molecular. Campinas, 2006. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas. Departamento de Engenharia Química (Orientador: Prof.Dr. Alfredo Russi).

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V.H.; CASTRO, H.F.; Monoglicerideos: produção por via enzimática e algumas aplicações ; *Química Nova.*, v.31, n.6 p.1514-1521, 2008.

FUCHS, B.; SUß, R.; TEUBERA, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER, J., Lipid analysis by thin-layer chromatography – a review of the current state, *Journal of Chromatography*, 1218, p. 2754-2774, 2011.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; REBAI, A.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y.; Production of mono-olein by *Staphylococcus simulans* lipase in a solvente-free system: Optimization by response surfasse methodology, *Enzyme and Microbial Technology,* v.39, p.717-723, 2006.

GIOIELLI, L.A.; BARUFFALDI, R.; SCHUCH, R.; Acompanhamento cromatográfico da reação de esterificação entre glicerol e ácido palmítico, *Ciênc. Tecnol. Aliment,* v.2, n.1, p.74-83, 1982.

GONÇALVES, G. A .F.; Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso; *Revista da Faculdade de Farmácia.*, Universidade Federal de Minas Gerais, v.27, 2007.

GUEBARA, S.A.B.; ARAUJO, M.C.E.; RACT, J.N.R.; VITOLO, M.; Lipase Catalysed Esterification of Caprylic Acid with Residual Glycerol from Biodiesel Production, *World J. Pharm. Sci.,* 28, p. 403, 2016.

GUNSTONE, F. D., HARWOOD, J.L. Occurrence and characterization of oils and fats. In: GUNSTONE, F. D., HARWOOD, J.L., DIJKSTRA, A.J., eds. *The Lipid Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 37-52.

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

HAMMOND, E.G.; GLATZ, B.A.; Food Biotechnology. London: Elsevier Publishers Limited, v. 2 ; 1988, P. 173-217.

HARTMAN, L., LAGO, R.C.A . Rapid preparation of fatty acid acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v. 22, p. 475-476,494, 1973.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A.; Industrial aplications of microbial lipases; *Enzyme and Microbial Technology.*, v.39, p.235-251, 2006.

HASSENEIN, M.M.M.; Studies on non-traditional oils: detailed studies on different lipid profiles of some Rosaceae kernel oils, *Grasas y Aceites*, vol. 50, fase 5, p.379-384, 1999.

HERMANSYAH, H.; KUBO, M.; SHIBASAKI-KITAKAWA, N.; YONEMOTO, T.; Mathematical model for stepwise hydrolysis of triolein using Candida rugosa lipase in biphasic oil–water system, *Biochemical Engineering Journal*, v.31, p.125-132, 2006.

HOPIA, A. I., PIIRONEN, V. I., KOIVISTOINEN, P. E.; HYVÖNEN, L.E.T.; Analysis of Lipid Classes by Solid-Phase Extraction and High-Performance Size-Exclusion Chromatography; *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, V. 69, n. 8, 1992.

IAL; TAKEMOTO, E.; TAVARES, M.; CARUSO, M.F.S.; RODRIGUES, R.S.M., PIMENTEL, S.A., Óleos e gorduras. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S., coord.; *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4.a ed., 1.a Ed. Digital, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde – SP, p. 595-597, 2008.

IRVINE, G.B.; High-performance Size-exclusion Chromatography of Peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, v.56, p.233-242, 2003.

JACKSON, M.A..; KING, J.W.; Lipase-catalysed glycerolisis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.74, n.2, p.103-106, 1997.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T.; Microbial lipases form vesatile tools for biotechnology; *Tibtech..*, v.16, p.396-403, 1998.

JustTLC^{R} software 4.0.3 User Guide; Sweday, Lund, Sweden, july 2013.

KADAM, M.; BHOWMICK, D.N., HPLC Analysis of rice bran oil, *Journal of Food Lipids*, 13, p. 354-361, 2006.

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

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. *Process Biochemistry,* v.40, n.5, p.1525-1530, 2005.

KALNIN, D., LESIEUR, P., ARTZNER, F., KELLER, G., OLLIVON, M. Systematic investigation of lard polymorphism using combined DSC and time-resolved synchrotron X-ray diffraction. *European Journal Lipid Science Technology*, v. 107, p. 594-606, 2005.

KATSURAGI, Y., YASUKAWA, T., MATSUO, N., Overview of Diacylglycerols. In: KATSURAGI, Y., YASUKAWA, T., MATSUO, N., FLICKINGER, B.D., TOKIMITSU, I., MATLOCK, M.G., eds. *Diacylglycerol oil.* Tokyo: AOCS Press, 2004. p. 37-52, 272pp.

KITTIRATTANAPIBOON, K.; KRISNANGKURA, K.; Separation of acylglycerols, FAME and FFA in biodiesel by size exclusion chromatography; *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, v.110, p.422-427, 2008.

KOBLITZ, M.G.B., Purificação e caracterização de lipase de *Rhizopus* sp. e sua aplicação na síntese de monoacilgliceróis . Campinas, 2003. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas. Departamento de Engenharia Química, UNICAMP.

KODALI, D.R.; REDGRAVE, T.G.; SMALL, D.M.; ATKINSON, D.; Synthesis and Polimorphism of 3 – Acyl-*sn*-glycerols, *Biochemistry*; 24, 5 19, p.525 519, 1985.

KRISTENSEN, J.B., XU, X., MU, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society,* v. 82, p. 329-334, 2005.

KRUGER, R.L.; Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva. Florianópolis, Santa Catarina, 2010. Tese de doutorado – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P; GARLAPATI, V.K.; Enzymatic transesterification of jatropha oil ; *Biotechnol. Biofuels.*, 2:1, open acess, 2009.

LI, D.; ADHIKARI, P.; SHIN, J.A.; LEE, J.H.; KIM, Y.L.; ZHU, X.M.; HU, J.N.; JIN, J.; AKOH, C.C.; LEE, K.T.; Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soy bean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats, *LWT - Food Science and Technology*, v.43, p.458 – 464, 2010.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; Biotecnologia – Tecnologia das fermentações. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda, 326p, 2004.

LING-ZHI, C.; CHIN-PING, T.; KAMARIAH, L.; MOHD, S.A.Y.; NORLELAWATI, A.; SEONG-KOON, L.; OI-MING, L.; Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology, *Food Chemistry*, v.105, p.1614-1622, 2007.

LO, S.-K., CHEONG, L.-Z., ARIFIN, N., TAN, C.-P., LONG, K., YUSOFF, M.S.A., LAI, O.-M. Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface-optimized process for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor. *J. Agric. Food Chem*., v.55, p.5595-5603, 2007.

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G; AMUNDSON, C.H.; Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases, *Enzyme Microb Technol.*, v.14, p.426-446, 1992.

MANGOLD, H.K.; MALINS, D.C., Fractionation of Fats, Oils, and Waxes on Thin Layers of Silicic Acid; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.37, n.6 p.383-385, 1960.

MARQUEZ-RUIZ, G.; JORGE, N.; MARTIN-POLVILLO, M.; DOBARGANES, M.C.; Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as an internal standard., *J. Chromat.,* v.749, p.55–60, 1996.

McNEIL, G.P.; BOROWITZ, D.; BERGER, R.G.; Selective distribution of satured fatty acids into the monoglyceride fraction during enzymatic glycerolysis; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.69, n. 11, p.1098-1130, 1992.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, H.F.; GIORDANO, R.L.C., Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. Química Nova. v.34, n.5, p.831-840, 2011.

MENDES, A.A.; PEREIRA, E.B.; CASTRO, H.F.; Effect of the enzymatic hydrolysis pretreatment of lipids-rich wastewater on the anaerobic biodigestion. *Biochemical Engineering Journal*. V.32, p.185–190, 2006.

METIN, S.; HARTEL, R.W., Thermal Analysis of Isothermal Crystallization Kinetics in Blends of Cocoa Butter with Milk Fat or Milk Fat Fractions; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.75, n.11 p.1617-1624, 1998.

MONTGOMERY, D.C.; Design and Analysis of Experiments., New York, John Wiley & Sons, 2009, 341p.

MOQUIN, P. H.L.; TEMELLI, F.; KING, J.W.; Kinetic modeling of glycerolysis reaction for soybean o;ils in supercritical carbon dioxide media; *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.82, n.o 8, p.613-617, 2005.

MORETTO, E.; FETT, R.; TECNOLOGIA DE ÓLEOS E GORDURAS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS. São Paulo: Editora Varela; 1998.

MOYA-RAMIREZ, I.; FERNANDEZ-ARTEAGA, A.; JURADO-ALAMEDA, E.; GARCIA-ROMAN, M.; Waste frying oils as substrate for enzymatic lipolysis: optimization of reaction conditions in O/W emulsion., *J. Am. Oil Chem. Soc.,* V.93, p.1487-1497, 2016.

NEFF, W. E.; BYRDWELL, W. C.; LIST, G. R. Triacylglycerol structures of food fats high in saturated acids by HPLC and mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 24, p. 837–854, 2001.

NG, S.P.; LAI, O. M.; ABAS, F.; LIMA, H.K.; BEH, B.K., Compositional and thermal characteristicsof palm olein-based diacylglycerol in blends with palm super olein, *Food Research International*, 55, p. 62-69, 2014;

NOOR, I.M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K.B.; Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase, *Process Biochemistry*, v.39, p.13-20, 2003.

O´BRIEN, R.D.; Shortenings: types and formulations. In: SHAHIDI, F., ed. *Bailey's industrial oil and fat products*. 6th edition, Hoboken: John Wiley & Sons. p. 125-157, 2005

OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FACCIO, C.; MENDONCIN, S.; Influencia das variáveis de processo na alcoolisa enzimática de óleo de mamona ; *Ciência e Tecnologia de Alimentos.*, v.24, n. 2, p.178-182, 2004.

OLIVEIRA, L.B.; MUYLAERT, M.S.; ROSA, L.P.; BARATA, M; Analysis of the sustainability of using wastes in Brazilian power industry; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.12, p.883-890, 2006.

PAIVA, A.L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X.; Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, v.27, p.187-204, 2000.

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.

PLOU, F.J; BARANDIARHN, M.; CALVO, M.V.; BALLESTEROS, A.; PASTOR, E.; High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein, *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, p.66-71, 1996

POSORSKE, L.H.; Industrial-scale application of enzymes to the fats and oils industry., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.61, p.1758-1760, 1984.

QINTAO, L.; Conversion of triacylglycerols into monoacylglycerols by Penicillium roquefortii., London, United Kingdom, 1998, thesis – Environmental Research Centre, School of Leisure & Food Management, Sheffield Hallam University.

QUEIROZ, N.; Síntese enantiosseletiva de amidas e ésteres catalisadas por lipases; *Revista do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,* Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis, 2002.

RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BAHARUM, S.N.; BASRI, M.; SALLEH, S.N. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5, *Analytical Biochemistry*, v.341, p.267-274, 2005.

RIBEIRO, A. P. B., BASSO, R.C., GRIMALDI, R., GIOIELLI, L.A., GONÇALVES, L.A.G. Instrumental methods for the evaluation of interesterified fats. *Food Analytical Methods*, v. 2, n. 4, p. 282-302, 2009a.

RIBEIRO, A.P.B., GRIMALDI, R., GIOIELLI, L.A., SANTOS, A.O., CARDOSO, L.P., GONÇALVES, L.A.G. Thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of zero *trans* fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil. *Food Biophysics*, v. 4, n. 2, p. 106-118, 2009b.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A V., Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. *Química Nova.*, v.30, n. 5, p.1374-1380, 2007.

ROCHA ALVES, J.A.; VITOLO, M.; GUIA PARA AULAS PRÁTICAS DE BIOTECNOLOGIA DE ENZIMAS E FERMENTAÇÃO. SÃO PAULO: BLUCHER EDITORA; 2017, 170p.

RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.66, p.15-32, 2010.

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L.R., F., The effect of reation conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid – liquid reactor, *Process Biochemistry*, v.36, p.947-953, 2001.

SABERI, A.H.; KEE, B.B.; OI-MING, L.; MISKANDAR, M.S., Physical-chemical properties of various palm-based diacylglycerol oils in comparison with their corresponding palm-based oils, *Food Chemistry*, 127, p. 1031 – 1038, (2011).

SAXENA, R.K.; GHOSH, P.K.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W.S.; BRADOO, S.; GULATI, R.; Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry; *Current Science*, v.77, p.101-115, 1999.

SERDAREVICH, B.; Glyceride isomerizations in lipid chemistry, *The Journal of the american oil chemists´ society*, vol. 44, p.381-393, 1967.

SILVA, R.C.; SOARES, F.A.S.M.; MARUYAMA, J.M.; DAGOSTINHO, N. R.; SILVA, Y. A.; CALLIGARIS, G.A.; RIBEIRO, A.P.B.; GIOIELLI, L.A. Effect of diacylglycerol addition on crystallization properties of pure triacylglycerols, *Food Research International*, v.55, p.436-444, 2014.

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.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R.A.; FURNEAUX, R.H., Glycerolysis of tallow with immobilized lipase. *Biotechnology Letters* , v.15, n.10, p.1043-1048, 2001.

STEVENSON, D. E.; STANLEY, R.A.; FURNEAUX, R.H., Optimisation of the alkyl-b-D-galactoside synthesis from lactose using commercially available b-galactosidase. *Biotechnology Bioengineering* , 42, p.657-666, 1993.

SUARES, P.A Z.; MENEGHETTI, S.M..; 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução brasileira e situação atual no Brasil; *Química Nova.*, v.30, p.2068-2071, 2007

TAN, C.P.; CHE MAN, Y.B.; Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm based products and coconut oil: effects of scanning rate variation, *Food Chemistry*, 76, p. 89-102, (2002).

TEMELLI, F.; KING, J.W.; LIST, G.R.; Conversion of oils to monoglycerides by glycerolisis in supercritica carbon dioxide media; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.73 p.699-706, 1996.

THUDE, S.; SHUKUN, L.; SAID, M.D.; BORNSCHEUER,U.T.; Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglyceides by glycerolysis of camphor tree seed oil and cocoa-butter. *Fett Lipid*, v.99, n.7, p.246-250, 1997.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; MIGUEL, S.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J.; Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches., *Journal of Molecular Catalysis B.,* v.9, p.113-148, 2000.

VITOLO, M.; BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA: ASPECTOS SOBRE APLICAÇÃO INDUSTRIAL. SÃO PAULO: BLUCHER EDITORA; 2015, 420p.

WANG, W. ; LI, T.; NING, Z.; WANG, Y.; YANG, B.; YANG, X., Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis , *Enzyme and Microbial Technology*, 49, p. 192-196, 2011.

WU, X.Y.; EISKELINEN, S.J.; LINKO, Y.Y., An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification and transesterification, *Enzyme and Microbial Technologyl*, v.19, p. 226-231, 1996.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T.; High-Yield Synthesis of Monoglyceride by Mono- and Diacylglycerol Lipase from *Penicillium camembertii* U-150, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.72, n.3, p.162-167, 1991.

YAMANE, T.; KANG, S.T..; KAWAHARA, K.; KOIZUMI, Y.; High – yield diacylglycerol formation by solid-phse enzymatic glycerolysis of hidrogenated beef tallow, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.71, n.3, p.339-342, 1994.

YANG, Y., LOWE, M.E., The open lid mediates pancreatic lipase function, *Journal of Lipid Research*, 41, p. 48-57, 2000.

XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T.; Colloidal structures in natural oils, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.15, p.55-60, 2010.

ZANOTTO, S.P.; Utilização de enzimas e microorganismos para obtenção de compostos oticamente ativos. Florianópolis, Santa Catarina, 2003. Tese de doutorado – Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC.

ZHENG, T., SHAN, L., JIN , Q., LIU ,Y., WANG, X. Melting and solidification properties of palm kernel, tallow and palm olein blends in preparation of shortening. *Journal of the American Oil Chemists' Society,* v. 89, p. 23 – 25, 2009.

7. ANEXO

7.1 Artigo publicado em jornal indexado

Título: “Conversion of Triolein into Mono- and Diacylglycerols by Immobilized Lipase”

Data publicação online: 17 June 2017

Nome da publicação: Arabian Journal of Science and Engineering (AJSE)

DOI: 10.1007/s13369-017-2635-7