

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE
MONOACILGLICERÓIS ACETILADOS POR VIA
ENZIMÁTICA**

CARLA LÉA DE CAMARGO VIANNA CRUZ

Engenheira de Alimentos
Mestre em Tecnologia de Alimentos

PROF. DR. DANIEL BARRERA ARELLANO

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Campinas – SP – Brasil
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C889o Cruz, Carla Lea de Camargo Vianna
Otimização da síntese de monoacilgliceróis acetilados por via
enzimática / Carla Lea de Camargo Vianna Cruz. – Campinas,
SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Daniel Barrera Arellano
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Interesterificação enzimática. 2. Lipase. 3.
Monoglicerídios. 4. Monoglicerídios acetilados. I. Barrera
Arellano, Daniel. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Optimization of enzymatic synthesis of acetylated monoacylglycerols

Palavras-chave em inglês (Keywords): Enzymatic interesterification, Lipase,
Monoglycerides, Acetylated monoglycerides

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Daniel Barrera Arellano

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Jane Mara Block

Renato Grimaldi

Eliete Malfatti Serra Scavariello

Programa de Pós-Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)

UNICAMP – FEA/DTA

Prof^a. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

UNICAMP – FEA/DTA

Prof^a. Dra. Jane Mara Block

UFSC – DCA

Dr. Renato Grimaldi

UNICAMP – FEA/DTA

Dra. Eliete Malfatti Serra Scavariello

Adhetech

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

UNICAMP – FEA/DTA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano por sua orientação segura e objetiva e por todo o ensinamento em química e tecnologia de óleos e gorduras.

À Profa. Dra. Lireny Ap. G. Gonçalves pelos ensinamentos em tecnologia de óleos e gorduras, pelas valiosas sugestões na redação da tese e pela atenção durante todo o período de doutorado.

À Prof. Dra. Jane Mara Block e à Dra. Eliete por terem aceitado participar da banca examinadora contribuindo com suas sugestões e correções.

Ao Dr. Renato Grimaldi pelas sugestões e por toda a ajuda e ensinamento durante a parte experimental.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos nos primeiros anos.

À IQT, Indústrias Químicas Taubaté, na pessoa do Dr. Peter Elser.

À Novozymes pelo fornecimento das enzimas.

À equipe do laboratório de óleos e gorduras, em especial a Rosana Nogueira, que muito contribuiu nas análises cromatográficas.

À Danielle pela grande colaboração nos testes preliminares.

À Dra. Caroline Joy Steel pela participação no exame de qualificação, colaborando com suas sugestões e pela revisão do abstract.

Aos amigos: Kelly, Ana Paula, Miluska, Cibele, Claudia, Waldomiro, Juliana, Marinalda, Andréa, Joeni entre outros, pela convivência no período de pós-graduação. Em especial a amiga Denise Becker de Almeida sempre presente e grande colaboradora na etapa de entrega da tese.

Aos amigos da APTA em Ribeirão Preto que acompanharam as etapas finais de redação e entrega da tese.

À minha família, aos meus pais, em especial meu marido Carlos Alex, grande incentivador, por toda colaboração e carinho, e aos meus filhos Rafael e Isabela pela alegria que todos os dias trazem a minha vida.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. MONOACILGLICERÓIS.....	4
3.1.1. APLICAÇÕES DE MONOACILGLICERÓIS.....	5
3.2. MONOACILGLICERÓIS ACETILADOS.....	9
3.2.1. APLICAÇÕES DE MONOACILGLICERÓIS ACETILADOS.....	10
3.3. SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS.....	13
3.3.1. SÍNTESE QUÍMICA DE MONOACILGLICERÓIS.....	13
3.3.1.1. Síntese Química de Monoacilgliceróis Acetilados	18
.....	
3.3.2. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE MONOACILGLICERÓIS.....	19
3.3.2.1. Interesterificação Enzimática.....	20
3.3.2.2. Lipases.....	23
3.3.2.3. Temperatura da Reação.....	25
3.3.2.4. Substratos ou Reagentes.....	27
3.3.2.5. Vácuo e Atividade de Água.....	28
3.3.2.6. Síntese Enzimática de Monoacilgliceróis Acetilados .	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. MATÉRIAS-PRIMAS.....	31
4.2. EQUIPAMENTOS.....	32

4.3. MÉTODOS.....	33
4.3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
4.3.2. TESTES PRELIMINARES.....	34
4.3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE SÍNTESE DE MGA.....	39
4.3.4. REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA.....	41
4.3.5. PURIFICAÇÃO DO MONOACILGLICEROL ACETILADO	42
4.3.6. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. TESTES PRELIMINARES.....	46
5.2. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DE MGA.....	56
5.3. REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA.....	62
5.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MONOACILGLICEROL ACETILADO	66
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXO.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Alguns materiais lipídicos aprovados para uso como cobertura comestível pela U.S. Food and Drug Administration.....	11
Tabela 2.	Variáveis e níveis de variação utilizados no desenho experimental para produção de MG acetilados por via enzimática.....	40
Tabela 3.	Planejamento experimental para produção de MG acetilados por via enzimática utilizando <i>Lipozyme TL IM</i>	40
Tabela 4.	Rendimentos das reações entre ácido oléico e triacetina na proporção 1:1,5, utilizando as enzimas <i>Lipozyme IM</i> e <i>Lipozyme RM IM</i> , após 6 horas de reação a 60°C.....	46
Tabela 5.	Rendimentos da reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina nas proporções 1:1,5 e 1:3, na presença da enzima <i>Lipozyme IM</i> (7%), após 6 horas de reação a 60°C.....	47
Tabela 6.	Rendimentos da reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em diferentes proporções na presença de <i>Lipozyme RM IM</i> (7%), a 60°C.....	48
Tabela 7.	Rendimentos da interesterificação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em diferentes proporções, na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> (7%), conduzida a 60°C.....	49
Tabela 8.	Rendimentos da interesterificação entre óleo de soja e triacetina na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> (7%), conduzida a 60°C por 8 horas.....	50
Tabela 9.	Rendimentos da interesterificação enzimática de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), conduzida a 60°C, com diferentes lipases (7%).....	51
Tabela 10.	Rendimentos de MG e DG obtidos através da interesterificação de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando diferentes concentrações de enzima <i>Lipozyme TL IM</i> .	54

Tabela 11.	Rendimentos da síntese de MGA, através de interesterificação de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima <i>Lipozyme TL IM</i> (7%).....	55
Tabela 12.	Rendimentos obtidos da otimização da reação de síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados, a partir dos substratos gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3).	57
Tabela 13.	Estimativa dos efeitos e coeficientes das regressões das variáveis rendimento de MG e relação DG/MG, da síntese de monoacilgliceróis acetilados, conforme planejamento experimental fatorial completo (2 ³).....	58
Tabela 14.	Análise de variância do modelo ajustado para a %MGA obtida por via enzimática.....	60
Tabela 15.	Análise de variância do modelo ajustado para a relação DG/MG.....	60
Tabela 16	Rendimentos das reações entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima <i>Lipozyme IM</i> (7%) em três ciclos.....	63
Tabela 17.	Rendimentos das reações entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima <i>Lipozyme RM</i> (7%) em quatro ciclos.....	64
Tabela 18.	Rendimentos obtidos da reutilização da enzima <i>Lipozyme TL IM</i> na síntese enzimática de MGA, a partir de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 65°C, na presença de 4% de enzima.....	65
Tabela 19.	Rendimentos da reação de síntese de MGA utilizando <i>Lipozyme RM IM</i> e composição do produto após destilação.....	67
Tabela 20.	Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> e após destilações para purificação do produto.....	67

Tabela 21.	Caracterização do produto da reação entre GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> após destilação.....	68
Tabela 22.	Rendimentos obtidos na reação de GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> e após destilações para purificação do produto	69
Tabela 23.	Rendimentos obtidos na reação de GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> e após destilações para purificação do produto.....	69
Tabela 24.	Rendimentos obtidos na reação de GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> e após destilações para purificação do produto.....	70
Tabela 25.	Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de <i>Lipozyme TL IM</i> e após destilações para purificação do produto.....	70
Tabela 26.	Caracterização do MGA obtido por síntese enzimática.....	72
Tabela 27.	Composição em ácidos graxos do produto MGA obtido por síntese enzimática e do produto comercial.....	73
 Anexo		
Tabela 1.	Caracterização da gordura vegetal hidrogenada (Fatgill 38).....	84
Tabela 2.	Curva de sólidos (SFC) da gordura hidrogenada Fatgill38.....	84
Tabela 3.	Caracterização da triacetina.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Formas isoméricas de monoacilgliceróis.....	4
Figura 2.	Ação da lipase pancreática.....	5
Figura 3.	Estrutura química de um monoacilglicerol acetilado.....	9
Figura 4.	Reação de glicerólise para a síntese de monoacilgliceróis.....	14
Figura 5.	Reação de hidrólise.....	14
Figura 6.	Reação de esterificação de glicerol com ácido graxo.....	15
Figura 7.	Representação esquemática das reações catalisadas por lipases	21
Figura 8.	Cromatograma HPSEC dos padrões de triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres.....	34
Figura 9.	Representação esquemática da reação de acidólise entre triacetina e ácido graxo.....	35
Figura 10.	Representação esquemática da reação de interesterificação entre triacetina e gordura vegetal hidrogenada.....	36
Figura 11.	Representação esquemática da reação de glicerólise entre gordura vegetal hidrogenada e glicerol.....	37
Figura 12.	Cromatograma HPSEC dos substratos (Triacilgliceróis = TG e Triacetina = TA) e produtos (Monoacilgliceróis Acetilados = MGA)	38
Figura 13.	Esquema de reutilização da enzima na síntese de MGA.....	42
Figura 14.	Processo de obtenção de monoacilgliceróis acetilados.....	44
Figura 15.	Síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados (MGA) com <i>Lipozyme TL IM</i> e substratos GVH e triacetina.....	56
Figura 16.	Superfícies de contorno referentes às variáveis %MGA e DG/MG	61
Figura 17.	Cromatograma do produto MGA obtido por síntese enzimática.....	71
Figura 18.	Cromatograma do padrão de monoacilglicerol acetilado (<i>Myvacet 9-45</i>).....	71
Figura 19.	Cromatograma da triacetina (TA) após destilação para purificação do monoacilglicerol acetilado obtido por via enzimática.....	72

RESUMO

Os monoacilgliceróis acetilados (MGA) são produtos de alto valor agregado utilizados em coberturas ou filmes comestíveis, gomas de mascar e produtos farmacêuticos entre outros. Esses são usualmente produzidos através de interesterificação química na presença de catalisadores ácidos ou básicos sob alta temperatura, acima de 200°C, consumindo grande quantidade de energia e produzindo compostos indesejáveis no produto. Além disso, há necessidade de se realizar uma destilação molecular para purificar o produto. A interesterificação enzimática ocorre em condições mais suaves eliminando tais problemas e o processo de purificação pode ser uma destilação simples. Este estudo apresenta um processo de obtenção de MGA via enzimática através de reação de interesterificação, e subsequente destilação. Foram realizados testes para selecionar os substratos e via de processo com ácido oléico, óleo de soja e gordura parcialmente hidrogenada de soja esterificados com triacetina em diferentes proporções. Foram testadas quatro enzimas diferentes *Lipozyme TL 100L*, *Lipozyme IM*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*. Após seleção da enzima (*Lipozyme TL IM*) e substrato (gordura parcialmente hidrogenada) foi realizada a otimização utilizando um desenho experimental fatorial completo 2^3 , totalizando 17 ensaios, sendo 3 pontos centrais e 6 axiais. As variáveis independentes foram: tempo (h), temperatura (°C) e quantidade da enzima (% em relação ao total dos substratos). As variáveis dependentes: rendimento de MGA (%) e relação diacilglicerol/monoacilglicerol, foram determinadas por HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography). A faixa ótima encontrada foi: 6 horas, 65°C e 4% de enzima em relação ao total de substratos. Nestas condições foi possível produzir MGA em concentrações até 85% após destilação. Testes de reutilização da enzima, com 0,4% de enzima nova adicionados em cada ciclo indicam que após 6 ciclos essa mantém alta atividade. O produto purificado apresentou características similares ao produto comercial.

ABSTRACT

Acetylated monoacylglycerols (AMG) are high added value products used in coatings or edible films, bubble gums, pharmaceutical products and others. They are usually produced through chemical interesterification, in the presence of acid or basic catalysts at high temperatures (above 200°C), causing high energy demands, producing undesirable by-products and requiring molecular distillation to purify the product. Enzymatic interesterification occurs in mild conditions, eliminating such problems, and the purification process can be a simple distillation. This study presents an enzymatic process to obtain AMG through the interesterification reaction and subsequent distillation. Trials were carried out to select the substrates and process path using oleic acid, soy oil and partially hydrogenated soy fat, esterified with triacetin in different proportions (1:1.5 and 1:3). Four different enzymes were tested: *Lipozyme TL 100L*, *Lipozyme IM*, *Lipozyme RM* and *Lipozyme TL IM*. After the selection of the enzyme (*Lipozyme TL IM*) and the substrate (partially hydrogenated fat), the optimization of the reaction was studied using a 2³ complete factorial experimental design, totalizing 17 assays, including 3 central and 6 axial points. The independent variables were: time (h), temperature (°C) and quantity of enzyme (% of total substrates). The dependent variables were: AMG yield (%) and diacylglycerol/monoacylglycerol ratio, analyzed through HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography). The optimal condition found was 6 hours, 65°C and 4% enzyme with respect to total substrates. Under these conditions, it was possible to produce AMG in concentrations of up to 85% after distillation. Enzyme reutilization trials, adding 0.4% new enzyme to each cycle, indicate that, after 6 cycles, high enzyme activity is maintained. The purified product presented characteristics similar to the commercial product.

1. INTRODUÇÃO

Os monoacilgliceróis são lipídios que devido a sua estrutura química, têm forte afinidade por substâncias apolares e polares, o que explica sua utilização como emulsificantes ou agentes estabilizantes em diversos produtos. São amplamente utilizados em cosméticos, detergentes e na indústria de alimentos (HOFFMANN, 1989; POUILLOUX et al., 1999). Também possuem atividade antimicrobiana e antifúngica (LEE; KIM; SHIN, 2002; RIHAKOVA et al., 2002).

Dois rotas principais são utilizadas para a produção industrial de monoacilgliceróis: ambas por síntese química. A primeira por glicerólise, isto é, a transesterificação de triacilgliceróis com glicerol, catalisada por um alcali a temperatura elevada, e a segunda, a esterificação direta de glicerol com ácidos graxos (BOSSAERT et al., 1999). Os processos e os produtos obtidos por via química apresentam algumas desvantagens e defeitos, tais como: baixo rendimento, coloração escura, sabor de queimado entre outros, sendo necessária a utilização de técnicas de purificação mais complexas e dispendiosas (BORNSCHEUER; YAMANE, 1995; BOSSAERT et al., 1999).

Algumas pesquisas têm se direcionado na substituição da interesterificação química pela interesterificação enzimática, devido às vantagens inerentes associadas ao processo enzimático. As reações enzimáticas são mais específicas, requerem condições menos severas, apresentam menores perdas, contribuem menos na poluição ambiental, os produtos obtidos são considerados “naturais”, oferecem grande controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e região especificidade das lipases (WILLIS; MARANGONI, 1998; XU et al., 1999).

Além disso, enzimas podem ser imobilizadas e reutilizadas, podendo tornar os processos viáveis do ponto de vista comercial (AKOH, 1995; WILLIS; MARANGONI, 1998).

A obtenção de monoacilgliceróis através de síntese enzimática tem sido proposta, seja pela interesterificação de triacilgliceróis ou ácidos graxos com glicerol, catalisada por lipases (MURKHERJEE, 1995). A síntese enzimática pode produzir monoacilgliceróis e diacilgliceróis acetilados, com ou sem solventes, dependendo do substrato e da enzima empregados (KURO; PARKIN, 1995).

Os monoacilgliceróis esterificados com ácido acético são denominados de monoacilgliceróis acetilados, possuindo aplicações diversas como: emulsificantes em gomas de mascar (MIKKELSEN, 2000), isolados ou em conjunto com proteínas do soro de leite em filmes comestíveis para coberturas (STUCHELL; KROCHTA, 1995; AVENA-BUSTILLOS, KROCHTA; SALVEIT, 1997; MATE; KROCHTA, 1997), e como veículos de formulações farmacêuticas e veterinárias (KOMMURU et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de monoacilgliceróis acetilados através de interesterificação enzimática de triacilgliceróis com triacetina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar enzimas para a síntese de monoacilgliceróis acetilados (MGA).
- Otimizar a produção via enzimática de MGA.
- Purificar o MGA produzido.
- Determinar a vida útil da lipase utilizada (reutilização).
- Caracterizar o MGA purificado e comparar com o produto comercial padrão produzido por via química (*Myvacet 9-45*).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MONOACILGLICERÓIS

Os monoacilgliceróis (MG) consistem de uma molécula de glicerol esterificada a uma única cadeia de ácido graxo deixando dois grupos hidroxila livres. A principal característica é que são substâncias anfifílicas, tendo grande afinidade por substâncias polares, devido aos grupos hidroxila livres que lhes conferem características hidrofílicas e, pelas apolares, devido à cadeia acil que confere características lipofílicas (HOFFMANN, 1989; BOYLE, 1997; BOSSAERT et al., 1999).

A cadeia de ácido graxo pode ser esterificada a qualquer um dos três grupos hidroxila da molécula do glicerol. A absorção, o metabolismo e outras reações químicas e bioquímicas são dependentes da especificidade posicional do monoacilglicerol (BOYLE, 1997). A Figura 1 apresenta as duas formas isoméricas dos monoacilgliceróis.

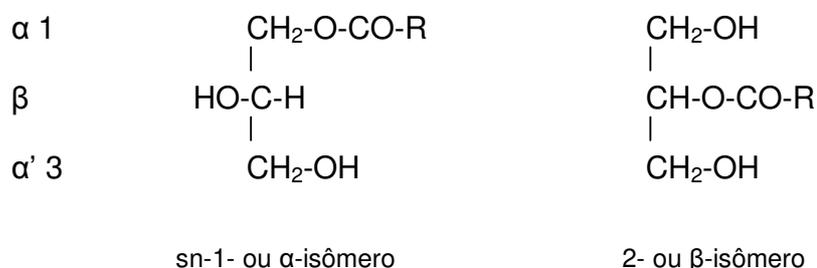


Figura 1. Formas isoméricas de monoacilgliceróis.

Mono e diacilgliceróis (DG) são componentes minoritários presentes nos óleos e gorduras. Entretanto, são importantes intermediários na biossíntese e catabolismo de triacilgliceróis (TG) e outras classes de lipídios. *In vivo* podem ser considerados como traços da síntese biológica incompleta dos triacilgliceróis, ou como sinal da hidrólise química ou enzimática na deterioração de produtos

gordurosos (HOFFMANN, 1989; BOYLE, 1997; GUNSTONE, 1997; BOSSAERT et al., 1999).

Durante a digestão de lipídios ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis catalisada pela lipase pancreática gerando ácidos graxos e monoacilgliceróis, como representado na Figura 2. Estes são absorvidos pela parede interna do intestino delgado e reconvertidos em novas moléculas de triacilgliceróis, que são empacotadas junto a outras substâncias lipossolúveis absorvidas na dieta, com uma cobertura de proteínas e fosfolipídios, formando os quilomicrons e sendo assim, transportados pela corrente sanguínea, até completar a absorção dos lipídios (GURR, 1997).

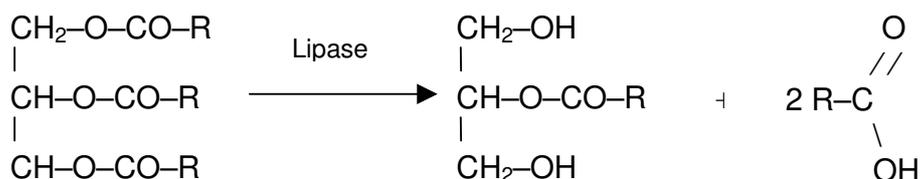


Figura 2. Ação da lipase pancreática.

3.1.1. APLICAÇÕES DOS MONOACILGLICERÓIS

Dentre os emulsificantes, os monoacilgliceróis são os mais importantes do ponto de vista econômico e funcional, representando aproximadamente 75% da produção total, incluindo os mono e diacilgliceróis, monoacilgliceróis destilados e seus ésteres de ácidos orgânicos (KROG, 1997).

O consumo europeu de monoésteres de ácidos graxos em 2003 foi estimado em 100 mil ton/ano, utilizados principalmente na indústria de alimentos como agentes surfactantes e emulsificantes (PÉREZ-PARIENTE et al., 2003).

A primeira patente (U.S.) para utilização de MG e DG foi registrada em 1933. Essa patente descreve seu uso em emulsões e margarinas, depois os

monoacilgliceróis foram patenteados para uso em “shortenings” para bolos e pães (HARRIS, 1933 apud BIRNBAUM, 1981).

Os monoacilgliceróis utilizados comercialmente são sintéticos, sendo preparados em larga escala para uso como agentes ativos de superfície em cosméticos, detergentes, nas indústrias de alimentos, química e farmacêutica (GUNSTONE, 1997; POUILLOUX et al., 1999; MACIERZANKA; SZELAG, 2004).

Todos os emulsificantes alimentícios são regulamentados pelas autoridades de saúde de cada país e são avaliados pelo Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) da Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (KROG, 1997). Os monoacilgliceróis são classificados como geralmente seguros ou GRAS e, dependendo do ácido graxo, apresentam-se no estado líquido ou sólido a temperatura ambiente (HOFFMANN, 1989; BOYLE, 1997).

Os monoacilgliceróis são utilizados na indústria de alimentos como emulsificantes e agentes estabilizantes em diversos produtos como cremes, margarinas (MIURA; YAMAMOTO; KONISHI, 2002), maionese, sorvetes, bolos, (BOYLE, 1997), chocolates, caramelos (SECTZER, 2001) e gomas de mascar (MIKKELSEN, 2000).

Os emulsificantes promovem a formação e estabilidade de uma emulsão (SECTZER, 2001). Sendo os alimentos sistemas coloidais muito complexos, podem ocorrer mudanças durante a estocagem, resultando na deterioração da aparência e textura, e perda de características de sabor, para prevenir ou eliminar esses problemas são utilizados os emulsificantes (KROG, 1997).

Os monoacilgliceróis são principalmente empregados como estabilizantes de emulsões água em óleo (A/O), onde o seu uso industrial se justifica devido a grande gama de BHL's (balanço hidrofílico/lipofílico) acessíveis (BANCQUART et al., 2001; MACIERZANKA; SZELAG, 2004).

O BHL é utilizado para classificar os emulsificantes, em uma faixa de valores de a 0 a 20. Essa escala indica uma maior atração do emulsificante por óleo ou água. Um valor baixo de BHL indica um emulsificante fortemente lipofílico, enquanto um BHL alto indica um emulsificante fortemente hidrofílico (HEGENBART, 1995).

Os monoacilgliceróis de diferentes comprimentos de cadeia apresentam diferentes propriedades, possuem diferentes valores BHL, diferentes funções biológicas e tem aplicações industriais específicas (LEE et al., 2004). O emprego dos monoacilgliceróis depende de uma série de parâmetros, incluindo pureza química e estrutural, especificidade posicional e grupamento acil, estado cristalino e interação com água (BOYLE, 1997).

A associação dos monoacilgliceróis com água resulta na formação de estruturas físicas diferenciadas chamadas mesofases, que possuem características de dois estados físicos simultaneamente (cristais, fluido isotrópico, lamelar, gel, cúbica e hexagonal). A formação e o comportamento das mesofases dependem de vários fatores: concentração de água, concentração de monoacilgliceróis e sua composição em ácidos graxos, temperatura, agitação e presença de outras moléculas no sistema (RIKE VITAMIN, 2007).

Devido ao polimorfismo e similaridade com os triacilgliceróis, os monoacilgliceróis podem ser utilizados como extensores de gorduras, com aplicações em produtos de baixo teor lipídico como margarinas e molhos “light” para saladas (MCNEILL; SONNET, 1995; KROG, 1997). Os monoacilgliceróis inibem a formação e crescimento de cristais indesejáveis e fornecem melhores características de fusão, quando comparados com substitutos de gordura de origem não lipídica (KROG, 1997; GUNSTONE, 1997).

Em produtos extrudados e de panificação, os mono e diacilgliceróis são utilizados em combinação com amido. Com a complexação, amido-monoacilgliceróis, ocorrem modificações nas cadeias da amilose e da

amilopectina, retardando a retrogradação, fornecendo em geral, melhores características de processamento. (SECTZER, 2001).

A encapsulação de sabores é outra possibilidade para a utilização de monoacilgliceróis. Podem ser desenvolvidos sistemas para proteger ou minimizar perda de sabor via degradação térmica ou evaporação (BOYLE, 1997).

Os monoacilgliceróis também podem ser utilizados na reação de síntese de lipídios estruturados, onde são incorporados AG específicos em uma posição definida da molécula de triacilgliceróis, por exemplo, 2-monoacilglicerol contendo um AG essencial, pode ser incorporado na posição 2 através de esterificação do MG com ácido caprílico na presença de lipase (SOUMANOU et al., 1998).

Alguns monoacilgliceróis apresentam atividade antimicrobiana, quando utilizados em conjunto com ácido linoléico, possuem atividade contra *B. cereus* e *S. aureus*. Monoacilgliceróis de ácidos graxos de cadeia curta com 3-10 carbonos têm uma capacidade de emulsificação fraca, mas têm efeito antimicrobiano, provavelmente devido à habilidade de romperem as membranas de células bacterianas, causando lise das células e desnaturação de núcleos ou proteínas, prevenindo o crescimento microbiano (LEE; KIM; SHIN, 2002). Também foi encontrado que monoacilgliceróis obtidos a partir de óleo de coco possuem atividade antifúngica sobre *Aspergillus niger* (RIHAKOVA et al., 2002).

Além dos alimentos, os monoacilgliceróis podem ser utilizados em diversos produtos, especialmente em preparações cosméticas, em produtos para cabelos e pele, tais como loções e cremes bronzeadores (HARTMAN, 1968; BOYLE, 1997). Também são utilizados na indústria farmacêutica, na síntese de medicamentos, aumentando a permeabilidade da pele, facilitando a absorção de drogas (BOSSAERT et al., 1999). Ao contrário dos tensoativos iônicos, os monoacilgliceróis podem ser ingeridos por humanos, não apresentando efeitos secundários ou irritações cutâneas (MACHADO et al., 2003).

graxo do monoacilglicerol (PARK; CHINNAN, 1995). O *Myvacet 9-45* é um monoacilglicerol diacetilado de ácido graxo C-18 (KOMURU et al., 2001).

3.2.1. APLICAÇÕES DE MONOACILGLICERÓIS ACETILADOS

Os monoacilgliceróis acetilados são produtos que apresentam grande extensibilidade e são utilizados em filmes ou coberturas para prevenir a deterioração da qualidade por oxidação ou migração de umidade. Também são utilizados como agentes aglutinantes e antiespumantes, lubrificantes, agentes de liberação de sabor (KUO; PARKIN, 1995), solventes e plastificantes para gomas de mascar (RIKEN VITAMIN, 2007).

- **Coberturas e filmes comestíveis**

As coberturas ou filmes são camadas finas de material de textura plástica não gordurosa aplicada à superfície do produto para envolver e aumentar a vida útil do produto (AVENA-BUSTILLOS; KROCHTA; SALVEIT, 1997; BOYLE, 1997).

Os filmes comestíveis compreendem três categorias de materiais: polissacarídios, proteínas e lipídios. Os dois maiores grupos de materiais lipídicos para coberturas comestíveis são as ceras e os glicerídios parciais de ácidos graxos. Os monoacilgliceróis são barreiras mais eficientes à umidade e algumas vezes barreiras a gases. De interesse particular como coberturas são os MGA de cadeia longa. Os MGA destilados formam filmes flexíveis à temperatura ambiente e retém esta flexibilidade a baixas temperaturas (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997).

Entre as vantagens dos filmes de MGA destacam-se a hidrofobicidade maior que as coberturas de proteína isolada de soro e a permeabilidade ao oxigênio, similar a apresentada pelo polietileno de baixa densidade. Além disso, não sofrem encolhimento sob a superfície do produto e, são mais homogêneos quanto a irregularidades da superfície do produto (MATE; KROCHTA, 1997).

A Tabela 1 apresenta alguns materiais aprovados pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para uso como coberturas comestíveis, sua aplicação, e limites de uso no Code of Federal Regulations (CFR) (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997).

Tabela 1. Alguns materiais lipídicos aprovados para uso como coberturas comestíveis pela U.S. Food and Drug Administration.

Material (citação CFR)	Usos e limitações
Monoacilgliceróis acetilados (21.172.828)	Usados a um nível não excessivo da quantidade requerida para produzir o efeito desejado no alimento, no processamento do alimento, embalagem, ou estocagem.
Mono- e di-glicerídios (21.184.1505)	GRAS
Ésteres de ácidos graxos de sacarose (21.172.859)	Como componentes de coberturas protetoras aplicadas a maçãs frescas, abacates, bananas, limas, melões, mamão, pêssego, pêras, abacaxis e ameixas para retardar o amadurecimento e deterioração. Este material é usado de acordo com boas práticas de fabricação e numa quantidade não superior à requerida para atingir o efeito requerido.

Fonte: Adaptado de SHELLHAMMER e KROCHTA , 1997.

Os filmes ou coberturas comestíveis de monoacilgliceróis acetilados atuam como barreiras protetoras contra a oxidação em nozes ou amêndoas, principal defeito durante a estocagem (MATE; KROCHTA, 1997; SECTZER, 2001).

Também atuam como barreira contra perda de umidade em frutas e vegetais minimamente processados (BIRBAUM, 1981; BOYLE, 1997). Em pedaços de aipo, uma cobertura de caseinato de cálcio e monoacilglicerol acetilado reduziu 75% a perda de umidade (AVENA-BUSTILLOS; KROCHTA; SALVEIT, 1997).

Em uvas passas cobertas ou não com chocolate, os MGA retardam a evaporação de água do produto e previnem o endurecimento (SECTZER, 2001), além de melhorar a aparência do produto pelo acabamento brilhante na cobertura (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997).

Konopacka e Plochanski (2002) estudaram as propriedades de adsorção de chips de maçã sob várias condições de umidade e temperatura, e examinaram a possibilidade de usar MGA como uma superfície de barreira ao vapor d'água do meio ambiente. A aplicação de MGA diminuiu significativamente a quantidade de vapor d'água adsorvido.

Os monoacilgliceróis acetilados também podem ser utilizados em coberturas de balas duras em combinação com zeína de milho, que é capaz de resistir à transferência de umidade e migração de óleo, além de fornecer brilho. Os MGA têm sido patenteados como coberturas para prevenção de perda de umidade em carnes congeladas ou refrigeradas, onde as mudanças *pós-mortem* resultam na desidratação das proteínas e queima pelo frio (SHELLHAMMER; KROCHTA, 1997). Os MGA também foram utilizados em filmes comestíveis associados a proteínas isoladas do soro de leite reduzindo a perda de umidade e a oxidação em salmão congelado (STUCHELL; KROCHTA, 1995).

- **Outras aplicações de MGA**

Monoacilgliceróis que não formam filmes em função do ponto de fusão do MG de origem podem ser utilizados como lubrificantes de grau alimentício, prevenindo a aderência e estendendo a vida útil de equipamentos (BIRBAUM, 1981; SECTZER, 2001). Também podem ser utilizados em uma ampla variedade de produtos de confeitaria, diluídos ou misturados com gorduras especiais, como agentes de liberação de aroma (SECTZER, 2001), ou como substitutos de gordura em alimentos "light" (MORRIS, 1991).

Os monoacilgliceróis acetilados podem ser empregados como agentes aglutinantes na fabricação de pós para gelatinas e pudins e, como plastificantes em bases para gomas de mascar (BIRBAUM, 1981; SECTZER, 2001).

Outra aplicação importante dos monoacilgliceróis acetilados é como veículo para drogas em formulações farmacêuticas e veterinárias. Kommuru et al. (2001) utilizaram um monoacilglicerol acetilado em SEDDS (self-emulsifying drug delivery

systems) de coenzima Q10. Os autores desenvolveram uma formulação otimizada para biodisponibilidade em cães, sugerindo que estes sistemas possam ser utilizados para melhorar a absorção oral de drogas lipofílicas. O *Myvacet 9-45* melhorou a absorção linfática promovendo a síntese de lipoproteínas e subsequente absorção, concluindo que os MGA melhoram o carregamento de compostos lipofílicos como CoQ₁₀ pela rota oral.

3.3. SÍNTESE DE MONOACILGLICERÓIS

3.3.1. SÍNTESE QUÍMICA DE MONOACILGLICERÓIS

Os monoacilgliceróis são conhecidos há mais de cem anos. M. Bertholet sintetizou-os a partir de ácidos graxos comuns, como ácido esteárico e oléico entre outros, por aquecimento em excesso de glicerol, mas os produtos obtidos não eram puros. A primeira síntese segura foi reportada por Emil Fischer, em 1920 (HARTMAN, 1968; BIRNBAUM, 1981).

A produção industrial de monoacilgliceróis teve início nos anos 30, para uso na produção de margarinas, sendo realizada por glicerólise de gorduras ou por esterificação de glicerol com ácidos graxos. Dependendo da relação glicerol/gordura, o conteúdo de MG após glicerólise pode variar de 10% a 60%. MG-DG comerciais geralmente contém 45-55% de monoacilgliceróis, 38-45% de diacilgliceróis, e 8-12% de triacilgliceróis (KROG, 1997).

Os três processos de síntese química são a glicerólise (Figura 4), a hidrólise de triacilgliceróis (Figura 5) e a esterificação direta de glicerol com ácidos graxos (Figura 6), utilizando catalisadores inorgânicos (SAKIYAMA et al., 2001a). Todos os processos são realizados a altas temperaturas (200-250°C) para aumentar a solubilidade das fases reagentes imiscíveis (WILLIS; MARANGONI, 1998; BOSSAERT et al., 1999; SAKIYAMA et al., 2001a). Um processo alternativo

para obtenção de monoacilgliceróis é por transesterificação de glicerol e ésteres metílicos (BANCQUART et al., 2001).

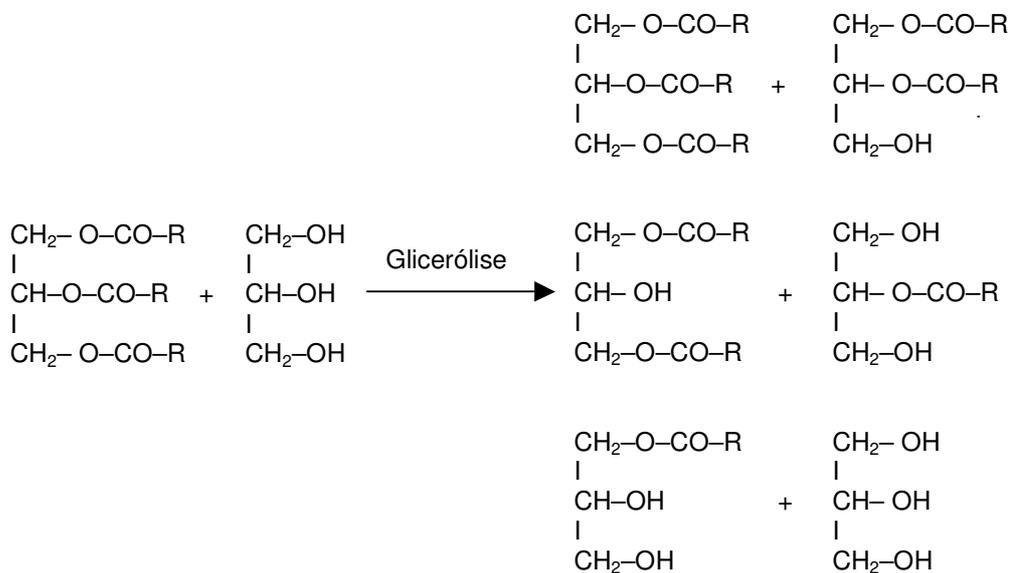


Figura 4. Reação de glicerólise para a síntese de monoacilgliceróis.

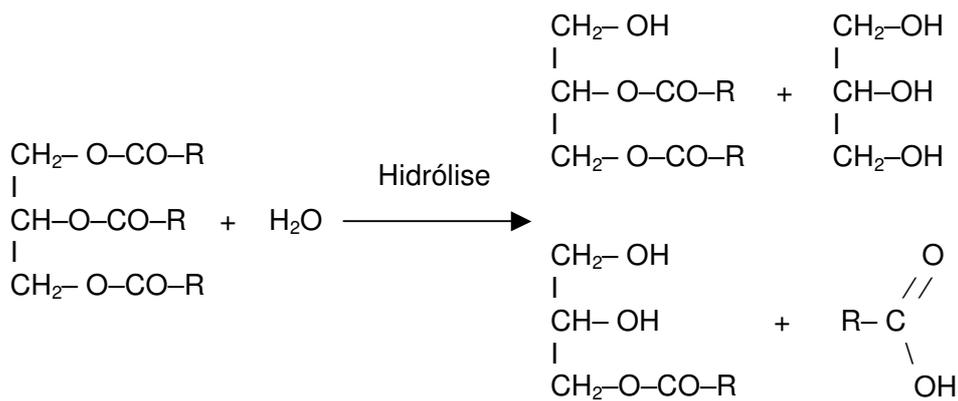


Figura 5. Reação de hidrólise.

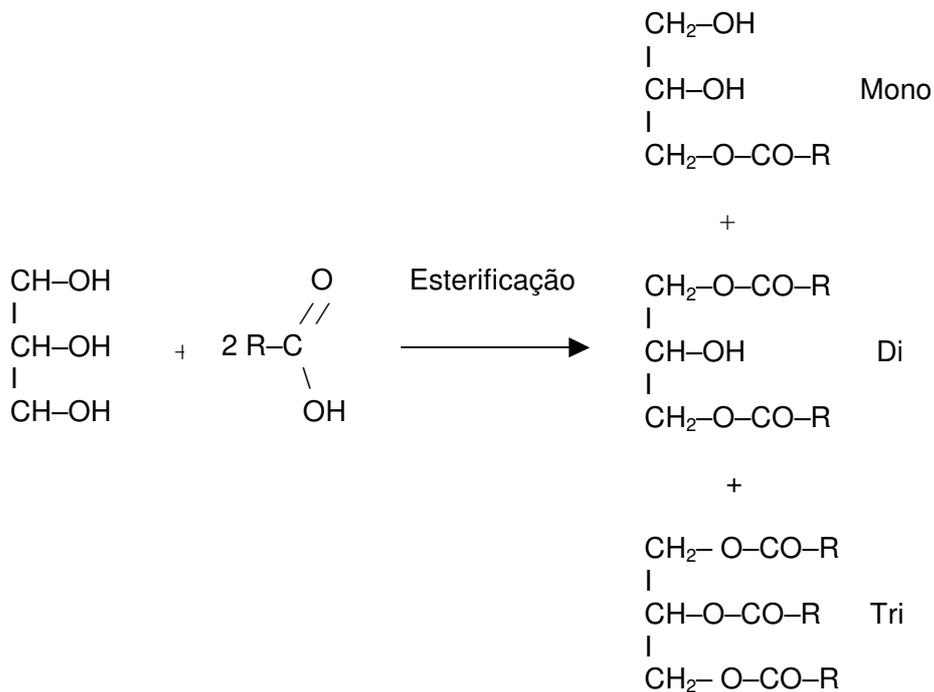


Figura 6. Reação de esterificação de glicerol com ácido graxo.

O processo químico tem rendimento médio de apenas 40-60% de MG, sendo 35-45% de DG e o restante TG e glicerol. Como as propriedades emulsificantes dos DG's são pobres, faz-se necessário um processo de purificação de MG para aproximadamente 90-95%. A destilação molecular a alto vácuo tem sido utilizada para obter produto com um alto teor de MG, normalmente 95% (PÉREZ-PARIENTE et al., 2003).

Os processos químicos consomem muita energia devido à alta temperatura necessária para a síntese e a destilação requerida para obter o produto purificado (ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999).

A utilização de temperaturas altas de reação, normalmente acima de 250°C, tem como consequência indesejável a deterioração das propriedades físicas do produto, como alterações da cor e sabor dos produtos (PÉREZ-PARIENTE et al., 2003).

Os monoacilgliceróis podem ser produzidos por batelada ou processo contínuo. Após a reação o produto obtido é resfriado, o catalisador inativado pela adição de um ácido alimentar, sendo removido por filtração. O excesso de glicerol é separado como uma camada inferior sob resfriamento, é decantado e o glicerol remanescente removido por destilação à vácuo. A mistura de MG-DG com coloração escura é desodorizada com vapor (BIRNBAUN, 1981).

Seria possível aumentar o rendimento utilizando um excesso de glicerol na mistura inicial para deslocar o equilíbrio da reação. Entretanto, isto tem sido um efeito limitante na glicerólise, devido à baixa solubilidade do glicerol na fase lipídica, a qual força um aumento da temperatura da reação (McNEILL; YAMANE, 1991; KROG, 1997; PÉREZ-PARIENTE et al., 2003).

Técnicas para purificação ou destilação de monoacilgliceróis são limitadas para aplicações em alimentos (BOSSAERT et al., 1999). A destilação molecular é um caso especial de destilação por evaporação na qual um composto no estado líquido evapora em baixo ponto de ebulição, porque o alto vácuo remove o efeito da pressão atmosférica externa. Sob estas condições, moléculas de MG necessitam somente de uma energia mínima para passar do seu estado líquido para a fase de vapor, deixando moléculas de di e triacilgliceróis no resíduo (BIRNBAUN, 1981).

O conteúdo total de MG dos produtos destilados comerciais é 93-97%, com o conteúdo de 1-monoéster sendo pelo menos de 90% (KROG, 1997). Fregolete et al (2005) obtiveram um produto de pureza 96,3% utilizando metodologia de superfície de resposta para otimizar a destilação molecular de um produto comercial produzido por via química, inicialmente com 10,8% TG, 37,7% DG, 43,6% MG, 0,7% AGL e 7,2% glicerol (GL).

Devido ao grande consumo mundial de monoacilgliceróis e seus derivados, uma atenção considerável tem sido dada ao melhoramento dos métodos de síntese (McNEILL; YAMANE, 1991). Pesquisas recentes têm utilizado vários

catalisadores ácidos, básicos e outros para aumentar a seletividade e rendimento da síntese química.

A esterificação é comumente catalisada por um ácido, por exemplo o ácido sulfúrico ou sulfônico e a glicerólise por hidróxidos alcalinos como NaOH, KOH ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sais de sódio de baixo peso molecular e álcoois, como metanol e etanol. Pode-se estimar que aproximadamente 80% dos processos de fabricação utilizam ácidos como catalisadores (PÉREZ-PARIENTE et al., 2003). A reação de esterificação direta também ser realizada na presença de materiais porosos, como resinas de troca iônica e zeolites (MACIERZANKA; SZELAG, 2004).

Bossaert et al. (1999) sintetizaram um monoacilglicerol via esterificação direta de glicerol com ácido láurico em quantidade equimolar, usando como catalisadores materiais mesoporosos sulfônicos, resinas sulfônicas e zeolitas, obtendo-se rendimentos de monoacilgliceróis entre 36 e 53 %.

Pouilloux et al. (1999) sintetizaram monoacilgliceróis a partir de esterificação de glicerol e ácidos graxos na presença de resina de troca-iônica, investigando as diferentes maneiras de aumentar a seletividade de monoacilgliceróis. Os autores concluíram que a água tem um efeito inibidor na reação, devido à estrutura do poro do catalisador; hidrocarbonetos de cadeia longa dos ácidos graxos influenciaram a atividade e seletividade da reação e, o excesso de glicerol aumentou a seletividade dos monoacilgliceróis, mas diminuiu a atividade e foi considerado como um inibidor seletivo.

Lin, Chuah e Jaenicke (1999) utilizaram uma base-funcionalizada MCM-41, como catalisador para síntese de monoacilgliceróis. O catalisador foi ativado com bases amino ou grupos amino livres para facilitar a síntese de monoacilgliceróis a partir de glicerol e ácidos graxos. Os autores obtiveram um ótimo rendimento, 95% em 8 horas e o catalisador foi reutilizado várias vezes com pequena perda de atividade.

Zeolitas também têm sido empregadas como catalisadores ativos e seletivos para síntese de MG. Suas vantagens são: fácil regeneração e separação dos produtos líquidos, não exibem toxicidade, não são corrosivas e não causam poluição ambiental. Outro importante aspecto que caracteriza os catalisadores zeolíticos é a possibilidade de alta seletividade devido a sua estrutura (MACHADO et al., 2003).

Macierzanka e Szelag (2004) estudaram a síntese de emulsificantes acilgliceróis com propriedades hidrofóbicas modificadas através de esterificação de glicerol com quatro carboxilatos de zinco de ácidos graxos (C 12:0, C14:0, C 16:0 e C18:0), mas a concentração máxima de MG na reação não excedeu 50%.

Yu et al. (2003) sintetizaram glicerol monoestearato com alta pureza em três etapas: proteção de glicerol com acetona, transesterificação e deproteção, obtendo um produto de alta pureza e rendimento de 92%.

3.3.1.1. Síntese Química de Monoacilgliceróis Acetilados

Apesar de terem sido encontrados vários estudos da síntese de monoacilgliceróis, existem poucos trabalhos e nenhuma patente sobre síntese via química de monoacilgliceróis acetilados. Usualmente são produzidos pela acetilação de MG com anidrido acético, por transesterificação de glicerídeos parciais com triacetina (BIRBAUM, 1981) ou por interesterificação e subsequente destilação molecular de triacilgliceróis, triacetina e glicerina (MORRIS, 1991).

Um estudo sobre glicerólise de óleos de peixes marinhos (salmão rosa, arenque, sardinha, atum e outros) para obter α -monoacilgliceróis acetilados foi descrito por Gruger, Mallins e Gauglitz em 1960. Os MGA produzidos têm como vantagem a presença de AG de cadeias longas e alto grau de insaturação, obtendo-se um produto de coloração suave e livre de odor. Os autores realizaram uma reação de acetilação, com rendimento quantitativo e ligeiras perdas de

insaturação. Na purificação do produto foi utilizada a destilação molecular. Como conclusão o tempo ótimo para a glicerólise foi de 45 a 60 minutos, dependendo do tipo do óleo marinho empregado. O método mostrou-se apropriado para preparação em maior escala.

3.3.2. SÍNTESE ENZIMÁTICA DE MONOACILGLICERÓIS

Devido às desvantagens já mencionadas da síntese química, é de interesse o uso da síntese enzimática de monoacilgliceróis, a qual é realizada a temperaturas mais baixas quando um produto de melhor qualidade é exigido (SAKIYAMA et al., 2001b).

Foram patenteados alguns processos de produção enzimática de monoacilgliceróis:

- Monoacilgliceróis contendo ácidos graxos insaturados omega-3 (US5935828), o processo envolve uma transesterificação catalisada por lipase de triacilglicerídios, seguida por cristalização à baixa temperatura;

- Produção de MG de alta pureza por transesterificação catalisada por lipase: óleos ou TG puros são combinados com álcool, uma pequena quantidade de água e uma lipase, a reação sob condições amenas produz alto rendimento de β -monoacilgliceróis (US5316927);

- Método para produzir seletivamente monoacilgliceróis utilizando enzimas (KR2002048464-A) através de reação de troca de éster entre glicerina e um composto éster de ácido graxo em um solvente orgânico. O composto éster é metil ou etil éster de ácido graxo; o solvente pode ser 1,4-dioxano, tetrahidrofurano ou acetona. A glicerina e o éster de ácido graxo reagem na relação de 1:1 a 1:9, a 15 a 60 °C por 10 a 48 horas.

Na literatura têm sido descritos vários sistemas para reação enzimática, como micela reversa, microemulsões, sistemas bifásicos água-orgânico, utilizando solventes orgânicos e no estado sólido, na ausência de solvente, utilizando enzima imobilizada ou enzima livre (BORNSCHEUER; YAMANE, 1995; ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999; MACIERZANKA; SZELAG, 2004).

3.3.2.1. Interesterificação Enzimática

A interesterificação é um processo de modificação de óleos e gorduras, na qual os ácidos graxos permanecem inalterados e são redistribuídos na molécula de glicerol, resultando em modificações nas propriedades físico-químicas, tais como ponto de fusão e comportamento de cristalização, sem alteração na estabilidade (ROZENALL, 1992).

Em óleos e gorduras naturais, os grupos acil são distribuídos de maneira não randômica. Durante a interesterificação química, os grupos acil são distribuídos primeiro intramolecularmente, e depois intermolecularmente, até a obtenção de uma distribuição randômica. Na interesterificação enzimática por ser não randômica, obtém-se um maior controle da composição do produto final e misturas de acilglicerídios que não são obtidas pela via química (WILLIS; MANGONI, 1998). As reações catalisadas por lipases estão representadas na Figura 7.

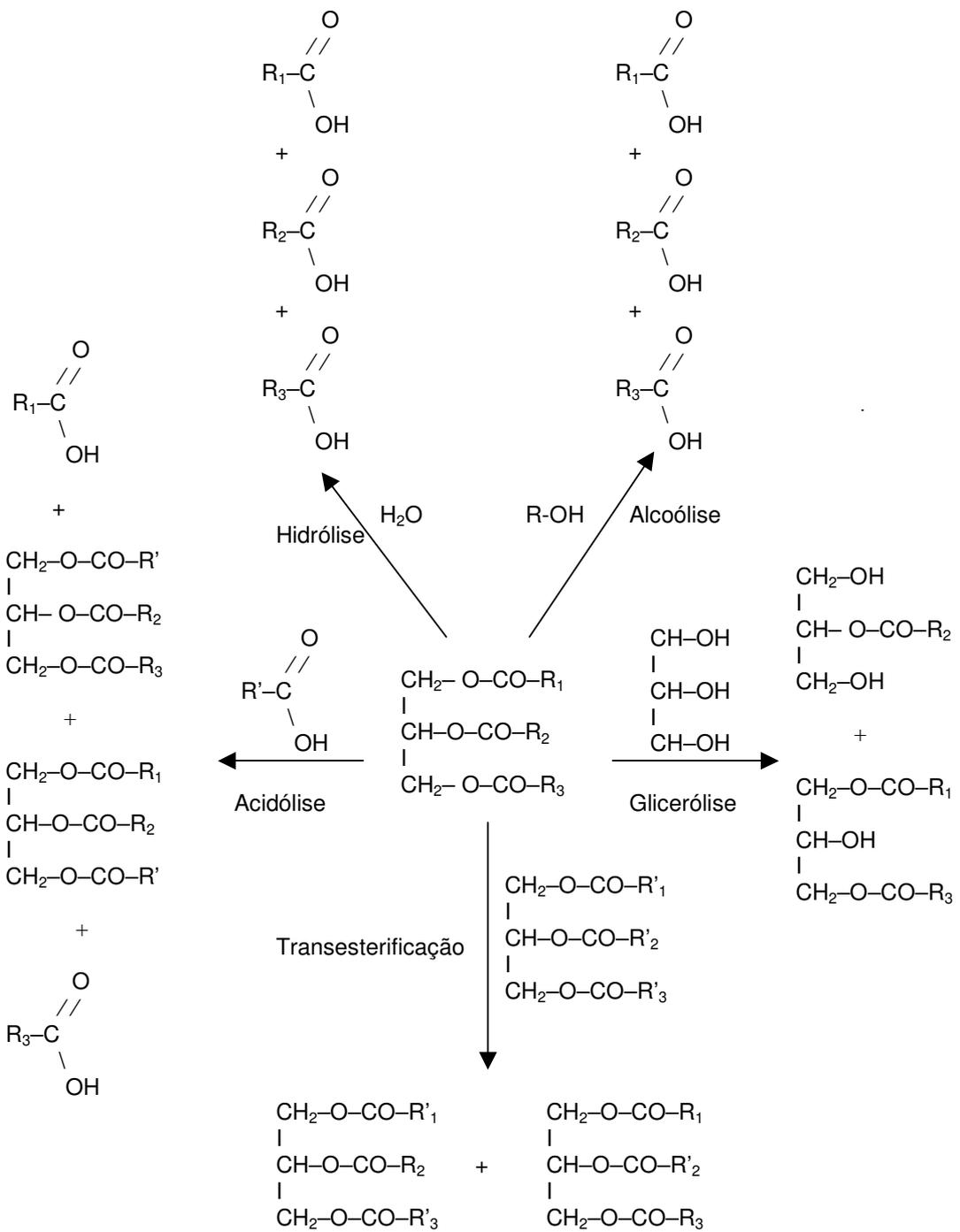


Figura 7. Representação esquemática das reações catalisadas por lipases.

As vantagens da síntese enzimática sobre a glicerólise química tradicional são: a reação enzimática ocorre sob condições suaves, minimizando reações paralelas, são mais específicas, ocorrem menos perdas, podem ser consideradas reações de produtos “naturais”, redução da poluição ambiental, disponibilidade de lipases de várias fontes, grande controle sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos no produto final, devido à seletividade e regioespecificidade das lipases, e a dispendiosa destilação molecular do método químico pode ser substituída por um procedimento mais simples como uma filtração/cristalização ou uma destilação simples (MORRIS, 1991; WILLIS; MARANGONI, 1998; XU et al., 1999).

A glicerólise enzimática de óleos e gorduras naturais oferece além a vantagem de que a gordura pode ser usada sem tratamento prévio. Assim, 1 mol de TG e 2 moles de glicerol podem fornecer 3 moles de MG (ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999; SAKIYAMA et al., 2001a).

A glicerólise enzimática tem um rendimento de equilíbrio de aproximadamente 25-35%, porém um alto rendimento final tem sido alcançado em processos onde o MG é removido da reação. Na glicerólise em fase sólida, a temperatura de reação é reduzida após um certo tempo e o MG começa a cristalizar diretamente no reator. Rendimentos finais de 50-95% têm sido reportados com este método, podendo ser alcançado um rendimento final de 95-98% utilizando um sistema com um reator e um vaso de resfriamento para cristalização, circulando a mistura entre os dois vasos (ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999).

Muitos fatores afetam a síntese enzimática de MG, incluindo o tipo de enzima, métodos de imobilização, meio de reação (solventes orgânicos e fluido supercrítico), temperatura, pH, atividade de água e doadores e receptores acil (LEE et al., 2004).

3.3.2.2. Lipases

As lipases são enzimas obtidas predominantemente de bactérias, leveduras e fungos, definidas como hidrolase éster glicerol, pois catalisam a hidrólise das pontes carboxil éster nos acilglicerois (WILLIS; MARANGONI, 1998).

Desde a década de 80, tem sido dispensada grande atenção à utilização de enzimas para modificar componentes lipídicos, sendo a aplicação mais importante da enzimologia em meio microaquoso a transformação ou reestruturação de triacilgliceróis (MACRAE, 1985).

Lipases de animais, vegetais e microrganismos catalisam a hidrólise parcial ou total de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, glicerídios parciais e glicerol na presença de água em excesso (PASTORE; PARK 1993). É também conhecido que lipases realizam a reação inversa sob condições controladas de atividade de água, deslocando a reação para a síntese de ésteres (MACRAE, 1985; JAEGER et al., 1994).

Lipases são conhecidas como catalisadores de reações de esterificação em condições brandas, tem alta eficiência catalítica, e seletividade inerente, possibilitando um direcionamento para formação de compostos específicos, muito puros, fáceis de isolar sem necessidade de destilação molecular (PASTORE; PARK, 1993, YESILOGU; KILIC, 2004).

Devido às enzimas serem ativas cataliticamente e altamente específicas em temperaturas relativamente baixas, a qualidade dos MG produzidos com lipases é superior a dos MG sintetizados quimicamente (McNEILL, BOROWITZ; BERGER, 1992).

As dificuldades associadas com o controle e com o aumento de escala, bem como o alto custo das lipases, têm restringido seu uso industrial como catalisador de modificação de alimentos lipídicos (XU et al, 1998; WILLIS;

MARANGONI, 1999), embora a imobilização e reutilização de enzimas imobilizadas devam tornar os processos viáveis sob os pontos de vista comercial e econômico (AKOH, 1995). Para diminuir os custos de produção, as lipases são imobilizadas com métodos e suportes adequados para garantir a estabilidade do processo (LEE; AKOH, 1998).

Em reatores contínuos, como o substrato entra em contato com grandes quantidades de enzima, o tempo de reação é menor quando comparado ao reator descontínuo. O processamento contínuo também permite a reutilização da enzima imobilizada e a redução de custos (MU; XU; HOY, 1998).

McNeill e Yamane (1991) estudaram diferentes lipases comerciais na glicerólise enzimática a 42°C para produção de monoacilgliceróis. Os autores encontraram um rendimento de 70% para lipase *Pseudomonas sp*, as lipases de *Geotrichum candidum*, *Penicillium camembertii* e *Candida rugosa* foram inativas, e a mistura de lipases de *Penicillium camembertii* e *Humicola lanuginosa* foi mais eficiente que as enzimas isoladas, obtendo-se um rendimento de 70% na produção de monoacilglicerol.

Soumanou et al. (1998) utilizaram lipases 1,3-regioespecíficas na hidrólise de triacilgliceróis a AGL e 2-monoacilglicerol em meio aquoso, com baixo rendimento de 2-MG, devido à rápida isomerização de 2-MG em 1-MG por migração acil não enzimática. Na reação de alcoólise em solvente apropriado com controle de atividade de água, obtiveram 2-MG isomericamente puro e ésteres de AG.

Yesilogu e Kilic (2004) utilizaram lipase *C. rugosa* e lipase pancreática porcina, concluindo que acilglicerídios de glicerol e ácido oléico podem ser sintetizados facilmente e os MG e DG foram os produtos formados em maior proporção. Com lipase de *C. rugosa*, quantidades similares de MG e DG foram produzidas durante as primeiras 12 horas da reação. Até 24 horas, as concentrações de MG, DG, e TG foram 22,3, 39,6 e 17,1%, respectivamente. Com

a lipase pancreática porcina, por 24 horas, as concentrações de MG, DG e TG foram 32,1, 39,3 e 11,7% respectivamente (YESILOGU; KILIC, 2004).

LEE et al (2004) testaram a lipase de *Pseudomonas* na alcoólise de TG de cadeia curta com etanol e isopropanol, podendo ser usada para a produção de MG de cadeia curta. O rendimento em MG é dependente das condições da reação, assim como do comprimento da cadeia do TG e álcool, o solvente orgânico utilizado e o tempo de reação.

Ferreira Dias e Da Fonseca (1995) estudaram a produção de monoacilgliceróis por glicerólise de azeite de oliva utilizando lipases, de *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum* e *Rhizopus sp.* imobilizadas em uma espuma hidrofílica de poliuretano. O maior rendimento em monoacilgliceróis, 70 %, foi obtido com a lipase *C. rugosa* e com 0,23 de atividade de água.

LEE et al. (2004) utilizaram lipase *P. fluorescens* para a produção de monoacetina e monobutirina, com excelentes rendimentos de 85 e 96%, respectivamente. Pastor, Otero e Ballesteros (1995), Elfman-Börjesson e Härröd (1999), Langone et al (2002) e Kaethong et al (2005) também utilizaram com sucesso lipases imobilizadas na síntese de monoacilgliceróis.

Para a síntese de um MG particular, lipases de várias fontes devem ser testadas de acordo com a aplicação desejada (LEE et al., 2004). Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (CASTRO et al., 2004).

3.3.2.3. Temperatura da Reação

A concentração de monoacilglicerol no produto após reação de glicerólise enzimática de triacilgliceróis é altamente dependente da temperatura. Para obter um alto rendimento de monoacilglicerol, acima de 90%, a reação de síntese

enzimática de monoacilgliceróis, sem uso de solventes orgânicos, deve ser realizada abaixo da temperatura crítica (T_c) (McNEILL, BOROWITZ; BERGER, 1992).

A temperatura crítica é definida como a temperatura mais alta a qual os monoacilgliceróis são produzidos eficientemente e, depende do peso molecular do monoacilglicerol, podendo ser estimada do peso molecular dos ácidos graxos usados como substrato (PINSIRODOM et al., 2004). Depende também do tipo de gordura e está relacionada com o ponto de fusão da gordura, isto é, um ponto de fusão maior resulta em um valor maior para a T_c (McNEILL; BOROWITZ; BERGER, 1992).

A observação que o valor da T_c é relacionado com o ponto de fusão da gordura sugere que MG contendo somente AG saturados ou AG monoinsaturados cristalizará. Durante a glicerólise abaixo da T_c , ocorre cristalização preferencial para MG que contenham ácidos graxos saturados. Utilizando quatro triacilgliceróis de diferentes fontes (sebo bovino, banha ou toucinho, óleo de canola e óleo de soja), foi observado que a T_c foi similar para todas as gorduras examinadas, porém uma produção relativamente baixa de MG foi obtida (20-30%) (McNEILL, BOROWITZ; BERGER, 1992).

Pinsirodom et al. (2004) estudaram o efeito da temperatura de reação na produção de MG por esterificação de vários ácidos graxos livres com glicerol usando lipase de *Penicillium camembertii*. O aumento do rendimento de MG pela redução da temperatura da síntese enzimática pode ser explicado assumindo que o MG solidificado a baixa temperatura é excluído da reação.

A temperatura da reação depende do tipo de enzima utilizada. Wongsakul et al. (2002) estudaram os parâmetros para a reação de síntese de 2-MG por alcoólise enzimática de óleo de palma com etanol. Utilizando lipase de *Pseudomonas sp*, a temperatura ótima foi de 60°C e, foi alcançado um rendimento de 81% de 2-MG, no entanto, usando lipase D imobilizada Accurel EP100 a 40°C,

com menor tempo de reação, obteve-se um rendimento de aproximadamente 60% de 2-MG.

3.3.2.4. Substratos ou Reagentes

A velocidade da reação de síntese e o equilíbrio do rendimento da síntese dependem do tipo de ácido graxo utilizado como substrato (SAKIYAMA et al., 2001b). As enzimas possuem especificidade por substrato, assim, podem ser utilizados diversos substratos dependendo do monoacilglicerol que se pretende obter.

Watanabe et al. (2002) produziram MG de CLA (ácido linoléico conjugado) através da esterificação com glicerol catalisada por lipase de *Penicillium camembertii* a 5°C por 20 horas, em que o grau de esterificação alcançou 80,8%. Após a esterificação foi iniciada uma desidratação por evaporação a 5mmHg com o auxílio de uma bomba de vácuo. O grau de esterificação aumentou concomitantemente com a desidratação e alcançou 94,5% após 16h. Os conteúdos de MG (1,3-isômeros) e DG foram 92,7 e 2,9%, respectivamente, sendo que estes resultados mostraram que o sistema de esterificação com a desidratação é efetivo para produzir MG em alto rendimento.

Elfman-Börjesson e Härröd (1999) produziram MG por via enzimática a partir de óleo de canola, em que gel de sílica foi utilizado para absorver o glicerol e evitar problemas de baixa solubilidade em fase orgânica. O uso de solventes pode melhorar a pobre solubilidade dos substratos na água ou outros componentes da reação de natureza hidrofóbica, levando ao aumento de eficiência ou rendimento da reação (YANG et al, 2005). Entretanto, solventes orgânicos produzem vários efeitos físico-químicos nas moléculas das enzimas, dependendo do tipo do solvente orgânico e da enzima utilizados (KAEWTHONG; KITTIKUN, 2004).

3.3.2.5. Vácuo e Atividade de Água

Em um estudo sobre a cinética da esterificação de ácido ricinoléico e glicerol catalisada por lipase de *Candida Antarctica*, utilizando temperaturas entre 70-80°C, Garcia et al (1999) observaram que as melhores condições foram aquelas sobre vácuo, permitindo o estudo da reação como um processo irreversível, pois reações catalisadas por lipase são normalmente reversíveis e governadas pelo teor de água na mistura de reação (YESILOGU; KILIC, 2004).

A atividade de água (Aa) é um fator muito importante no sistema de reação enzimática, pois apesar da enzima ser ativada em meio aquoso, um excesso de água resulta em hidrólise indesejável. Um aumento na Aa aumenta a formação de AGL, sendo os AGL produtos indesejáveis, portanto, é importante manter a Aa tão baixa quanto possível. Uma boa maneira de controlar a atividade de água é ajustar a quantidade de água na preparação da enzima e manter os outros componentes tão secos quanto possível (ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999).

No processo de purificação de MG por destilação molecular não é possível separar completamente AGL de MG, por isso altos rendimentos de MG são requeridos com pequena quantidade de AGL (WATANABE et al., 2002).

Ferreira Dias e Da Fonseca (1995) observaram que a produção de ácidos graxos livres e diacilgliceróis aumenta exponencialmente com a atividade de água inicial do sistema, sendo este um parâmetro importante na glicerólise, encontrando que a Aa de 0,23 foi a melhor para a síntese de monoacilgliceróis por glicerólise de azeite de oliva na presença de lipase *C. rugosa*.

3.3.2.6. Síntese Enzimática de Monoacilgliceróis Acetilados

Assim como para síntese química, não foram encontradas patentes para a produção de monoacilgliceróis acetilados por via enzimática. Foram encontradas duas referências sobre a síntese de monoglicéridos acetilados, uma referente à síntese de acetilglicéridos (monoacilgliceróis diacetilados + diacilgliceróis acetilados) através de reação entre azeite de oliva e triacetina realizada por Kuo e Parkin (1995), e outra sobre a alcoólise enzimática de triacilgliceróis para produção de monoacilgliceróis de cadeia curta reportada por Lee et al. (2004).

Kuo e Parkin (1995) avaliaram seis lipases, sendo que a *Lipozyme* foi a mais eficiente nas reações de troca acil na formação de acetilgliceróis (AcAG) entre doadores acetil e TG de óleo de oliva na ausência de solvente orgânico. Para reação com óleo de oliva, o doador acetil foi a triacetina e o mais eficiente co-substrato foi o etil acetato. Maiores rendimentos absolutos do total de AcAG foram observados em relações molares de triacetina/azeite de oliva de 1:2 e etil acetato/azeite de oliva de cerca de 3:1, e os rendimentos respectivos foram aproximadamente 90% e 50%. Formação de AcAG foi otimizada com cerca 1-2% total de água no sistema a 80-85°C. Quando solventes orgânicos foram usados como um meio dispersante inerte, aqueles de polaridade intermediária favoreceram mais a biocatálise.

Lee et al. (2004) estudaram a alcoólise de triacilgliceróis catalisada por lipase de *Pseudomonas fluorescens* na presença de solventes orgânicos. Foram alcançados rendimentos de monoacetina de: 30% quando utilizado etanol, 50% quando utilizado isopropanol, 85% quando usado n-butanol e 75% quando usado álcool amílico. Encontraram que o rendimento máximo de 2-MG depende dos substratos na alcoolise e que a fonte da lipase afeta a eficiência catalítica e especificidade por substrato.

No presente estudo é apresentado um processo alternativo para obtenção de MGA por via enzimática sem utilização de solvente, sendo utilizada uma destilação simples como processo de purificação. Foram realizados testes para

selecionar os substratos e processos com ácido oléico, óleo de soja e gordura parcialmente hidrogenada de soja, esterificados com triacetina em diferentes proporções. Foram testadas quatro enzimas comerciais diferentes *Lipozyme TL 100L*, *Lipozyme IM*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*. Após seleção da enzima (*Lipozyme TL IM*) e substrato (gordura parcialmente hidrogenada) foi realizada a otimização das condições da reação (tempo, temperatura e quantidade de enzima) e, a partir da condição otimizada foram realizados ensaios de reutilização da enzima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATÉRIAS-PRIMAS

Foram utilizadas as seguintes matérias-primas para a produção de monoacilgliceróis acetilados:

- Glicerol (Synth);
- Ácido oléico Edenor[®] TI 05 (Cognis Brasil Ltda – São Paulo - SP);
- Gordura parcialmente hidrogenada Fatgill PF 38 (Cargill Agrícola S.A. – Mairinque – SP). Vide características nas Tabelas 1 e 2 do anexo.
- Triacetato de glicerina, triacetina (Neugel Produtos Químicos Ltda – Itapevi – SP). Vide características na Tabela 3 do anexo.
- Monoacilglicerol acetilado – *Myvacet 9-45* (Eastman Chemical Products Inc.) foi utilizado como MGA de referência.

Foram testadas as seguintes lipases, todas elas cedidas gentilmente pela NOVOZYMES: *Lipozyme[®] TL 100L*, *Lipozyme[®] IM*, *Lipozyme[®] RM IM* e *Lipozyme[®] TL IM*.

Lipozyme[®] TL IM – lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus* produzida através de fermentação submersa de um microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*. É um produto granulado, seco, marrom-claro, com um tamanho de partícula de 0,3-1,0 mm.

Lipozyme[®] TL 100L – enzima líquida de grau alimentício preparada a partir de lipase microbiana (E.C. 3.1.1.3) de *Thermomyces lanuginosus* produzida por fermentação submersa de um microrganismo geneticamente modificado *Aspergillus oryzae*.

Lipozyme[®] IM – hidrolase triacilglicerol microbiana (E.C. 3.1.1.3) de *Rhizomucor miehei*. A *Lipozyme IM* é ativa na faixa de 30 a 70°C e exige um grau de hidratação (10-12% w/w) para que se inicie o processo biocatalítico.

Lipozyme[®] RM IM – enzima preparada a partir de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina.

Todas as enzimas estão em conformidade com as especificações de pureza recomendadas pelas juntas FAO/WHO, JECFA e FCC (NOVOZYMES, 2003).

4.2. EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos do laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP:

- Banho termostático com agitação magnética – IKA-HEIZBAD HBR-250.
- Bomba de vácuo Edwards – modelo 80791.
- Medidor de vácuo Vaccubrand DVR1.
- Cromatógrafo Líquido para HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography) PERKIN ELMER, Isocratic LC Pump 250, com detector de Índice de Refração – SICON ANALYTIC LDC 201 e colunas JORDI Gel DVB 100 A^o e 500 A^o, ambas de 300 mm X 7,8 mm.
- Cromatógrafo (Fase Gasosa – Capilar) – CGC Agilent 6850 Series GC System, com injetor automático acoplado a detector FID, com *Software* Agilent Chemstation Plus, version A.08xx para integração e registro do cromatograma.
- Lovibond Tintometer Model E.
- Rotoevaporador Fisatom.

Equipamentos e aparelhos comuns de laboratório de análise físico-químico de alimentos.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

Os seguintes métodos analíticos foram utilizados no monitoramento das reações e na caracterização dos produtos:

- Ponto de fusão – método AOCS Cc 3-25 (2002)
- Índice de iodo – método AOCS Cd 1c-85 (2002)
- Índice de saponificação – método AOCS Cd 3-25 (2002)
- Valor de hidroxila – método AOCS Cd 13-60 (2002)
- Acidez (ácidos graxos livres) – método AOCS Ca 5^a-40 (2002)
- Cor Lovibond – método AOCS Cc 13b – 45 (2002)
- Índice de peróxido – método AOCS Ce 2-66 (2002)
- Composição em ácidos graxos – método AOCS Ce-1-62 (2002) – condições analíticas: coluna db23, forno: 195°C-20 minutos, 195-215°C (5°C/minuto), 215°C-16 minutos, corrida de 40 minutos.

ANÁLISE DE RENDIMENTO POR HPSEC

A concentração de cada componente (triacilglicerol, diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos graxos livres e triacetina) foi determinada por cromatografia líquida, HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography).

As amostras puras foram diluídas em tetrahydrofurano (THF), filtradas em filtro com membrana Millipore e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 20µL. Para a corrida isocrática utilizou-se como fase móvel 100% tetrahydrofurano, com fluxo de 1,1 mL/min e duração de 20 minutos. Os componentes foram identificados de acordo com o tempo de retenção comparados a padrões puros (Figura 8).

Para integração e registro dos cromatogramas foi utilizado o sistema de integração do *software* PeakSimple.

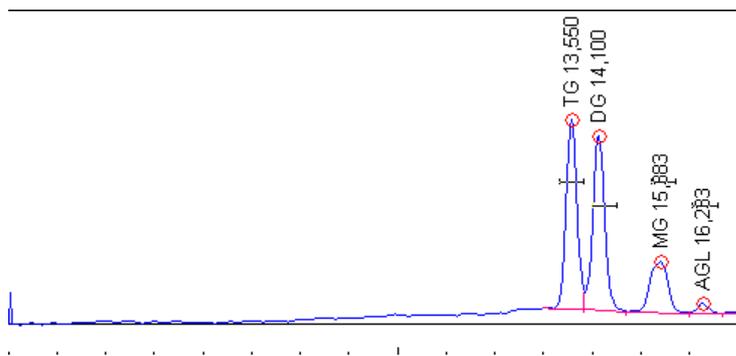


Figura 8. Cromatograma HPSEC dos padrões de triacilglicerol, diacilglicerol, monacilglicerol e ácidos graxos livres.

4.3.2. TESTES PRELIMINARES

Foram realizados testes preliminares para determinar as condições e quais seriam as variáveis independentes na otimização do processo de obtenção de monoacilgliceróis acetilados através da reação de interesterificação enzimática.

As reações de síntese foram conduzidas em balões volumétricos com capacidade de 25 mL. Os substratos e a enzima foram pesados e colocados nos balões e, acondicionados em banho termostático sob agitação magnética e, acoplados a uma bomba de vácuo para retirada da água formada durante a reação, evitando assim a produção de ácidos graxos livres, devido à hidrólise.

- **Seleção dos substratos da reação de síntese de MGA.**

Para selecionar os substratos, a via de processo e a proporção entre os substratos foram realizados os testes nas seguintes condições:

- Reação de acidólise entre ácido oléico e triacetina na proporção 1:1,5 utilizando as lipases *Lipozyme IM (7%)* e *Lipozyme RM IM (7%)* a 60°C por 6 horas, sob vácuo e agitação. As enzimas foram ativadas com 10% de água em rotoevaporador por 10 minutos. A reação de acidólise está representada na Figura 9.

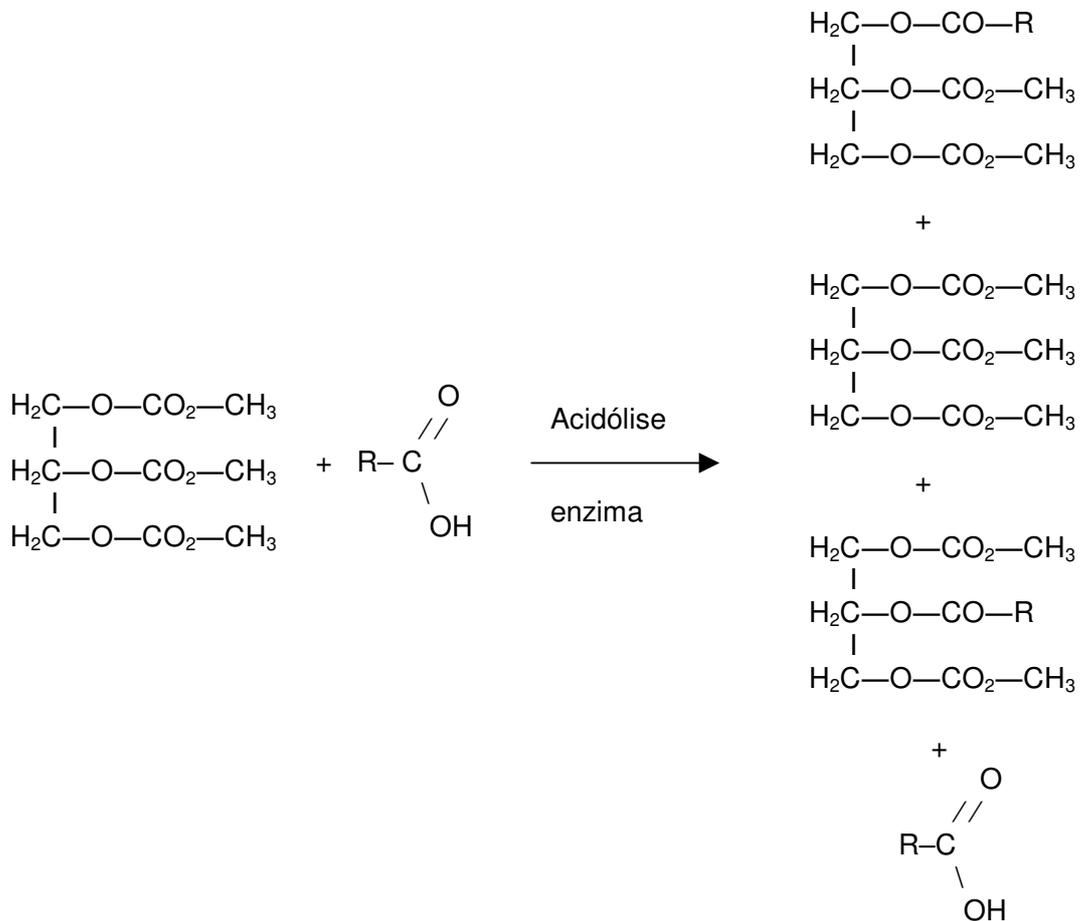


Figura 9. Representação esquemática da reação de acidólise entre triacetina e ácido graxo.

- Síntese a partir de gordura vegetal hidrogenada (GVH) e triacetina nas proporções 1:1,5 utilizando 7% de *Lipozyme IM*, 1:1,5 e 1:3 para *Lipozyme RM IM* (7%), em relação ao peso dos reagentes, a temperatura das reações foi de 60°C e o tempo de 6 horas, sob vácuo e agitação. As enzimas foram ativadas com 10% de água em rotoevaporador por 10 minutos. A reação de interesterificação entre GVH e triacetina está representada na Figura 10.

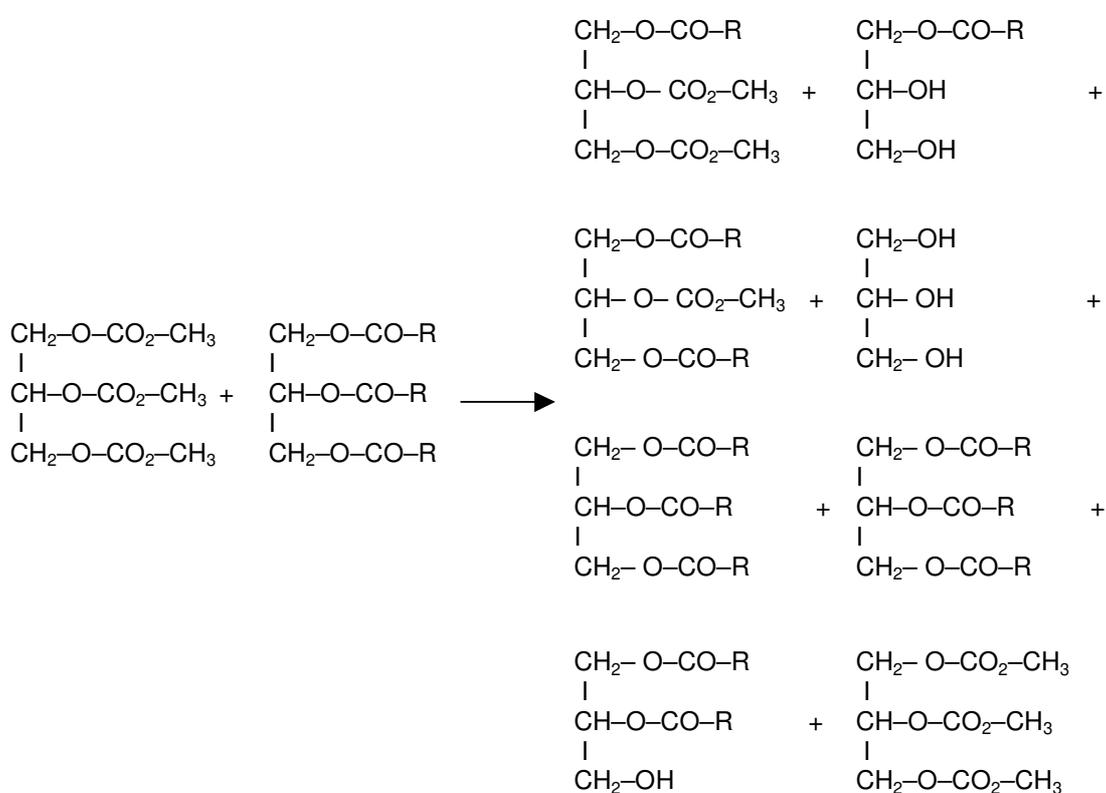


Figura 10. Representação esquemática da reação de interesterificação entre triacetina e gordura vegetal hidrogenada.

- Sínteses na presença de *Lipozyme TL IM* (7%) a partir de gordura parcialmente hidrogenada e triacetina nas seguintes proporções: 1:1, 1:2 e 1:3, em relação ao peso dos reagentes, a temperatura da reação foi de 60°C e o tempo de 6 horas, sob vácuo e agitação, com a finalidade de selecionar a melhor proporção e avaliar se a proporção deveria ser uma das variáveis do desenho

experimental. Esta enzima imobilizada foi utilizada sem tratamento prévio de acordo com a ficha técnica, fornecida pela Novozymes.

- Síntese a partir de gordura vegetal hidrogenada e glicerol, 60°C por 8 horas, sob vácuo e agitação, na presença de 7% de *Lipozyme TL IM* em relação ao peso total dos substratos.

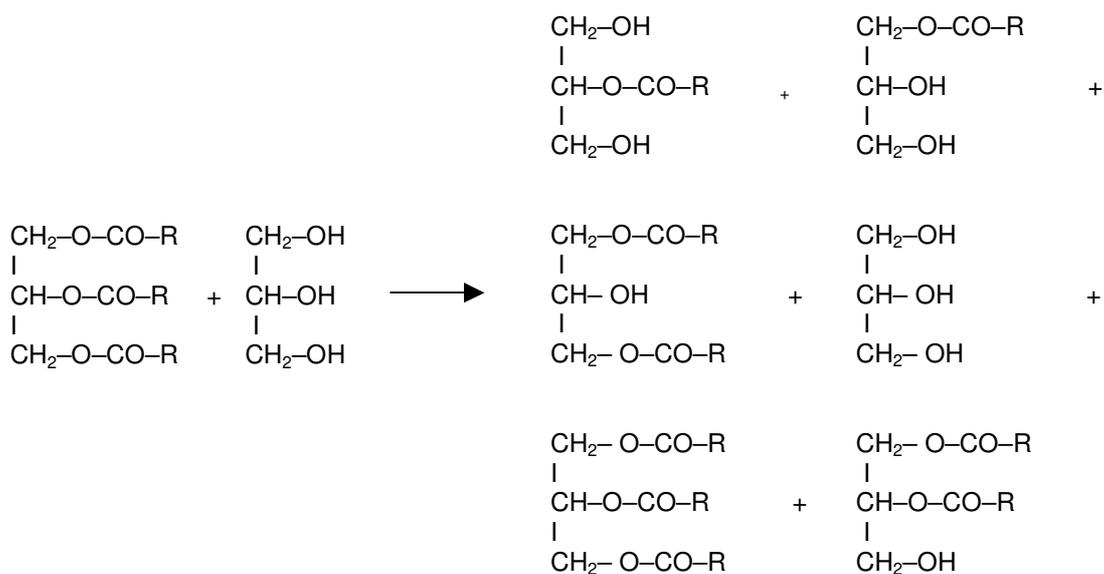


Figura 11. Representação esquemática da reação de glicerólise entre gordura vegetal hidrogenada e glicerol.

- Síntese a partir de óleo de soja e triacetina (1:3), 60°C por 8 horas, sob vácuo e agitação, na presença de 7% de *Lipozyme TL IM* em relação ao peso total dos substratos.

- **Seleção de enzima da reação de síntese de MGA.**

Uma vez selecionados os substratos, para selecionar uma ou mais enzimas para a síntese de monoacilgliceróis acetilados foram realizadas reações de interesterificação enzimática de gordura vegetal parcialmente hidrogenada e

triacetina, utilizando quatro enzimas diferentes: *Lipozyme TL 100L*, *Lipozyme IM*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*. Foram testadas em condições de temperatura de 60°C, com agitação magnética, sob vácuo por 6 horas, analisando o rendimento, através de cromatografia líquida HPSEC retirando-se amostras a cada 2 horas (Figura 12).

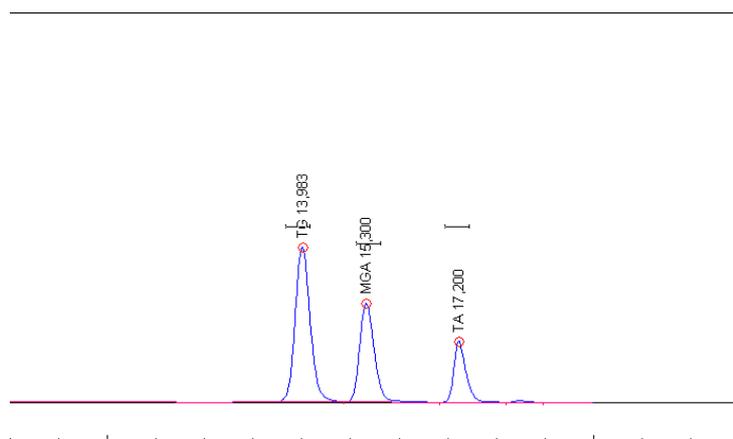


Figura 12. Cromatograma HPSEC dos substratos (Triacilgliceróis = TG e Triacetina = TA) e produtos (Monoacilgliceróis Acetilados = MGA).

As enzimas foram adicionadas na quantidade de 7% do peso total dos substratos. As enzimas *Lipozyme IM* e *Lipozyme RM IM* foram ativadas com 10% de água em rotoevaporador por 10 minutos, as enzimas *Lipozyme TL 100L*, enzima líquida e a *Lipozyme TL IM* foram adicionadas sem tratamento prévio, conforme especificado na ficha técnica fornecida pela Novozymes.

- **Determinação da concentração de enzima.**

Foram realizadas reações na presença de diferentes concentrações da enzima *Lipozyme TL IM*: 1,5 %, 1,75 %, 2 %, 2,5 %, 3 % e 7 % em relação ao total de reagentes. Como a enzima tem custo alto, deve-se utilizar o mínimo necessário para que se alcance o rendimento desejado. Os testes permitiram determinar os

níveis de variação para desenho experimental da otimização da reação. Todos os testes foram conduzidos a 60°C, por 14 horas de reação, sob vácuo e agitação.

- **Determinação do tempo de reação.**

Para selecionar o nível de variação do tempo de reação foi realizado um teste de acompanhamento da reação de interesterificação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina na proporção 1:3, utilizando a enzima *Lipozyme TL IM* (7%), a 60°C, sob vácuo e agitação durante 20 horas. A avaliação do rendimento foi feita por HPSEC sendo retiradas amostras a cada 2 horas.

4.3.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE MGA

A otimização das condições da reação foi realizada de acordo com o desenho experimental fatorial completo com três variáveis independentes baseado na Metodologia de Superfície de Resposta (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 1995). Portanto o número de ensaios foi igual a 17, sendo 8 fatoriais, 6 pontos axiais e 3 pontos centrais.

As três variáveis independentes foram: tempo (horas), quantidade de enzima (% em relação ao total de reagentes), temperatura (°C), e as duas variáveis dependentes ou respostas foram: porcentagem de monoacilgliceróis (rendimento) e relação DG/MG mínima, ambas obtidas por HPSEC. As variáveis independentes e seus níveis estão apresentados na Tabela 2, e os valores codificados e reais das três variáveis do planejamento estatístico apresentam-se na Tabela 3.

Tabela 2. Variáveis e níveis de variação utilizados no desenho experimental para produção de MG acetilados por via enzimática.

Variáveis / Níveis codificados	- ∞	- 1	0	+ 1	+ ∞
X ₁ = tempo (horas)	0,96	3	6	9	11,04
X ₂ = [enzima] (%)	0,64	2	4	6	7,36
X ₃ = temperatura (°C)	51,6	55	60	65	68,4

Planejamento experimental $2^3 + 3$ pontos centrais + 6 pontos axiais = 17 ensaios, onde: $\infty = (2^n)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$.

Tabela 3. Planejamento experimental para produção de MG acetilados por via enzimática utilizando *Lipozyme TL IM*.

Ensaio	Valores Codificados			Valores Reais		
	X₁	X₂	X₃	Tempo (h)	Enzima (%)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	-1	3	2	55
2	-1	-1	1	3	2	65
3	-1	1	-1	3	6	55
4	-1	1	1	3	6	65
5	1	-1	-1	9	2	55
6	1	-1	1	9	2	65
7	1	1	-1	9	6	55
8	1	1	1	9	6	65
9	-1,68	0	0	0,96	4	60
10	1,68	0	0	11,04	4	60
11	0	-1,68	0	6	0,64	60
12	0	1,68	0	6	7,36	60
13	0	0	-1,68	6	4	51,6
14	0	0	1,68	6	4	68,4
15	0	0	0	6	4	60
16	0	0	0	6	4	60
17	0	0	0	6	4	60

Os resultados foram analisados através de superfície de resposta, utilizando o *Software* STATISTICA (StatSoft, versão 5.0).

- **Verificação das condições ótimas da reação de síntese de MGA**

Foram realizados testes para produção de monoacilgliceróis nas condições otimizadas de tempo, temperatura e concentração de enzima para a reação de interesterificação entre gordura hidrogenada e triacetina catalisada pela enzima *Lipozyme TL IM*.

4.3.4. REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA

Foram realizados testes utilizando as enzimas *Lipozyme RM IM*, *Lipozyme IM* e *Lipozyme TL IM* em ciclos subseqüentes, reutilizando a enzima do ciclo anterior após filtração a vácuo. Estes testes foram realizados para verificar se a enzima poderia ser reutilizada e qual a perda de atividade durante o processo.

Os testes utilizando as enzimas *Lipozyme RM IM*, *Lipozyme IM* foram realizados utilizando 7% de enzima, temperatura de 60°C por 6 horas, sob vácuo e agitação.

Os testes utilizando a enzima *Lipozyme TL IM* foram realizados a partir das condições otimizadas da reação, ou seja, 4% de enzima, temperatura de 65°C por 6 horas, sob vácuo e agitação. O objetivo dos testes foi verificar quantas vezes pode ser reutilizada a enzima, a fim de diminuir o custo do processo. O rendimento não deverá ser inferior a 60%, pois sendo assim o produto é classificado como fora de especificação.

Após cada reação de interesterificação o produto obtido foi filtrado a vácuo, utilizando funil com papel filtro acoplado a um kitassato e bomba de vácuo, separando-se assim a enzima da mistura obtida da reação, ou seja, MG-DG e triacetina. Após a filtração a enzima retida no papel filtro foi acondicionada em placa de Petri tampada e colocada em geladeira para posterior reutilização, adicionando novos reagentes e procedendo a reação em novos ciclos sucessivos nas condições já estabelecidas.

Foram realizadas reações consecutivas reutilizando a enzima filtrada junto a novos substratos conforme esquema da Figura 13. Após a filtração o produto filtrado foi analisado quanto ao rendimento da reação através de cromatografia HPSEC.

Também foram realizados testes com a enzima *Lipozyme TL IM*, adicionando em cada ciclo 10% de enzima nova em relação à concentração utilizada inicialmente.

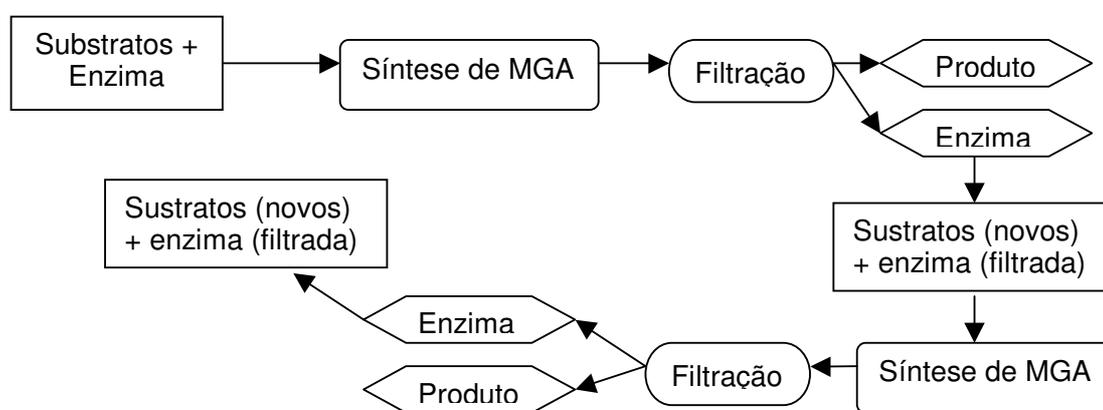


Figura 13. Esquema de reutilização da enzima na síntese de MGA.

4.3.5. PURIFICAÇÃO DO MONOACILGLICEROL ACETILADO

- **Destilação do produto obtido**

Como processo de purificação foi utilizada uma destilação simples para a remoção da triacetina remanescente no produto monoacilglicerol acetilado, sendo o ponto de ebulição da triacetina 220°C. A destilação foi conduzida em balão de fundo redondo com boca esmerilhada acoplado a um condensador sob vácuo e nitrogênio. Após a destilação o produto e o destilado foram analisados por HPSEC.

Para determinar as condições de destilação e purificar o produto foram realizados os seguintes testes:

a) Destilações do produto obtido do quarto ciclo da reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de 7% de *Lipozyme RM IM*, a 60°C por 8 horas.

b) Destilação do produto obtido da reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de 7% de *Lipozyme TL IM*, a 60°C por 6 horas.

c) Destilação do produto obtido da reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de 7% de *Lipozyme TL IM*, a 60°C por 6 horas, no segundo ciclo.

d) Destilação do produto obtido da reação nas condições otimizadas, ou seja, reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de 4% de *Lipozyme TL IM*, a 65°C por 6 horas.

- **Neutralização do produto**

A especificação de acidez para o produto monoacilglicerol acetilado comercial é de acidez <3, sendo assim quando a acidez for maior que 3 o produto deve ser neutralizado como segue:

- adição de solução de hidróxido de sódio (18 °Be), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{mL sol. NaOH}}{100\text{g óleo}} = \frac{(\% \text{AGL}/7 + \gamma\%) \cdot 100}{\% \text{NaOH} \cdot \text{densidade}}$$

- centrifugação;
- lavagem com 10 % de água a 80-85 °C por duas vezes;
- separação de fases (água e óleo) por decantação em funil de separação;
- secagem a 80-85°C, sob vácuo por 15 min.

O esquema do processo proposto para a obtenção de monoacilgliceróis acetilados por via enzimática está descrito na Figura 14.

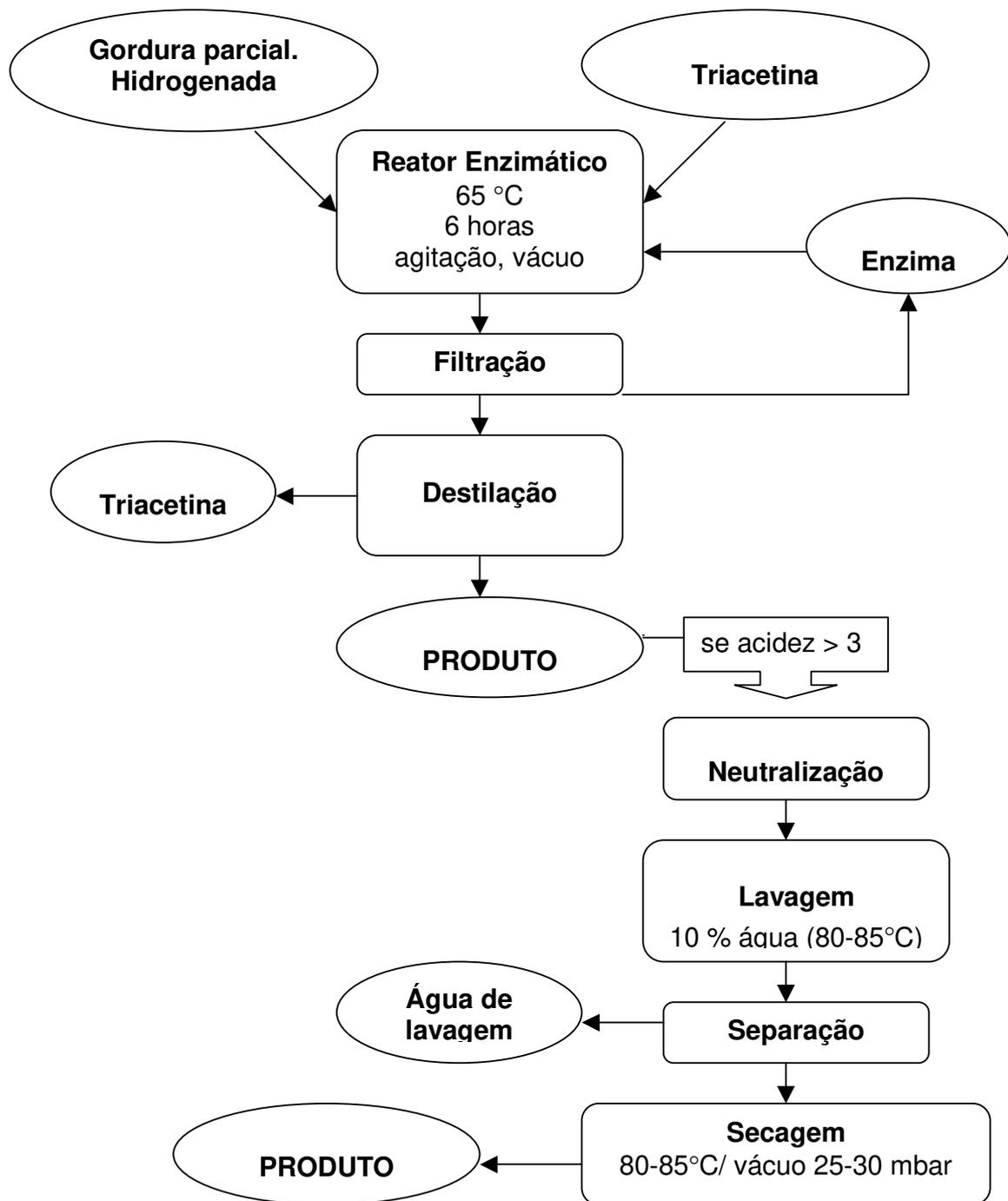


Figura 14. Processo de obtenção de monoacilgliceróis acetilados.

4.3.6. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

Após a obtenção do produto monoacilglicerol acetilado purificado, esse foi caracterizado mediante as seguintes determinações: Ponto de Fusão, Índice de Iodo, Índice de Saponificação, Valor de Hidroxila, Ácidos Graxos Livres, Cor Lovibond, Índice de Peróxido e Composição em ácidos graxos, conforme os métodos da AOCS descritos no item 4.3.1. Métodos Analíticos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes Preliminares

- **Seleção dos substratos da reação de síntese de MGA.**

Os rendimentos obtidos das reações enzimáticas entre triacetina (TA) e ácido oléico utilizando as enzimas *Lipozyme IM* e *Lipozyme RM IM* estão apresentados na Tabela 4. As reações tanto com *Lipozyme IM* quanto *Lipozyme RM IM* não produziram monoacilgliceróis nem diacilgliceróis. Foram obtidos como produtos apenas triacetina e ácidos graxos livres previamente presentes, indicando que nas condições do teste não houve nenhum tipo de reação.

Tabela 4. Rendimentos das reações entre ácido oléico e triacetina na proporção 1:1,5, utilizando as enzimas *Lipozyme IM* e *Lipozyme RM IM*, após 6 horas de reação a 60°C.

	<i>Lipozyme IM</i>	<i>Lipozyme RM IM</i>
% TG	-	-
% DG	-	-
% MG	-	-
% AGL	87,82	87,16
% TA	12,18	12,84

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, AGL = ácidos graxos livres, TA = triacetina.

As reações entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina, nas proporções 1:1,5 e 1:3, utilizando a enzima *Lipozyme IM* também não produziram monoacilgliceróis conforme os resultados apresentados na Tabela 5. Após 6 horas de reação foram produzidos apenas diacilgliceróis, sendo que sua produção foi maior quando utilizada a proporção 1:3.

Tabela 5. Rendimentos da reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina nas proporções 1:1,5 e 1:3, na presença da enzima *Lipozyme IM* (7%), após 6 horas de reação a 60°C.

	Proporção entre gordura hidrogenada e triacetina	
	1:1,5	1:3
% TG	72,75	53,40
% DG	6,60	20,76
% MG	-	-
% AGL	-	-
% TA	20,65	25,85

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, AGL = ácidos graxos livres, TA = triacetina.

Considerando o produto purificado, ou seja, sem triacetina, o rendimento de DG foi de 27,98% na proporção 1:3, rendimento muito baixo para síntese de ésteres de ácidos graxos. Elfman-Börjesson e Härröd (1999) utilizaram *Lipozyme IM* na síntese de MG por glicerólise e observaram formação de DG juntamente com MG, sendo obtido maior rendimento, 36,8%, de DG do que o rendimento de MG (17,4%).

Kuo e Parkin (1995) obtiveram rendimento de 60-63% utilizando a *Lipozyme IM* na síntese de mono-diacilgliceróis acetilados. Segundo esses autores para um resíduo acetato ser incorporado nos AG do TG (azeite de oliva), primeiramente um grupo acil deve ser removido do TG original, formando DG como produto intermediário.

Utilizando a *Lipozyme RM IM* na reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em três proporções (1:1,5; 1:2; 1:3) não houve produção de monoacilgliceróis após 6 horas de reação como pode ser observado através dos resultados apresentados na Tabela 6.

Nas três proporções houve apenas produção de diacilgliceróis, sendo que o maior rendimento de diacilgliceróis ocorreu quando foi realizada a reação na proporção 1:3. Considerando o produto purificado, ou seja, sem triacetina, o

rendimento de DG alcançou o valor de 68%, acima daquele de 60-63% obtido por Kuo e Parkin (1995). A *Lipozyme RM IM* tem sido reportada como um eficiente catalisador na síntese de DG através de reações de glicerólise (McNEILL; YAMANE, 1991) e de esterificação de glicerol com ácido graxo (NAKAJIMA, 2004).

Tabela 6. Rendimentos da reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em diferentes proporções na presença de *Lipozyme RM IM* (7%), a 60°C.

GVH / TA	Tempo (h)	TG (%)	DG (%)	MG (%)	TA (%)
1:1,5	2	90,05	-	-	9,95
	4	67,11	21,48	-	11,39
	6	63,03	23,21	-	13,76
1:2	2	44,33	7,29	-	51,62
	4	71,79	16,66	-	11,55
	6	69,47	28,42	-	13,79
1:3	2	53,14	20,26	-	26,60
	4	13,39	8,07	-	78,55
	6	14,34	30,59	-	55,07

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina.

Nos testes realizados com gordura hidrogenada e triacetina na presença da enzima *Lipozyme TL IM* observou-se a produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis (Tabela 7). A enzima *Lipozyme TL IM* foi utilizada sem adição de água, o que favorece a não formação de AGL e um alto rendimento de MG. De acordo com ELFMAN-BORJESSON; HARROD (1999) e WATANABE et al (2002) a adição de água durante a preparação da enzima favorece a formação de ácidos graxos livres e diminui o rendimento da reação de síntese de MG.

Tabela 7. Rendimentos da interesterificação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em diferentes proporções, na presença de *Lipozyme TL IM* (7%), conduzida a 60°C.

GVH / TA	Tempo (h)	TG (%)	DG (%)	MG (%)	TA (%)
1:1	1	81,59	-	7,33	11,09
	2	54,39	8,62	17,49	19,50
	4	9,53	21,46	51,26	17,75
	6	2,65	24,11	55,92	17,32
1:2	1	63,01	-	5,94	31,05
	2	33,68	6,58	20,81	35,92
	4	3,92	14,88	43,89	37,31
	6	-	12,35	46,79	40,86
1:3	1	33,44	4,93	11,94	49,69
	2	18,27	9,14	27,42	45,17
	4	-	7,35	45,34	47,31
	6	-	7,44	45,74	46,82

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina.

Assim como Pastore e Park (1993) pode-se afirmar que a produção de monoacilgliceróis é afetada pela proporção entre os reagentes. Sendo que em todas as proporções foram produzidos MG, mas a quantidade de DG foi maior para as relações onde a quantidade de triacetina foi menor (1:1 e 1:2).

Os diacilgliceróis possuem menor capacidade emulsificante (PÉREZ-PARIENTE et al, 2003), por isso é desejável que o produto contenha menor quantidade de diacilgliceróis. Portanto a proporção mais indicada entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina foi a de 1:3, já que utilizando as outras proporções (1:1 e 1:2) a produção de diacilgliceróis, considerando o produto purificado, ou seja, sem triacetina, foi superior a 20%.

Constatando que a enzima *Lipozyme TL IM* foi a que produziu os melhores resultados satisfatórios para síntese de MGA utilizando gordura vegetal hidrogenada e triacetina, foram realizados testes utilizando gordura vegetal hidrogenada e glicerol na presença dessa enzima como catalisador. Não houve esterificação nas condições testadas até 10 horas de reação. Estes resultados indicam que, nas condições testadas, a lipase *Lipozyme TL IM* é eficiente na interesterificação, porém não catalisa a reação de glicerólise.

A glicerólise é comumente empregada para produzir MG, a glicerólise de triacilglicerol e glicerol na presença de lipase utilizando solventes, tem sido relatada em vários estudos (McNEILL; YAMANE, 1991; FERREIRA DIAS; DA FONSECA, 1995). Provavelmente a baixa solubilidade entre o glicerol e a gordura hidrogenada dificulta a reação e por isso não tenha produzido monoacilgliceróis.

A partir dos substratos óleo de soja e triacetina foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 8. Houve uma produção de mais de 20% de monoacilgliceróis, junto com a produção simultânea de 10% de diacilgliceróis, em até 8 horas de reação.

Tabela 8. Rendimentos da interesterificação entre óleo de soja e triacetina na presença de *Lipozyme TL IM* (7%), conduzida a 60°C por 8 horas.

Tempo (h)	% TG	% DG	% MG	% TA
2	43,88	-	-	56,11
4	33,80	4,48	6,56	55,14
6	11,43	9,97	20,39	58,20
8	7,87	10,21	23,39	58,51

Grande parte das lipases apresenta a propriedade de hidrolisar preferencialmente um determinado grupo de substratos, em geral relacionado ao tamanho da cadeia carbônica ou grau de insaturação do grupo acil em questão (PEDERSON; HOLMER, 1995). Os resultados obtidos mostram que o substrato

mais adequado para a produção de MGA é a gordura vegetal parcialmente hidrogenada de soja, utilizando a lipase *Lipozyme TL IM*.

- **Seleção de enzima para a reação de síntese de MGA.**

Os rendimentos obtidos após reação de interesterificação enzimática entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3) na presença das enzimas *Lipozyme TL 100L*, *Lipozyme TL IM*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme IM* estão apresentados nas Tabela 9.

Tabela 9. Rendimentos da interesterificação enzimática de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), conduzida a 60°C, com diferentes lipases (7%).

	Tempo (h)	% TG	% DG	% MG	% TA
<i>Lipozyme TL 100L</i>	2	13,34	-	-	86,65
	4	39,85	-	-	60,14
	6	72,39	-	-	27,60
<i>Lipozyme IM</i>	2	8,54	6,28	-	85,17
	4	32,23	13,17	-	54,60
	6	53,40	20,76	-	25,85
<i>Lipozyme RM IM</i>	2	53,14	20,26	-	26,60
	4	13,39	8,07	-	78,55
	6	14,34	30,59	-	55,07
<i>Lipozyme TL IM</i>	2	18,32	7,06	23,69	50,93
	4	-	9,30	46,20	44,50
	6	-	9,42	48,09	42,50

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina.

Os testes conduzidos com *Lipozyme IM*, *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL 100L* não produziram monoacilgliceróis em até 6 horas de reação, embora as enzimas *Lipozyme RM IM*, *Lipozyme IM* tenham produzido diacilgliceróis, e talvez começassem a produzir monoacilgliceróis com maior tempo de reação. Lipases de diferentes fontes são capazes de catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Assim como nos experimentos conduzidos por Wongsakul et al. (2003) sobre síntese enzimática de MG utilizando alcoolise de óleo de palma, a enzima *Lipozyme TL IM* foi a mais ativa, sendo que para esses autores a *Lipozyme RM IM* foi considerada quase sem atividade. Yang et al (2005) também obtiveram melhores rendimentos de MG na reação de glicerólise utilizando a *Lipozyme TL IM* (67%) e rendimentos mais baixos com a *Lipozyme RM IM* (36%).

Para a interesterificação enzimática de GVH e TA as enzimas *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme IM* foram ativas apenas na formação de DG, obtendo-se valores de até 68% utilizando *Lipozyme RM IM* e 42% quando utilizada *Lipozyme IM*, considerando o produto purificado, ou seja, sem triacetina.

A reação utilizando a enzima *Lipozyme TL IM* produziu monoacilgliceróis acetilados a partir de 2 horas de reação, demonstrando ser a enzima mais ativa na síntese de monoacilgliceróis acetilados nas condições testadas. Considerando o produto purificado, ou seja, realizando o cálculo sem o conteúdo de triacetina, após 4 horas de reação o produto teria mais de 80% de monoacilglicerol, rendimento superior ao de 45-55% da síntese química comumente realizada (KROG, 1997), e comparável aos valores encontrados por Kuo e Parkin (1995) de 50 e 90% para síntese enzimática de acetogliceróis e de Lee et al (2004) de 85% para produção de monoacetina. Quando comparado ao método de glicerólise em fase sólida, o rendimento é um pouco inferior, pois nesse método pode-se chegar a 95-98% de rendimento (ELFMAN-BORJESSON; HÄRRÖD, 1999), mas esse método é mais complexo e requer mais etapas. Yang et al (2005) também

obtiveram excelentes resultados quando considerado o produto purificado (0,3% glicerol, 1,4% AGL, 96,75% MG, 1,55% DG), mas utilizaram solvente álcool terc-butil, que apresenta toxicidade e pode ser explosivo.

É possível obter MGA sem a utilização de solventes orgânicos, apesar dos substratos gordura vegetal hidrogenada e triacetina serem imiscíveis, a utilização de aquecimento a 60°C e agitação permitiu a dissolução das duas fases e foi possível produzir monoacilgliceróis acetilados. Em muitos estudos foram utilizados solventes orgânicos (PASTOR; OTERO; BALLESTEROS, 1995; ELFMAN-BÖRJESSON; HÄRRÖD, 1999; SAKIYAMA et al 2001b; LANGONE et al, 2002; WATANABE et al, 2002; YESILOGU; KILIC, 2004; LEE et al, 2004). A utilização de solvente minimiza a baixa solubilidade entre os substratos, mas pode causar alterações físico-químicas na enzima utilizada (KAEWTHONG; KITTIKUN, 2004), impossibilitando sua reutilização.

Assim, não foi utilizado solvente neste estudo, sendo que desse modo também se dispensa a etapa de extração e recuperação do solvente, conseqüentemente minimizando a geração e tratamento de resíduos durante o processo de obtenção do MGA, além disso, os produtos obtidos por síntese sem a presença de solventes orgânicos podem ser utilizados em alimentos sem maiores restrições.

- **Determinação da concentração de enzima.**

Após a seleção da enzima *Lipozyme TL IM*, foram realizados testes para determinar a concentração dessa enzima na reação de interesterificação entre triacetina e gordura vegetal hidrogenada. Os rendimentos de monoacilgliceróis e diacilgliceróis encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimentos de MG e DG obtidos através da interesterificação de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando diferentes concentrações de enzima *Lipozyme TL IM*.

	1,5%		1,75%		2%		2,5%		3,5%		7%	
	MG	DG	MG	DG	MG	DG	MG	DG	MG	DG	MG	DG
2h	17,1	11,6	18,5	10,0	21,0	16,1	20,2	12,2	23,9	15,2	28	24,4
4h	27,5	13,8	26,3	2,5	39,7	16,0	48,4	18,0	53,0	19,3	71,0	18,4
6h	40,4	17,0	37,7	18,6	56,3	21,4	63,2	20,7	71,0	19,7	84,6	14,7
8h	54,0	20,4	50,2	22,4	55,6	22,4	63,4	14,2	79,5	9,8	83,4	16,6
10h	59,7	19,8	63,2	22,0	65,3	19,8	70,4	16,9	83,6	11,1	83,2	16,8
12h	56,2	20,7	63,6	19,4	70,0	19,7	80,8	15,5	82,8	10,2	82,3	14,7
14h	54,4	21,9	70,1	19,5	69,2	18,2	83,7	16,5	82,0	11,4	82,5	17,5

DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol.

Pode-se observar que é possível produzir MGA com apenas 1,5% de enzima, porém o tempo de reação precisa ser superior a 8 horas para se obter mais de 50%. A partir de 2,5% de enzima a produção de MGA é maior que 60% após 6 horas de reação. Os melhores resultados foram obtidos com concentração acima de 2,5% de enzima, quando já é possível obter mais de 80% de monoacilgliceróis acetilados após 12 horas de reação, e com apenas 6 horas de reação o rendimento em MGA é superior a 70%. Como a enzima tem alto custo, é conveniente utilizar quantidades menores, sendo assim a faixa de variação da concentração de enzima selecionada para a otimização da reação foi de 2% a 6%. Em todas as concentrações de enzima, até 8 horas de reação, observou-se aumento no rendimento, depois desse tempo para as concentrações de 3,5% e 7% observou-se que a concentração de MGA permaneceu praticamente constante.

- **Seleção dos níveis de variação do tempo de reação.**

Os rendimentos de MG e DG obtidos na reação de interesterificação enzimática entre gordura hidrogenada e triacetina e 7% *Lipozyme TL IM* durante 20 horas estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Rendimentos da síntese de MGA, através de interesterificação de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima *Lipozyme TL IM* (7%).

Tempo (h)	TG	DG	MGA
1	71,51	-	28,40
2	57,43	17,97	24,41
4	10,56	18,44	71,00
6	-	16,48	83,52
8	-	16,60	83,41
10	-	16,78	83,22
12	-	14,71	82,29
14	-	17,50	82,50
16	-	14,00	83,99
18	-	24,77	73,98
20	-	26,85	73,22

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina.

O tempo de reação é bastante curto comparado com a síntese química e síntese enzimática de AcAG realizada por Kuo e Parkin (1995), e superior ao tempo de aproximadamente 3 horas da alcoólise realizada por Lee, Kim e Shin (2002) para produção de monoacetina. O rendimento de MGA aumenta durante as primeiras horas de reação enzimática e permanece estável de 6 até 16 horas, tendo uma leve queda novamente após 18 horas de reação. A Figura 15 apresenta o gráfico de acompanhamento da reação por 20 horas, com os rendimentos de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis acetilados.

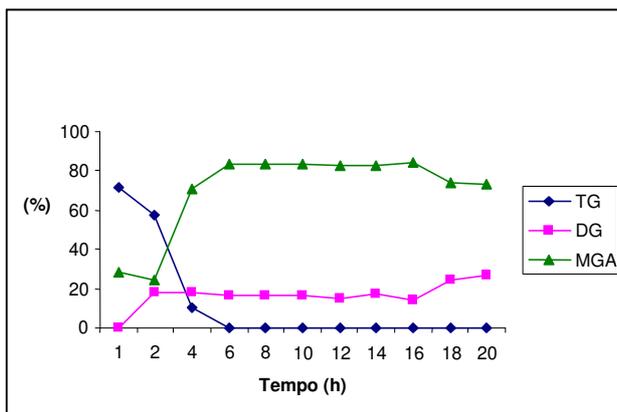


Figura 15. Síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados (MGA) com *Lipozyme TL IM* e substratos GVH e triacetina.

Observando-se o gráfico da Figura 15, nota-se que após 6 horas de reação, não há triacilgliceróis no produto e que o teor de diacilgliceróis aumenta nas primeiras duas horas de reação, mantendo-se constante até 16 horas.

De acordo com os resultados obtidos, o tempo de reação de 6 horas foi selecionado e o intervalo de variação do tempo selecionado para a otimização da reação de síntese de monoacilgliceróis acetilados situou-se na faixa de 3 a 9 horas.

5.2. OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE MGA

Os resultados de rendimento de monoacilgliceróis e relação DG/MG dos 17 ensaios do desenho experimental descrito na Tabela 4, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Rendimentos obtidos na otimização da reação de síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados, a partir dos substratos gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3).

Ensaio	Tempo (h)	Enzima (%)	Temperatura (°C)	% MGA	DG/MG
1	3	2	55	25,13	0,59
2	3	2	65	30,06	0,56
3	3	6	55	77,00	0,28
4	3	6	65	80,31	0,25
5	9	2	55	82,53	0,21
6	9	2	65	79,89	0,25
7	9	6	55	81,35	0,23
8	9	6	65	84,93	0,18
9	0,96	4	60	28,19	0,65
10	11,04	4	60	78,65	0,27
11	6	0,64	60	45,03	0,24
12	6	7,36	60	76,89	0,23
13	6	4	51,6	57,64	0,41
14	6	4	68,4	76,15	0,23
15	6	4	60	84,22	0,19
16	6	4	60	81,35	0,23
17	6	4	60	80,45	0,24

DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, MGA = monoacilglicerol acetilado.

Os resultados de rendimento de monoacilgliceróis acetilados variam de 25% a 84% e os valores da relação DG/MG variam de 0,18 a 0,65. Em todos os ensaios houve formação de MGA e DG e, ausência de AGL, verificando a importância da utilização de vácuo durante a reação. Esses resultados foram avaliados estatisticamente através do programa Statistica, sendo a influência das variáveis independentes sobre o rendimento de monoacilgliceróis e a relação de DG/MG produzidos analisada através do ajuste de superfície de resposta, retirando os efeitos não significativos. Os resultados obtidos nesta análise, ou

seja, a estimativa do efeito das variáveis independentes, erro padrão e coeficientes de regressão estão apresentados na Tabela 13, sendo que os efeitos não significativos então em negrito.

Tabela 13. Estimativa dos efeitos e coeficientes de regressão das variáveis rendimento de MG e relação DG/MG, da síntese de monoacilgliceróis acetilados, conforme planejamento experimental fatorial completo (2^3).

Respostas	Fator	Efeito	Erro Padrão	P	Coefficiente de regressão
% MGA	Interação principal	81,4498	1,134530	0,000194	81,4498
	Tempo (L)	29,3206	1,065570	0,001318	14,6603
	Tempo (Q)	-16,3774	1,172815	0,005089	-8,1887
	% Enzima(L)	23,4918	1,065570	0,002051	11,7459
	% Enzima(Q)	-11,0458	1,172815	0,011086	-5,5229
	Temperatura(L)	5,7788	1,065570	0,032360	2,8894
	Temperatura(Q)	-6,8491	1,172815	0,028092	-3,4246
	Tempo X Enz.	-24,7775	1,392234	0,003142	-12,3888
	Tempo X Temp.	-1,6125*	1,392234*	0,366393*	-0,8062*
	Enz. X Temp.	0,9375*	1,392234*	0,570096*	0,4688*
MG/DG	Interação principal	0,222522	0,015245	0,004661	0,222522
	Tempo (L)	-0,212213	0,014319	0,004522	-0,106107
	Tempo (Q)	0,152329	0,015760	0,010535	0,076164
	% Enzima(L)	-0,083342	0,014319	0,028272	-0,041671
	% Enzima(Q)	0,017979*	0,015760*	0,372149*	0,008989*
	Temperatura(L)	-0,054584*	0,014319*	0,062438*	-0,027292*
	Temperatura(Q)	0,053334*	0,015760*	0,077324*	0,026667*
	Tempo X Enz.	0,142500	0,018708	0,016803	0,071250
	Tempo X Temp.	0,012500*	0,018708*	0,572821*	0,006250*
	Enz. X Temp.	-0,022500*	0,018708*	0,352166*	-0,011250*

Valores em negrito não são significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

L = Efeito Linear, Q = Efeito Quadrático, EP = Erro Puro, * não significativo

Como pode ser observado na Tabela 13, os efeitos do tempo, temperatura e concentração da enzima, lineares e quadráticos foram significativos sobre o rendimento de monoacilgliceróis, assim como a interação entre o tempo e a concentração de enzima.

A influência linear do tempo, da concentração de enzima e da temperatura sobre o rendimento de MG é positiva, ou seja, a influência é maior conforme aumentam os valores dessas variáveis. Os efeitos quadráticos têm influência negativa, indicando que aumentos maiores dessas variáveis implicam na diminuição do rendimento de monoacilgliceróis.

Ao contrário do que constataram Pinsirodom et al. (2004) na esterificação enzimática de ácidos graxos com glicerol, onde a redução da temperatura da reação implica em um maior rendimento de MG, neste estudo durante a interesterificação o rendimento de monoacilglicerol aumentou com o aumento da temperatura, embora o efeito quadrático da temperatura indica que um grande aumento de temperatura implica numa diminuição na produção de MG.

Para a resposta relação DG/MG, os efeitos lineares de tempo e de concentração de enzima, de tempo quadrático e da interação entre tempo e concentração de enzima. Os coeficientes de regressão para as duas respostas %MGA e DG/MG foram 0,95 e 0,80, significando que os modelos de regressão explicam pelo menos 80% da variação dos dados observados.

As Tabelas 14 e 15 apresentam a análise de variância do modelo ajustado para as respostas %MGA e DG/MG, respectivamente. Em ambos os casos a regressão foi significativa, ou seja, o $F_{calculado}$ é maior que o $F_{tabelado}$, e sendo assim os modelos podem ser utilizados para fins preditivos, pois o $F_{tabelado}$ é 3 vezes menor que o $F_{calculado}$.

Tabela 14. Análise de variância do modelo ajustado para %MGA obtida por via enzimática.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F cal.	F tab. (5%)
Regressão	6767,312	8	845,914	18,0392	3,44
Resíduo	379,142	8	47,39275		
Falta de Ajuste	371,389	7	53,05557		
Erro Puro	7,753	2	3,8765		
Total	7416,454	16	436,528375		

Valores significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

F cal. = F calculado; F tab. = F tabelado.

Tabela 15. Análise de variância do modelo ajustado para relação DG/MG.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F cal.	F tab. (5%)
Regressão	0,278388	4	0,0695597	12,26	3,26
Resíduo	0,068118	12	0,0056765		
Falta de Ajuste	0,066718	10	0,0066718		
Erro Puro	0,001400	2	0,0007		
Total	0,346506	16	0,0216566		

Valores significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

F cal. = F calculado; F tab. = F tabelado.

As superfícies de contorno ajustadas para as respostas %MGA e relação DG/MG estão apresentadas na Figura 16.

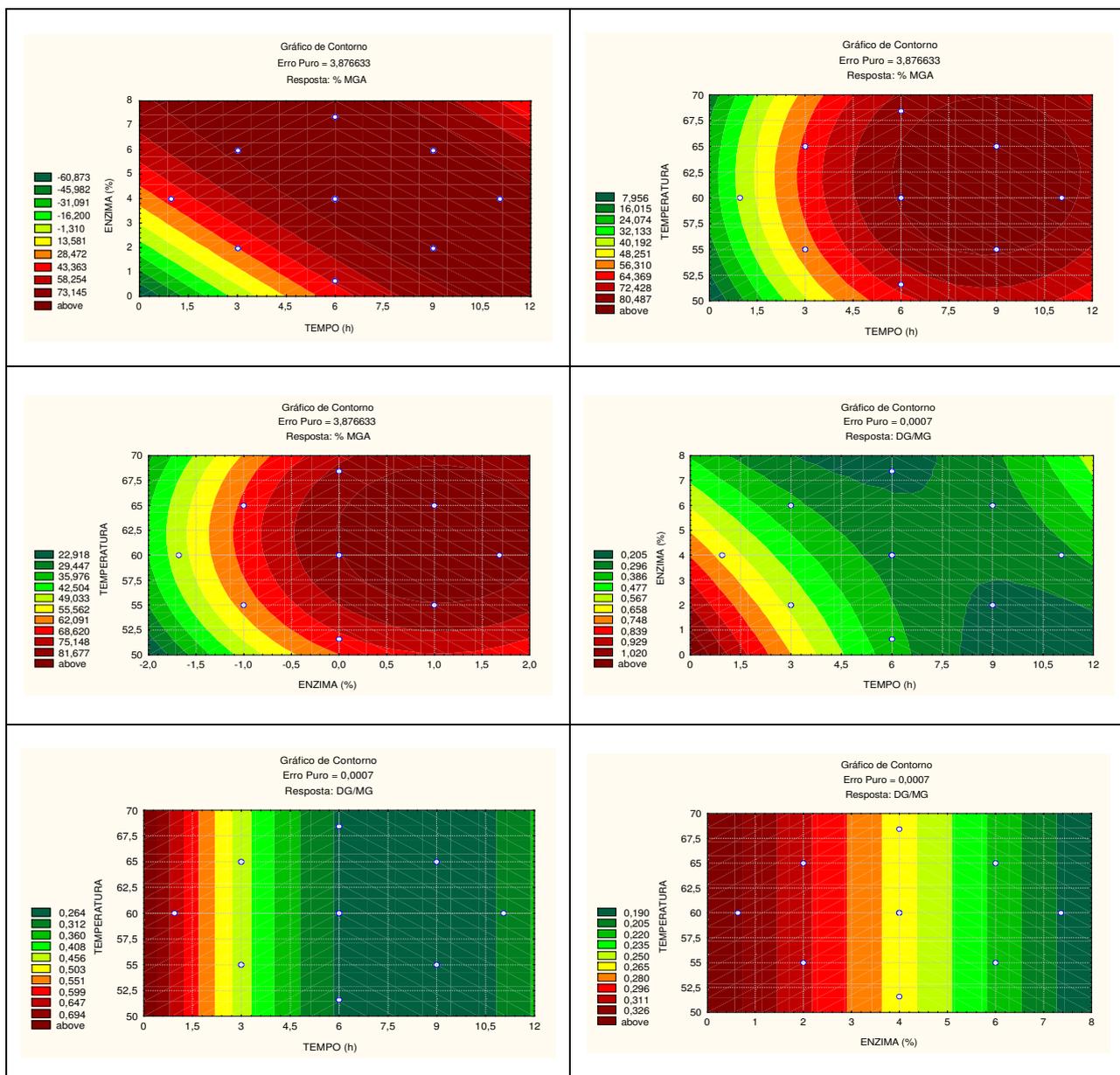


Figura 16. Superfícies de Contorno referentes às variáveis % MGA e DG/MG na síntese enzimática de MGA.

Observa-se na Figura 16 uma influência linear do tempo e concentração de enzima sobre o rendimento de MGA nos ensaios estudados, atingindo valores acima de 73%. Aumentando os valores de tempo e concentração de enzima, estes valores diminuem devido ao efeito quadrático. Nas interações de temperatura e tempo, e temperatura e concentração de enzima, observa-se um

comportamento similar, com rendimento de MG acima de 80% na faixa ótima. Para a resposta relação DG/MG os menores valores obtidos encontram-se nas temperaturas superiores a 60°C, e tempo de pelo menos 4 horas de reação.

Pela observação dos gráficos de contorno, nas regiões de maior rendimento, através de sobreposição das faixas ótimas (regiões em vermelho) dos gráficos para a resposta rendimento de monoacilgliceróis, e das regiões de menores valores para a resposta relação MG/DG (regiões em verde) pode-se notar que para a síntese de monoacilgliceróis acetilados, a condição ótima foi 6 horas de reação, a 65°C e utilizando 4% de enzima.

5.3. REUTILIZAÇÃO DA ENZIMA

Utilizando a enzima *Lipozyme IM* na reação entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina em 3 ciclos subseqüentes não foram obtidos monoacilgliceróis, apenas diacilgliceróis (Tabela 16). Esta enzima produz cerca de 40% de diacilgliceróis em apenas 2 horas de reação, considerando o produto purificado. O rendimento de diacilgliceróis diminui com o tempo de reação, e este comportamento se repete nos três ciclos sucessivos. A enzima não foi eficiente para a produção de monoacilgliceróis acetilados.

Tabela 16. Rendimentos das reações entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima *Lipozyme IM* (7%) em três ciclos.

	Tempo (h)	% TG	% DG	% MG	% TA
1º ciclo	2	53,14	20,26	-	26,60
	4	13,39	8,07	-	78,55
	6	14,34	30,59	-	55,07
2º ciclo	2	7,21	6,14	-	86,65
	4	29,67	18,44	-	51,88
	6	38,26	23,02	-	38,72
3º ciclo	2	10,55	18,42	-	84,43
	4	18,96	13,25	-	67,78
	6	59,96	18,92	-	21,11

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina.

A Tabela 17 apresenta os rendimentos obtidos da reação de interesterificação enzimática de gordura vegetal hidrogenada e triacetina, na proporção de 1:3, na presença de *Lipozyme RM IM* nos quatro ciclos. Observa-se uma produção reduzida de monoacilglicerol, em torno de 6%, no quarto ciclo após 6 horas de reação, o que poderia ser explicado por um possível condicionamento da enzima ao processo, sendo que depois de 8 horas a porcentagem de monoacilglicerol foi superior a 13%.

A partir dos resultados obtidos nos testes, a enzima selecionada foi a *Lipozyme TL IM*, a única que mostrou-se eficiente na síntese de monoacilgliceróis acetilados, conforme apresentado no item seleção de enzima. Os testes de reutilização dessa enzima estão apresentados no item 3.3. Reutilização da enzima.

Tabela 17. Rendimentos das reações entre gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 60°C, utilizando enzima *Lipozyme RM* (7%) em quatro ciclos.

	Tempo (h)	% TG	% DG	% MG	% TA
1° ciclo	2	13,39	8,07	-	78,55
	4	53,14	20,26	-	26,60
	6	14,02	29,90	-	53,84
2° ciclo	2	38,35	3,03	-	58,62
	4	55,30	16,83	-	27,87
	6	30,07	17,19	-	52,74
3° ciclo	2	33,33	9,74	-	56,94
	4	23,41	13,44	-	63,15
	6	39,83	21,54	-	38,63
4° ciclo	2	15,83	4,04	-	80,13
	4	43,44	22,93	-	33,63
	6	26,34	6,31	6,94	60,41
	8	31,32	70,58	13,54	47,55

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, AGL = ácidos graxos livres, TA = triacetina.

Nas condições estudadas a faixa ótima para a síntese de monoacilgliceróis é de 6 horas de reação, a 65°C e utilizando 4% de enzima. Utilizando a faixa ótima obtida foram realizados os testes de reutilização da enzima e os rendimentos obtidos considerando o produto destilado estão apresentados na Tabela 18.

Utilizando a lipase sem adição de 10% de enzima nova o rendimento de cerca de 80% se mantém no segundo ciclo, sendo que já no terceiro ciclo o rendimento diminui para aproximadamente 70%. Após a quarta reutilização não é mais vantajoso o processo, pois o rendimento é inferior a 50%.

Tabela 18. Rendimentos obtidos na reutilização da enzima *Lipozyme TL IM* na síntese enzimática de MGA, a partir de gordura vegetal hidrogenada e triacetina (1:3), a 65°C, na presença de 4% de enzima.

	Ciclo	%MG	%DG	%TG
Enzima reutilizada sem reposição de enzima	1°	83,52	16,48	-
	2°	80,31	17,69	-
	3°	67,71	17,51	14,78
	4°	59,30	15,30	25,52
	5°	49,68	18,30	32,02
	6°	45,07	16,74	38,19
	7°	30,74	12,06	57,20
Enzima reutilizada com adição de 10% de enzima nova	1°	83,62	16,38	-
	2°	84,0	16,0	-
	3°	80,8	16,5	-
	4°	81,2	14,7	4,1
	5°	75,57	17,90	6,53
	6°	70,93	17,18	11,89
	7°	49,96	14,73	35,31
	8°	41,51	11,94	46,55
	9°	40,72	8,96	50,32

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol.

Quando foram sintetizados MGA utilizando a enzima com adição de 10% de enzima nova é possível reutilizar a enzima 4 vezes sem que o rendimento diminua, após a quinta reutilização ou ciclo, o rendimento tem uma queda, sendo que os triacilgliceróis não são totalmente convertidos em MGA e DGA. O rendimento continua diminuindo nas reutilizações subseqüentes, até o sexto ciclo o rendimento é de 70%, a partir do sétimo ciclo não é mais interessante a reutilização da enzima, pois o rendimento é inferior a 50%.

Os resultados mostram que é possível reutilizar a enzima *Lipozyme TL IM* na reação de síntese de monoacilgliceróis acetilados. Segundo Akoh (1995) as

enzimas imobilizadas podem ser reutilizadas tornando o processo viável do ponto de vista comercial. Rosu et al (1997) reutilizaram enzima comercial imobilizada na glicerólise de azeite de oliva, após 6 ciclos de reutilização o rendimento foi de 78% e aumentando o tempo de 72h para 96h no décimo ciclo obtiveram um rendimento de 60% de MG. Assim como foi observada pelos autores que a velocidade da reação de formação de MG diminui gradualmente com o número de reutilizações da enzima, pode-se observar que na síntese enzimática de MGA o rendimento diminui gradualmente com o número de reutilizações da enzima e, com a adição de 10% de enzima nova o rendimento pode ser mantido até 4 ciclos, diminuindo gradualmente nos ciclos subseqüentes.

As amostras obtidas nas reutilizações apresentaram características físicas iguais aos produtos obtidos nas reações de primeiro ciclo, coloração suave, odor acentuado de ácido acético, e cristalização sob resfriamento.

Foi observado que o produto após a reação, sem purificação, quando armazenado sob resfriamento apresentou diferença de fases. Para avaliar cada fase ou camada, foram separadas amostras referentes as diferentes fases, resfriando a mistura MG-DG e triacetina por 24 horas em funil separador. As amostras foram injetadas no cromatógrafo HPSEC, o resultado indicou que ambas as amostras apresentaram as mesmas proporções em MG, DG e triacetina. A diferença de fases pode ser devida ao polimorfismo dos monoacilgliceróis (HARTMAN, 1968; KROG, 1997).

5.4. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MGA OBTIDO POR SÍNTESE ENZIMÁTICA

a) Os primeiros testes de destilação do produto foram realizados a partir dos produtos obtidos das reações utilizando a enzima *Lipozyme RM IM*, para acertar os parâmetros de temperatura e vácuo e verificar a retirada por destilação da triacetina. O primeiro teste foi realizado com o produto da reação do quarto ciclo com enzima *Lipozyme RM IM*, após 8 horas de reação (Tabela 12). A

temperatura de destilação foi 240°C, o produto sofreu termoxidação ficando muito escuro devido à alta temperatura e tempo longo do processo. A composição do produto após a reação e após a destilação consta na Tabela 19, sendo o destilado 100% triacetina e o produto apresentando ainda 7,66% de triacetina.

Tabela 19. Rendimento da reação de síntese de MGA a partir de GVH e triacetina, utilizando *Lipozyme RM IM*(7%) e, composição do produto após destilação.

	Após reação	Após destilação
TG (%)	31,32	55,34
DG (%)	7,58	13,70
MG (%)	13,54	23,29
TA (%)	47,55	7,66

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

b) Os testes seguintes foram realizados com a proporção indicada pela otimização, ou seja, reação entre GVH e triacetina (1:3), na presença de *Lipozyme TL IM* e após 6 horas de reação. A Tabela 20 apresenta o rendimento da reação e da destilação, sendo que o destilado apresentou apenas triacetina.

Tabela 20. Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* e após destilações para purificação do produto.

	Após reação	Após destilação
DG (%)	7,83%	13,33%
MG (%)	48,39%	73,66%
AGL (%)	-	8,5%
TA (%)	43,77	4,49%

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

Após a destilação houve a formação de 8,5% de AGL. Este produto foi analisado quando ao índice de iodo, índice de saponificação e acidez, e os resultados estão na Tabela 21. O produto obtido apresentou acidez elevada, 6,18%, e foi submetido a um processo de neutralização com NaOH, como descrito em material e métodos no subitem b do item 2.3.5. Após a primeira neutralização o produto apresentou acidez 4,5 (2,24% AGL), sendo neutralizado novamente, e a acidez final foi 1,66.

Tabela 21. Caracterização do produto obtido da reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* após destilação.

	Produto (MGA)	Produto neutralizado
Índice de Iodo	44,97	44,97
Índice de Saponificação	389	379
Acidez	6,18	1,66

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

O rendimento da reação foi avaliado, sendo que do total de massa dos substratos, apenas 26,3% se converteu em produto após destilação. O rendimento do processo caiu 50% com a neutralização, pois ocorreram perdas significativas durante as lavagens do produto na neutralização. Sendo assim o controle do processo de reação e destilação é importante para evitar a formação de AGL e manter o rendimento do processo, descartando a etapa de neutralização.

Foi realizada mais uma reação entre GVH e triacetina (1:3), na presença de *Lipozyme TL IM* por 6 horas, e o produto obtido foi destilado. Após análise em HPSEC foi determinada a presença de 28,07% de triacetina, sendo que o produto submetido a nova destilação, apresentou então 6,38% de triacetina e foi submetido a mais uma destilação, que também não retirou completamente a triacetina do produto (Tabela 22).

Tabela 22. Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* e após destilações para purificação do produto.

(%)	Antes destilação	Após 1 ^a destilação	Após 2 ^a destilação	Após 3 ^a destilação
TG	-	-	-	-
DG	9,41	10,64	21,03	12,92
MG	48,09	61,28	72,59	81,17
AGL	-	-	-	-
TA	42,50	28,07	6,38	5,9

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

c) Destilação do produto obtido do segundo ciclo da reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de *Lipozyme TL IM*, após 6 horas. O produto foi dividido em duas parcelas a serem destiladas, os resultados de rendimentos após destilações da primeira parcela encontram-se na Tabela 23. Foram necessárias quatro destilações para que a triacetina fosse totalmente retirada do produto.

Tabela 23. Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* e após destilações para purificação do produto.

(%)	Antes destilação	Após 1 ^a destilação	Após 2 ^a destilação	Após 3 ^a destilação	Após 4 ^a destilação
DG	9,05	9,97	10,55	13,80	16,89
MG	46,18	57,24	59,79	71,59	80,07
AGL	-	-	-	-	-
TA	44,76	32,79	29,66	14,61	-

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

A partir da segunda parcela do produto do segundo ciclo da reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de *Lipozyme TL IM* foram realizadas três destilações, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* e após destilações para purificação do produto.

(%)	Antes destilação	Após 1 ^a destilação	Após 2 ^a destilação	Após 3 ^a destilação
DG	9,05	12,61	13,11	20,51
MG	46,18	72,39	76,82	79,49
AGL	-	1,91	-	-
TA	44,76	13,09	10,07	-

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

d) Destilação do produto nas condições otimizadas reação entre GVH e triacetina (1:3) na presença de 4% de *Lipozyme TL IM*, temperatura 65°C, vácuo entre 8 e 6 mbar e 6 horas de duração. As condições da destilação foram: vácuo 27 mbar, temperatura de início da destilação 120°C, e injeção de nitrogênio. Realizando a destilação com presença de nitrogênio o produto final apresentou uma coloração dentro do padrão desejado, a presença de nitrogênio durante a destilação previne o escurecimento por oxidação.

Tabela 25. Rendimentos obtidos após reação de GVH e TA na presença de *Lipozyme TL IM* e após destilação para purificação do produto.

(%)	Antes destilação	Após destilação
TG	-	-
DG	8,20	13,99
MG	45,46	86,01
TA	46,32	-

TG = triacilglicerol, DG = diacilglicerol, MG = monoacilglicerol, TA = triacetina, GVH = gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

Os cromatogramas HPSEC do produto obtido MGA e do *Myvacet 9-45* são mostrados nas Figuras 17 e 18. A caracterização do produto final obtida por via

enzimática e os valores de referência do produto comercial *Myvacet 9-45*, são apresentados na Tabela 26 e a composição em ácidos graxos do produto obtido e do produto análogo comercial na Tabela 27. O produto apresentou leve odor de ácido acético e cristalizou sob refrigeração, ocorrendo diferença de fases. A triacetina destilada também foi analisada por HPSEC e apresentou pureza de 100% (Figura 19).

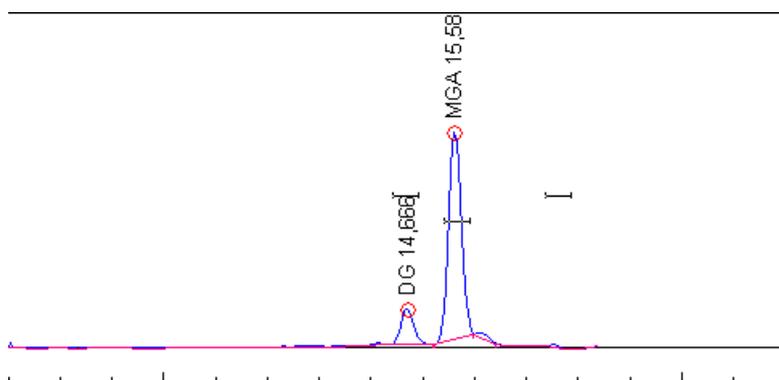


Figura 17. Cromatograma do produto monoacilglicerol acetilado obtido por via enzimática a partir de gordura parcialmente hidrogenada de soja e triacetina.

DG = Diacilgliceróis; MGA = Monoacilgliceróis Acetilados

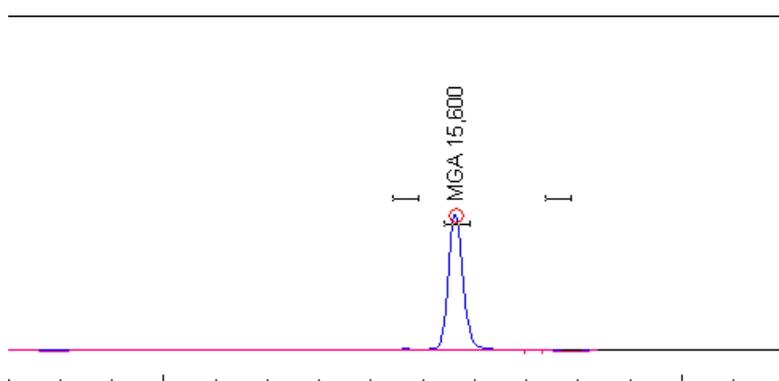


Figura 18. Cromatograma do produto comercial *Myvacet 9-45* (Monoacilglicerol Acetilado).

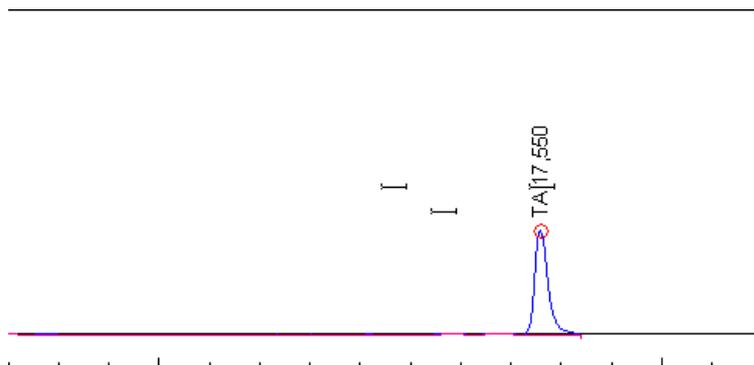


Figura 19. Cromatograma da triacetina (TA) após destilação para purificação do monoacilglicerol acetilado obtido por via enzimática.

Tabela 26. Caracterização do MGA obtido por síntese enzimática.

	Especificação Myvacet 9-45	Myvacet 9-45	MGA
Índice de Iodo (g iodo / 100 g)	43-53	46	44,9
Índice de Saponificação (mg KOH / g)	370-382	380	379
Acidez (% AGL)	<3	0,54	1,66
Cor Lovibond	1,2-2,7y 0,3-1,4r	0,9y 0,3r	2,5y 1,2r
Valor de Hidroxila (mg KOH / g)	0-15	8	14,67

A composição em ácidos graxos depende da composição dos substratos, assim o MGA sintetizado neste estudo apresentou alguma diferença em ácidos graxos em relação ao produto comercial. O produto final obtido se enquadra nas especificações do produto similar de encontrado no mercado e as especificações da FAO (2003).

Tabela 27. Composição em ácidos graxos do produto MGA obtido por síntese enzimática e do produto comercial.

Ácido Graxo		MGA	<i>Myvacet 9-45</i>
C12:0	Láurico	-	0,13
C14:0	Mirístico	-	0,23
C16:0	Palmítico	11,50	12,80
C18:0	Estearico	9,21	12,09
C18:1	Oléico	71,82	69,72
C18:2	Linoleico	7,47	4,56
C20:0	Araquídico	-	0,24
C22:0	Behênico	-	0,25

MGA = monoacilglicerol acetilado.

6. CONCLUSÕES

Das quatro lipases testadas, *Lipozyme*[®] TL 100L, *Lipozyme*[®] IM, *Lipozyme*[®] RM IM e *Lipozyme*[®] TL IM (todas da Novozymes) para a síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados, somente a *Lipozyme*[®] TL IM mostrou-se eficiente. As enzimas *Lipozyme* IM, *Lipozyme* RM IM produziram apenas diacilgliceróis.

As condições ótimas para a síntese enzimática de monoacilgliceróis acetilados com enzima *Lipozyme* TL IM, a partir de triacetina e gordura vegetal hidrogenada foram: temperatura de 65°C, 6 horas e 4% de enzima, com rendimento de até 86% de monoacilgliceróis acetilados.

A enzima *Lipozyme* TL IM pode ser reutilizada por até 3 vezes com alto rendimento, em torno de 67%, sendo que com a adição de 10% pode ser reutilizada por até 6 vezes com rendimento superior a 70%.

Como processo de purificação pode ser utilizada uma destilação simples, sob vácuo e nitrogênio. O monoacilglicerol acetilado obtido pelo processo enzimático proposto, possui características similares as do produto análogo comercial *Myvacet* 9-45.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOH, C.C. Structured lipids – enzymatic approach. **Inform**, Champaign, v.6, n.9, p.1055-1061, 1995.

AVENA-BUSTILLOS, R.J.; KROCHTA, J. M.; SALTVEIT, M.E. Water vapor resistance of red delicious apples and celery sticks coated with edible caseinate-acetylated monoglyceride films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.2, p.351-354, 1997.

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**, 5ed., Champaign, 2002.

BANCQUART, S.; VANHOVE, C.; POUILLOUS, Y.; BARRAULT, J. The synthesis of monoglycerides through the catalysed transesterification of basic oxides. **OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides**, Montrouge, v.8, n.3, p.253-257, may-jun. 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora UNICAMP, 1995. 229p.

BIRNBAUM, H. The Monoglycerides: Manufacture, Concentration, Derivatives and Applications. **Bakers Digest**, Merriam, p.6-18, dec. 1981.

BORNSCHEUER, U.T.; YAMANE, T. Fatty acid vinyl esters as acylating agents: a new method for the enzymatic synthesis of monoacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.2, p.163-258, 1995.

BOSSAERT, W.D.; DE VOS, D.E., RHIJN, W.M.V.; BULLEN, J. GROBET, P.J.; JACOBS, P.A. Mesoporous sulfonic acids as selective heterogeneous catalysts for the synthesis of monoglycerides. **Journal of Catalysis**, New York, v.182, p.156-164, 1999.

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

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

ELFMAN-BÖRJESSON, I.; HÄRRÖD, M. Synthesis of MG by Glycerolysis of Rapeseed Oil Using Immobilized Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.76, n.6, p.701-707, 1999.

FAO. **Nutrition Meetings Report Series** n. 40 A, B, C. Disponível em: <http://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj17.htm>. Acesso em: 23 de abril de 2007.

FERREIRA DIAS, S.; DA FONSECA, M.M.R. Production of monoglycerides by glycerolysis of olive oil with immobilized lipases-effect of the water activity. **Bioprocess Engineering**, New York, v.12, n.6, p.327-337, may. 1995.

FREGOLETE, L.V.; BATISTELLA, C.B.; MACIEL FILHO, R.; MACIEL, M.R.W. Response Surface Methodology Applied to Optimization of Distilled Monoglycerides Production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.82, n.9, p.673-678, 2005.

GARCIA,T.; MARTINEZ, M.; GARCIA, D.; ARACIL, J. Regioselective synthesis of monoglycerides. Kinetic modeling. **Reaction Kinetics and the Development of Catalytic Process Studies in Surface Science and Catalysis**, Amsterdam, v.122, p.325-332, 1999.

GRUGER Jr, E.H.; MALLINS, D.C.; GAUGLITZ Jr., E.J. Glycerolysis of marine oils and the preparation of acetylated monoglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.37, n.5, p.214-217, 1960.

GUNSTONE, F.D. Fatty Acids and Lipids Structure. In: GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. **Lipid Technologies and Applications**, New York: M. Dekker, 1997, cap. 1, p. 1-17.

GURR, M. Lipids and Nutrition. In: GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. **Lipid Technologies and Applications**, New York: M. Dekker, 1997, cap. 4, p. 79-112.

HARTMAN, L. Produção e usos de monoglicerídeos de ácidos graxos. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.16, p.33-40, 1968.

HEGENBART, S. **Emulsifier Applications**. Disponível em: <http://www.foodproductdesign.com/archive/1995/1095DE.html>. Acesso em: 23 de abril 2007.

HOFFMANN, G. **The Chemistry and Technology of Oils and Fats and their High Fat Products**. San Diego: Academic Press, 1989.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, M. Bacterial lipases. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.15, p.29-63, 1994.

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

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

KOMMURU, T.R.; GURLEY, B.; KHAN, M.A.; REDDY, I.K. Self-emulsifying drug delivery systems (SEEDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics Kidlington**, v.212, n.2, p.233-246, jan. 2001.

KONOPACKA, D.; PLOCHARSKI, W. Water vapor uptake by fat-free apple chips decreased by emulsifiers. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n.4, 2002.

KROG, N. Food Emulsifiers. In: GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. **Lipid Technologies and Applications**, New York: M. Dekker, 1997, cap.20.

KUO, S.J.; PARKIN, K.L. Acetylacylglycerol formation by lipase in microaqueous milieu: effects of acetyl group donor and environmental factors. **Journal of Food Chemistry**, v.43, p.1775-1783, 1995.

LANGONE, M.A.P.; DE ABREU, M.E.; REZENDE, M.J.C.; SANT'ANNA, G.L. Enzymatic synthesis of medium chain monoglycerides in a solvent-free system. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.98, p.987-996, 2002.

LEE, G.C.; WANG, D.L.; HO, Y.F.; SHAW, J.F. Lipase-Catalyzed Alcoholysis of Triglycerides for Short-Chain Monoglyceride Production. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.81, n.6, p.533-536, 2004.

LEE, J.Y.; KIM, Y.S.; SHIN, D.H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.7, p.2193-2199, 2002.

LEE, K.T.; AKOH, C.C. Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.75, n.11, p.1533-1537, 1998.

LIN, X.H.; CHUAH, G.K.; JAENICKE, S. Base-functionalized MCM-41 as catalysts for the synthesis of monoglycerides. **Journal of Molecular Catalysis A-Chemical**, Amsterdam, v.150, n.1-2, p.287-294, dec. 1999.

MACHADO, M.S.; PÉREZ-PARIENTE, J.; SASTRE, E.; CARDOSO, D.; GUEREÑU, A.M. Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves. **Applied Catalysis A: General**, Amsterdam, v.254, p.173-188, 2003.

MACIERZANKA, A.; SZELAG, H. Esterification Kinetics of Glycerol with Fatty Acids in the Presence of Zinc Carboxylates: Preparation of Modified Acylglycerol Emulsifiers. **Industrial Engineering Chemistry Research**, Washington, v.43, p.7744-7753, 2004.

MACRAE, A.R. Lipase-catalysed interesterification of oils and fats. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.60, n.2, p.243-246, 1985.

MATE, J.I.; KROCHTA, J.M. Whey protein and acetylated monoglyceride edible coatings: effect on the rancidity process of walnuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.45, n.7, p.2509-2513, 1997.

McNEILL, G.P.; BOROWITZ, D.; BERGER, R.G. Selective Distribution of Saturated Fatty Acids into the Monoglyceride Fraction During Enzymatic Glycerolysis. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.69, n.11, nov.1992.

McNEILL, G.P.; SONNET, P.E. Low-calorie triglyceride synthesis by lipase-catalysed esterification of monoglycerides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, n.11, p.1301-1307, nov. 1995.

McNEILL, G.P.; YAMANE, T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.68, n.1, p.6-10, jan 1991.

MIKKELSEN, B. Emulsifiers in chewing gum. **Manufacturing Confectioner**, Glen Rock, v.80, n.1, p.63-66, 2000.

MIURA, S.; YAMAMOTO, A., KONISHI, H. Effect of agglomeration of triacylglycerols on the stabilization of a model cream. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.104, n.222, p.222-227, 2002.

MORRIS, C.E. Engineered emulsifiers help reduce fats. **Food Engineering**, New York, p.135-138, oct. 1991.

MU, H.L.; XU, X.; HOY, C.E. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalysed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.75, n.9, p.1187-1193, 1998.

MUKERJEE, K.D. Fats and oils biotechnology: present and future applications. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO LATINOAMERICANO SOBRE PROCESSAMENTO DE ÓLEOS E GORDURAS, 1995, Campinas. **Anais**. Campinas: Unicamp. P.67-74.

NAKAJIMA, Y. Water-retaining ability of diacylglycerol. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.81, n.10, p.907-912, 2004.

NOVOZYMES, 2003. **Ficha técnica Novozymes: Óleos e Gorduras/2003-06951-03.pdf**. Araucária, 2003.

PARK, H.J., CHINNAN, M.S. Gas and Water Vapor Barrier Properties of Edible Films from Protein and Cellulosic Materials. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.25, p.497-507, 1995.

PASTOR, E.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Synthesis of monoyleglycerol and dioleylglycerol using an immobilized lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.50, n.3, p.251-263, mar. 1995.

PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. Produção de Monoleína por Lipase Microbiana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.13, n.1, p.13-21, jan/jun. 1993.

PEDERSON, S.B.; HOLMER, G. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor Miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.72, p.239-243, 1995.

PÉREZ-PARIENTE, J.; DÍAZ, I.; MOHINO, F.; SASTRE, E. Selective synthesis of fatty monoglycerides by using □unctionalized mesoporous catalysts. **Applied Catalysis A: General**, Amsterdam, v.254, p.173-188, 2003.

PINSIRODOM, P.; WATANABE, Y.; NAGAO, T.; SUGIHARA, A.; KOBAYASHI, T.; SHIMADA, Y. Critical Temperatura for Production of MAG by Esterification of Different FA with Glycerol Using *Penicillium camembertii* Lipase. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.81, n.6, p.543-547, 2004.

POUILLOUX, Y.; ABRO, S.; VANHOVE, C.; BARRAULT, J. Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins Preparation of monoglycerides. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v.149, p.243-254, 1999.

RIHAKOVA, Z.; FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKEL, J.; CERVENKOVA, R. Inhibition of *Aspergillus niger* DMF 0801 by monoacylglycerols prepared from coconut oil. **Czech Journal of Food Science**, v.20, n.2, p.48-52, 2002.

RIKEN VITAMIN. Disponível em: <http://www.riken-vita.co.jp/int/emulsifier/basic/kind.html#AMG>. Acesso em: 23 de abril de 2007.

ROSU, R.; UOZUKI, Y.; IAWASAKI, Y.; YAMANE, T. Repeated use of imobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.74, n.4, p.445-450, 1997.

ROZENALL, A. Interesterification of oils and fats. **Inform**, Champaign, v.3, n.11, p.1232-1237, nov.1992.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; OSAKI, S.; NAKANISHI, K. Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from *Pseudomonas sp* LP7315. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.91, n.1, p.27-32, jan. 2001a.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; TANAKA, A.; OSAKI, S.; NAKANISHI, K. Analysis of Monoglyceride Synthetic Reaction in a Solvent-Free Two-Phase System Catalyzed by a Monoacylglycerol Lipase from *Pseudomonas sp*. LP7315. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.91, n.1, p.27-32, jan. 2001b.

SECTZER, J.R. Emulsification: the secret behind the perfect treat. **Candy Industry**, New York, v.166, n.8, p.34-38, aug. 2001.

SHELLHAMMER, T.H.; KROCHTA, J.M. Edible Coatings and Film Barriers. In: GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. **Lipid Technologies and Applications**, New York: M. Dekker, 1997, cap. 17, p. 453-479.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; SCHMID, U., SCHMID, R.D. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. **Fett Lipid**, Leinfelden, v.100, n.4-5, p.156-160, 1998.

STUCHELL, Y.M.; KROCHTA, J.M. Edible coatings on frozen King salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.1, p.28-31, 1995.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; YAMAUCHI-SATO, Y.; KASAI, M.; YAMAMOTO, T.; TSUTSUMI, K.; TOMINAGA, Y.; SUGIHARA, A. Synthesis of MAG of CLA with *Penicillium camembertii* Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.79, n.9, p.891-896, 2002.

WILLIS, W. M.; MARANGONI, A. G. Enzymatic Interesterification. In: AKOH, C.C.; MIND, D.B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. First edition. New York: M. Dekker, Inc., 1998, p. 665-698.

WONGSAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; BORNSCHEUER, U.T.; H-KITTIKUN, A. Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil immobilized lipases. **European Journal Lipid Science Technology**, Weinheim, v.105, p.68-73, 2002.

XU, X.; A.R.H., SKANDS; C.E., HOY; H., MU; S., BALDEN; J., A.N. Production of Specific-Structured Lipids by Enzymatic Interesterification: Elucidation of Acyl Migration by Response Surface Design. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.75, n.9, p.1179-1186, 1998.

XU, X.; UM, H.; SKANDS, A.R.H.; HOY, C.E.; ADLER-NISSEN, J. Parameters affecting diacylglycerols formation during the production of specific-structured lipids by lipase-catalysed interesterification. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.76, n.2, p.175-181, 1999.

YAHYA, A.R.M.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.23, p.438-450, 1998.

YANG, T.K.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X.B. Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and efficient reaction system. **Journal of Food Lipids**, v.12, n.4, p.299-312, 2005.

YESILOGU, Y.; KILIC, I. Lipase-Catalyzed Esterification of Glycerol and Oleic Acid. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.81, n.3, p.281-284, 2004.

YU, C.C.; LEE, Y.S.; CHEON, B.S.; LEE, S.H. Synthesis of Glycerol Monostearate with High Purity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v.24, n.8, p.1229-1231, 2003.

ANEXO

Tabela 1. Caracterização da gordura vegetal hidrogenada (Fatgill 38).

Fatgill 38	
Acidez (% AGL)	0,04
Sabão (ppm)	isento
Índice de Iodo (g iodo / 100 g)	78,0
Índice de Peróxido (Meq/Kg)	0,00
Cor Lovibond	9,0y 0,7r
Ponto de Fusão (°C)	37,4
Sabor	neutro

Tabela 2. Curva de sólidos (SFC) da gordura hidrogenada Fatgill38.

Temperatura °C	%
10,0	47,6
21,1	23,3
26,7	13,9
33,3	5,6

Tabela 3. Caracterização da triacetina.

Triacetina Neugel	
Acidez (mgKOH/g)	0,01
Índice de Refração	1,430
Gravidade Específica	1,157
Cor (APHA)	3
Umidade KF (%)	0,0