



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Departamento de Processos Químicos

**OBTENÇÃO DE MONOACILGLICEROL DE ALTA
CONCENTRAÇÃO ATRAVÉS DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA E
DESTILAÇÃO MOLECULAR**

Patricia Bogalhos Lucente Fregolente

Maria Regina Wolf-Maciel

Orientadora

Glauca Maria Ferreira Pinto

Co-orientadora

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

F881o Fregolente, Patricia Bogalhos Lucente
Obtenção de monoacilglicerol de alta concentração
através de glicerólise enzimática e destilação molecular /
Patricia Bogalhos Lucente Fregolente. --Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

Orientadores: Maria Regina Wolf Maciel, Gláucia
Maria Ferreira Pinto.

Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipase. 2. Destilação molecular. 3.
Monoglicérides. I. Macie, Maria Regina Wolf. II.
Pinto, Gláucia Maria Ferreira. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Título em Inglês: Production of high-concentration monoacylglycerol through lipase-
catalyzed glycerolysis and molecular distillation

Palavras-chave em Inglês: Lipase, Molecular distillation, Monoacylglycerol

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Patricia de Oliveira Carvalho, Roseli Aparecida Ferrari, Renato
Grimaldi, César Benedito Batistella

Data da defesa: 30/03/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

BANCA EXAMINADORA



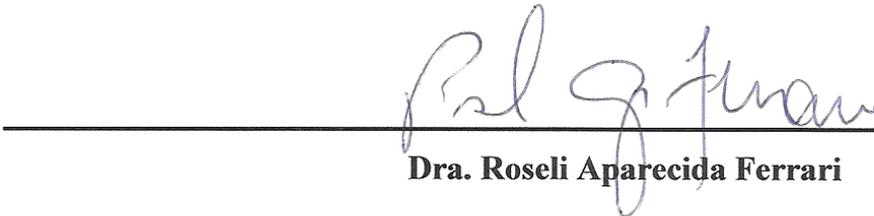
Profa. Dra. Maria Regina Wol-Maciel
(orientadora)



Dra. Gláucia Maria Ferreira Pinto
(co-orientadora)



Dra. Patricia de Oliveira Carvalho



Dra. Roseli Aparecida Ferrari

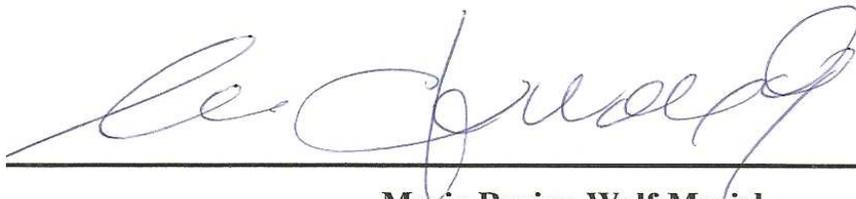


Dr. Renato Grimaldi



Dr. César Benedito Batistella

Esta versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida por Patrícia Bogalhos Lucente Fregolente e aprovada pela banca examinadora em 30 de Março de 2010.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, positioned above a horizontal line.

Maria Regina Wolf-Maciel

*“... Bela arte,
Bela sorte,
Belo feito,
O perfeito,
Veio pra ficar
Por isso,
Me renovo,
Me refaço,
Me revelo,
Eu revejo os meus conceitos
Minha fala,
Reinvento a roda ...”*

(Leonardo Vasconcelos Fregolente)

AGRADECIMENTOS

Pelo cumprimento deste trabalho ao longo desses anos, tenho muito a agradecer e a muitos que agradecer.

Primeiramente, agradeço a Deus o dom da vida e às muitas realizações que consegui até o presente momento. E pelas muitas realizações que ainda irei completar.

À professora, orientadora e amiga Maria Regina, pela grande amizade construída durante esses anos e pelo apoio e credibilidade nas propostas e idéias para que este trabalho se completasse.

À minha co-orientadora e amiga Gláucia, pela amizade, apoio e troca de idéias no decorrer de toda a pesquisa.

Ao meu querido Leonardo, pelo amor, dedicação, carinho, paciência e partilho de idéias, não apenas nesta etapa da minha vida, mas em todas que está presente. A você Leo, que faz nossa vida ser tão prazerosa, meu profundo agradecimento.

A minha querida filha Alice, que tornou mais doce o término desta conquista, amenizando todo o trabalho com seu sorriso todos os dias.

Aos meus pais Valter e Lúcia, pelo amor incondicional, e que sempre acreditaram nos meus projetos e me incentivaram nas minhas escolhas.

À minha irmã Ana Gláucia e Márcio, pelo amor e amizade e por estarem tão próximos pra ajudar no que era preciso, sempre à disposição. Muito obrigada a vocês dois.

Aos muitos amigos do laboratório LOPCA/LDPS da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, meus agradecimentos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento do trabalho.

À todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
CAPITULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
CAPITULO 2.....	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 PROCESSOS ENZIMÁTICOS.....	6
2.2 LIPASES	12
2.2.1 <i>Aplicações gerais das lipases</i>	16
2.2.2 <i>ESPECIFICIDADE DE LIPASES</i>	18
2.3 EMULSIFICANTES	21
2.4 LIPÍDIOS.....	25
2.4.1 <i>Lipídios estruturados</i>	27
2.5 MONOACILGLICERÓIS.....	31
2.6 DIACILGLICERÓIS.....	33
2.7 MONOACILGLICERÓIS DESTILADOS	36
2.8 ÓLEOS DE DIACILGLICERÓIS	38
2.9 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MAG E DAG	41
2.9.1 <i>GLICERÓLISE PARA PRODUÇÃO DE MAG E DAG</i>	41
2.9.2 <i>CATÁLISE HOMOGÊNEA</i>	43

2.9.3	CATÁLISE HETEROGÊNEA.....	43
2.9.4	CATÁLISE ENZIMÁTICA.....	45
2.10	UTILIZAÇÃO DA GLICERINA DERIVADA DO BIODIESEL.....	53
2.11	DESTILAÇÃO MOLECULAR.....	56
2.11.1	DESTILADOR MOLECULAR DE FILME DESCENDENTE.....	57
2.11.2	DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO.....	58
2.11.3	APLICAÇÃO DA DESTILAÇÃO MOLECULAR – MODELO CENTRÍFUGO.....	61
CAPÍTULO 3.....		62
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.1	REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTES.....	63
3.2	REAÇÕES DE GLICERÓLISE QUÍMICA DO ÓLEO DE SOJA.....	65
3.3	REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SISTEMAS UTILIZANDO SOLVENTES.....	65
3.4	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLICERINA DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	66
3.5	REUTILIZAÇÃO DE LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTES.....	67
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE.....	68
3.7	ANÁLISE DE ACILGLICERÓIS, AGL E GL.....	68
3.8	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE SOJA.....	69
3.9	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ POR TITULOMETRIA.....	70
3.10	DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO - ESCALA LABORATORIAL.....	71
3.11	DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO - ESCALA PILOTO.....	72
3.12	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE DAG.....	73
3.13	ANÁLISE DA MASSA ESPECÍFICA DOS LIPÍDIOS.....	73
3.14	ANÁLISES TÉRMICAS DOS LIPÍDIOS.....	73
3.15	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁGUA DE LIPASES LIVRES.....	74
CAPÍTULO 4.....		75

4	RESULTADOS	75
4.1	GLICERÓLISE ENZIMÁTICA	75
	4.1.1 <i>Screening de lipases</i>	75
	4.1.2 <i>Estudo com lipase TL IM – sistema livre de solventes</i>	79
	4.1.3 <i>Lipase CA-IM - Efeito da quantidade de enzimas</i>	81
	4.1.4 <i>Diferenças entre Glicerólise Química e Enzimática</i>	84
4.2	APROVEITAMENTO DE GLICERINA – RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	86
4.3	ESTUDO COM LIPASES - SISTEMA UTILIZANDO SOLVENTES ORGÂNICOS	90
4.4	REUSO DE LIPASES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES	93
	4.4.1 <i>Reuso de lipase imobilizada</i>	95
	4.4.2 <i>Reuso de lipase livre</i>	98
4.5	DESTILAÇÃO MOLECULAR.....	101
	4.5.1 <i>Experimentos exploratórios de destilação molecular</i>	101
	4.5.2 <i>Otimização dos parâmetros de destilação molecular</i>	106
	4.5.3 <i>Principais diferenças entre destiladores moleculares - escala laboratorial e piloto</i>	117
	4.5.4 <i>Experimentos realizados no Destilador Molecular - Escala Piloto</i>	120
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DESTILADOS	128
	4.6.1 <i>Determinação da massa molar das amostras obtidas por destilação molecular</i>	128
	4.6.2 <i>Determinação da massa específica dos óleos</i>	129
	4.6.3 <i>Análises Térmicas</i>	130
	CAPÍTULO 5.....	132
5	CONCLUSÕES.....	132
5.1	GLICERÓLISE ENZIMÁTICA.....	132
5.2	DESTILAÇÃO MOLECULAR.....	133
6	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	135
7	PUBLICAÇÕES.....	136
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Demanda mundial de enzimas industriais e especiais.....	7
Figura 2 – Mecanismo proposto para ação catalítica das lipases (DAMSTRUP, 2008).	14
Figura 3 – Esquema do mecanismo de ativação interfacial da lipase.....	15
Figura 4 – Esquema das posições dos alcoóis primários na (A) molécula de glicerol; (B) posições sn-1, sn-2, sn-3 na molécula de triacilglicerol.	19
Figura 5 - Firmeza da superfície de massas (g/mm) a base de semolina em função da dosagem de emulsificante (%). Fonte: RHO et al, 1989.	23
Figura 6 – Formação de uma molécula de triacilglicerol. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos saturadas ou insaturadas.....	25
Figura 7 – Estruturas de alguns ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.....	26
Figura 8 – Possíveis conformações da molécula de lipídio de TAG. R', R'' e R''' são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas.	27
Figura 9 – Formas isoméricas da molécula de MAG.	31
Figura 10 - Formas isoméricas da molécula de DAG. R, R' e R'' são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas.	33
Figura 11 – Reações durante a síntese de diacilglicerol catalisada por lipase.....	36
Figura 12 - Representação simplificada da reação de glicerólise.	42
Figura 13 - Etapas da reação de glicerólise.	42
Figura 14 – Representação esquemática das reações catalisadas por lipases. R, R*, R ₁ , R ₂ , R ₃ , R* ₁ , R* ₂ e R* ₃ são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas.	48
Figura 15 - Reação de hidrólise ou alcoólise para produção de 2-MAG.	49
Figura 16 - Reação de esterificação do glicerol para produção de 1(3)-MAG.	50
Figura 17 - Reação glicerólise para produção de 1(3) – MAG.....	52

Figura 18 - Colorações de glicerinas de diversos graus de pureza.	54
Figura 19 - Reação de transesterificação. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos (como exemplo, C10:0, C18:1, C18:2).....	55
Figura 20 – Diagrama esquemático de um destilador de filme descendente.....	58
Figura 21 - Ilustração simplificada de um destilador molecular centrífugo (FREGOLENTE et al, 2009).	60
Figura 22 – Reatores de vidro utilizados em reações de glicerólise enzimática; (A) Reator de 70 mL com agitação magnética; (B) Reator de 2 L com agitação mecânica.....	64
Figura 23 – Ilustração de cromatograma por exclusão de tamanhos típico da separação de acilgliceróis.....	69
Figura 24 – Destilador molecular centrífugo, escala laboratorial.....	72
Figura 25 – Glicerólise do óleo de soja utilizando várias lipases. Condições: 10% de enzima (% em relação à massa de óleo), 3,5% de água (% em relação à massa de glicerol), 24 horas de reação. T = 40°C (AN-L, TL-L, RM-IM), 50°C (TL-IM, CR-IM) e 70°C (CA-IM). Razão molar do substrato Glicerol/Óleo = 4 (AN-L, TL-L, RM-IM) e 8 (TL-IM, CA-IM e CR).....	78
Figura 26 – Glicerólise enzimática do óleo de soja utilizando 10% de TL-IM (em relação à massa de óleo), a 40 °C, razão molar G/O = 8; a) 3,5% de água (em relação à massa de glicerol), b) ausência de água.	81
Figura 27 – Quantidade de enzima (% em relação à massa de óleo) na glicerólise à 70°C, razão molar de substrato G/O = 8, a) 2% de CA-IM; b) 10 % CA-IM.	83
Figura 28 – Acilgliceróis (TAG, DAG, MAG, AGL) produzidos por glicerólise enzimática do óleo de soja a diferentes concentrações (2, 5 e 10%) de lipase de <i>Candida antarctica B</i> . Condições: T = 70°C, Razão Molar G/O = 8, água = 3,5% (em relação à massa de glicerol).	83
Figura 29 – Acompanhamento da reação de glicerólise química para produção de MAG a 210°C.	84

Figura 30 – Diferenças de coloração entre glicerólise química e enzimática para produção de MAG e DAG. (A) Reação enzimática após 24 horas; (B) Reação química após 3 horas com NaOH; (C) Óleo de Soja refinado.....	85
Figura 31 – Reação de Glicerólise enzimática do óleo de soja com glicerina destilada, obtida da reação de biodiesel.....	87
Figura 32 – Esquema para um processo integrado: produção de biodiesel e obtenção de emulsificantes (MAG e DAG).....	89
Figura 33 – Reação de glicerólise enzimática utilizando sistema com solvente (álcool terciário) Razão Molar: a) <i>terc</i> -Butanol / Óleo = 2,2 e b) <i>Terc</i> -Butanol / Óleo = 1,5). G/O = 4; 10% de lipase em relação ao óleo, T = 40°C.....	91
Figura 34 – Início da Separação de fases após 24 horas com lipase imobilizada de CA-IM (I), Separação de fases completa após 24 horas (II): (A) acilgliceróis, (B) lipases, (C) glicerina e água.....	94
Figura 35 - Início da Separação de fases após 24 horas com lipase livre de TL-L (I), Separação de fases completa após 24 horas (II): (A) acilgliceróis, (B) lipases dispersas na fase glicerina e água.....	95
Figura 36 - Composição de acilgliceróis após 24 horas de cada ciclo de reação utilizando lipase de CA-IM.	96
Figura 37 – Reação global da glicerólise. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos.	97
Figura 38 – Acompanhamento da Razão Molar Glicerol:TAG em cada ciclo de glicerólise enzimática.....	97
Figura 39 – Composição de acilgliceróis após 24 horas de cada ciclo de reação utilizando lipase de TL-L.	99
Figura 40 – Acompanhamento da Razão Molar Glicerol:TAG em cada ciclo de glicerólise enzimática para reações com lipase livre TL-L.....	100
Figura 41 – Conversão de TAG em cada ciclo empregando os diferentes biocatalisadores estudados.	101

Figura 42 – Fração Mássica (%) para MAG nas correntes de destilado e resíduo em diferentes temperaturas e vazões de alimentação.	111
Figura 43 – Fração Mássica (%) para DAG nas correntes de destilado (DDG) e resíduo (RDG) em diferentes temperaturas e vazões de alimentação.	114
Figura 44 – Fração mássica (%) dos componentes na corrente de resíduo em função da temperatura. Vazão de alimentação de 6 mL/min (-----) e 10 mL/min (—).	115
Figura 45 – Comparação de cores entre óleo de soja (1), mistura de acilgliceróis (2) e óleo de DAG (3).	116
Figura 46 – Fluxograma da destilação molecular após alteração no projeto original. 1) Alimentação de Acilgliceróis TAG, DAG, MAG, AGL, GL; 2) Controle de vazão da alimentação; 3) Banho termostático a fim de evitar que materiais voláteis prejudiquem o vácuo do sistema; 4) Motor para controle de Rotação do evaporador; 5) Bomba de alto vácuo ($P = 200 \mu\text{bar} = 1,9 \times 10^{-4} \text{ atm}$); 6) Sistema de controle de temperatura do condensador; 7) Bombas de controle de vazão das linhas de saída; 8) Destilado; 9) Resíduo ou Concentrado; 10) Evaporador; 11) Condensador.	119
Figura 47 – Recuperação de MAG no de destilador molecular – escala piloto.	122
Figura 48 - Porcentagem de MAG nas amostras de destilado obtidas pelo destilador molecular de escala laboratorial (vazões 6 e 10 mL/min) e destilador molecular de escala maior (17,3 e 23,2 mL/min).	122
Figura 49 – Porcentagem de MAG nas amostras de resíduo (B) obtidas pelo destilador molecular de escala laboratorial (vazões 6 e 10 mL/min) e protótipo de destilador molecular de maior escala (17,3 e 23,2 mL/min).	123
Figura 50 – Degradação térmica das amostras de óleo de soja e acilgliceróis antes e após separação por destilação molecular.	130

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Algumas aplicações industriais de lipases.	8
Tabela 2 – Regioseletividade de algumas lipases.	20
Tabela 3 – Dados para seleção de emulsificantes adequados empregados em panificação. 24	
Tabela 4 - Regioseletividade das diferentes lipases utilizadas.	63
Tabela 5 – Características físicas das lipases utilizadas.	63
Tabela 6 – Composição inicial de ácidos graxos do óleo de soja.	76
Tabela 7 – Efeito da concentração de água no glicerol na produção de DAG, MAG e AGL para as lipases TL-L e AN-L.	80
Tabela 8 – Fração Mássica (%) dos componentes resultantes da reação de glicerólise enzimática.	102
Tabela 9 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na pré-destilação a 200° C... 103	
Tabela 10 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na destilação a 250° C.	104
Tabela 11 – Vazões mássicas (g/mL) e volumétricas (mL/min) e massas específicas (g/cm ³) do material presente nas correntes de entrada, destilado e resíduo.	105
Tabela 12 – Vazões mássicas (g/min) dos componentes para cada corrente de entrada e saídas, após as duas etapas de destilação.	105
Tabela 13 - Fração Mássica (%) dos componentes resultantes da reação de glicerólise enzimática utilizando lipase CA-IM.	107
Tabela 14 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na pré-destilação a 100° C. 108	
Tabela 15 – Vazões (mássicas e volumétricas) do material presente nas correntes de entrada, destilado e resíduo.	109
Tabela 16 - Recuperação de MAG a diferentes TE e vazões de alimentação.	112
Tabela 17 – Porcentagem de destilado das amostras nas vazões de 6 e 10 mL/min e diferentes TE.	113

Tabela 18 – Diferenças operacionais entre os destiladores moleculares centrífugos de diferentes escalas.	120
Tabela 19 – Composições dos componentes da mistura glicérica em cada etapa da destilação molecular - escala piloto.	121
Tabela 20 - Porcentagem de destilado (100D/F) das amostras nas vazões de 6 e 10 mL/min e diferentes TE.	125
Tabela 21 – Composição dos diferentes ácidos graxos nas amostras obtidas.	128
Tabela 22 – Massa específica (ρ) dos óleos a diferentes temperaturas.	129
Tabela 23 – Temperaturas de degradação e temperaturas finais de fusão das amostras glicéricas.	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos livres
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AN-L	<i>Aspergillus niger</i> livre
AOCS	American Oil Chemists' Society
CA-IM	<i>Candida antarctica</i> B imobilizada
CR	<i>Candida rugosa</i>
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMG	Monoacilgliceróis destilados
EPA	Ácido eicosapentanóico
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipolítico
FDA	U.S. <i>Food and Drug Administration</i>
GL	Glicerina
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
MAG	Monoacilglicerol
OMS	Organização Mundial de Saúde
Q	Vazão de alimentação
RM-IM	<i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada
RMG	Monoacilgliceróis residuais
TA	Temperatura de alimentação
TAG	Triacilglicerol
TC	Temperatura do condensador
TE	Temperatura do evaporador
TL-IM	<i>Thermomices lanuginosus</i> imobilizada
TL-L	<i>Thermomices lanuginosus</i> livre
TLE	Temperatura da linha de entrada
TLS	Temperatura das linhas de saída

RESUMO

A produção de monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG) foi conduzida de forma enzimática catalisada por diferentes lipases comerciais. MAG é importante emulsificante utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e cosméticas. DAG, assim como os MAG, são utilizados como emulsificantes e atualmente pesquisas têm apontado os DAG como substituto aos óleos de triacilglicerol (TAG) em alimentos. A produção de MAG e DAG pode ocorrer por via química ou enzimática. A rota enzimática, mais limpa ambientalmente, dispõe ainda de duas alternativas de processo: sistema livre de solventes ou sistema utilizando solventes orgânicos. Além da preocupação em utilizar tecnologia enzimática a fim de desenvolver processos que não agridam o meio ambiente, a produção de MAG e DAG vem como alternativa para a utilização da glicerina excedente do processo de produção de biodiesel. A proposta de integrar ambos os processos de produção de ésteres com a glicerólise para produção de MAG e DAG utilizando a glicerina sem que haja descarte inadequado é uma alternativa que viabiliza a própria produção de biodiesel. Durante a produção de MAG e DAG, observou-se a possibilidade de reutilização de lipases imobilizadas sem que houvesse retirada dos biocatalisadores do meio reacional e sem necessitar de tratamento para posterior utilização (filtração das lipases, limpeza, estocagem). A lipase imobilizada foi reutilizada por, no mínimo, 9 ciclos de reação semi-contínua sem perdas significativas na conversão de TAG. Do mesmo modo que para a lipase imobilizada, a lipase livre também foi reutilizada no processo por 8 ciclos de reação, demonstrando ser possível, nesse caso em particular, o reuso de lipases não imobilizadas.

Após as reações enzimáticas, MAG e DAG foram separados por destilação molecular sem degradação térmica dos produtos em temperaturas de destilação de no máximo 250 °C. Foram utilizados dois equipamentos de destilação molecular: um destilador molecular centrífugo de escala laboratorial importado e um destilador molecular centrífugo de escala piloto desenvolvido com tecnologia nacional pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação (LDPS) onde este trabalho de tese foi desenvolvido. Foram obtidos MAG com 80% (m/m) de pureza e óleo rico em DAG com concentração (m/m) de 53%. Os produtos destilados foram caracterizados segundo suas massas molares, massa específica e temperatura de degradação.

Palavras-Chave: monoacilglicerol, diacilglicerol, lipases, glicerólise, destilação molecular.

ABSTRACT

Monoacylglycerol (MAG) and diacylglycerol (DAG) were produced through lipase-catalyzed glycerolysis reaction employing commercial lipases. The first product MAG is widely used as emulsifiers in foods, cosmetics and pharmaceutical products. DAG, the same way of MAG, is usually used as emulsifiers. Nowadays, DAG replacing triacylglycerol (TAG) oil in food has been studied. MAG and DAG production can be carried out through chemical or enzymatic syntheses. The enzymatic route, more friendly environmentally, can be done by solvent-free system or employing organic solvents. To obtain more quality products, produced by green technologies and minimizing the production of toxic waste, this research focused preferably on the solvent-free lipase-catalyzed process. Besides the concern of using enzymatic technology to develop processes friendly to the environment, the MAG and DAG production is an alternative for glycerol from biodiesel production. The proposal to incorporate both processes of esters (biodiesel) with the glycerolysis to MAG and DAG production is an alternative that enables the biodiesel production, employing the glycerol surplus adding value to it avoiding the discard. During the enzymatic syntheses of the emulsifiers MAG and DAG, it was observed that additional processes of separation and preparation of immobilized lipases for new cycles of enzymatic reaction could be avoided. The immobilized lipase could be used at least for nine times without essential loss of TAG conversion. As the same way, the free lipase could be reused at least for 8 times, showing that, for this particular case, the reuse of non-immobilized lipase was possible.

After the enzymatic reactions, MAG and DAG were separated through molecular distillation process without thermal degradation of products in distillation temperatures of 250 °C at most. Two equipments were used for the molecular distillations: an imported centrifugal molecular distiller, laboratory scale, and a centrifugal molecular distiller, pilot scale, a national technology developed by this research group at the Laboratory of Separation Process Development (LDPS). MAG of 80% of purity was obtained and also an oil rich in DAG (53 wt%). The distilled products were characterized according to their characteristics of molar weight, density and degradation temperature.

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são fundamentais na alimentação humana, fornecendo energia, agindo como veículo para vitaminas lipossolúveis (como vitamina A, D, E e K), apresentando-se como fontes de ácidos graxos essenciais como linoleico, linolênico e araquidônico e contribuindo para a palatabilidade dos alimentos. Em 2008 foi estimada mundialmente uma produção de óleos vegetais de 418 milhões de toneladas. No Brasil, a produção de óleos vegetais obteve uma produção de 65,3 milhões de toneladas no mesmo ano de 2008 (BRAGATHESW, 2008).

A maioria dos óleos e gorduras naturais tem aplicação limitada em suas formas inalteradas, impostas pela sua composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. Para ampliar seu uso, óleos e gorduras são modificados através de métodos industriais como mistura, fracionamento, interesterificação e hidrogenação ou pela combinação desses processos. A alteração das características físicas naturais de um óleo ou gordura proporciona maior funcionalidade para um grande número de formulações de produtos alimentícios (CHIU et al., 2008).

Todos os processos para modificação de óleos e gorduras apresentam rotas químicas para serem executados, e as limitações na obtenção desses produtos estão associadas aos tipos de catalisadores químicos e as condições de reação. Neste caso, a catálise enzimática apresenta-se alternativamente interessante e atrativa, principalmente quando são consideradas as vantagens dessa rota, tais como alto rendimento do processo,

obtenção de enzimas seletivas e biodegradáveis, ambientalmente é um processo limpo e seguro, requer menor consumo de energia e reduz a quantidade de resíduos e sub-produtos (CASTRO et al., 2004).

Atualmente, a conversão de gorduras e óleos em produtos de alto valor agregado, como monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e derivados tem despertado grande interesse comercial. Os monoacilgliceróis equivalem a 70 % dos emulsificantes utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Além dos monoacilgliceróis, também os diacilgliceróis são importantes emulsificantes e, além dessa aplicação especificamente, estudos vêm utilizando óleos de diacilgliceróis em substituição aos triacilgliceróis (óleos vegetais) nos alimentos, a fim de prevenir doenças coronárias e a obesidade (MAKI et al., 2002).

Industrialmente, monoacilgliceróis e diacilgliceróis são produzidos através da esterificação de triacilgliceróis com glicerol (glicerólise), à altas temperaturas ($>200^{\circ}\text{C}$), na presença de catalisadores inorgânicos. Esta reação produz uma mistura com aproximadamente 50 % de monoacilgliceróis (SONNTAG, 1982). Devido às altas temperaturas utilizadas, esta reação é acompanhada pela formação de subprodutos indesejáveis, decorrentes de reações de polimerização de ácidos graxos. Estes componentes conferem cor escura e odor desagradável ao produto (FERREIRA-DIAS et al, 2001).

Neste contexto, há um crescente interesse das indústrias alimentícias em fabricar produtos mais saudáveis devido às exigências de mercado, ou seja, livre dos produtos das reações de polimerização e de gorduras na configuração trans, assim como de desenvolver processos menos poluentes. A rota química para a produção de emulsificantes utiliza altas temperaturas, como já mencionado, e para minimizar a degradação do óleo devido às altas

temperaturas requeridas – já que ácidos graxos poliinsaturados provenientes de óleos vegetais são mais susceptíveis às reações de polimerização – fabricantes utilizam gorduras hidrogenadas e/ou parcialmente hidrogenadas no processo de glicerólise química. A gordura hidrogenada apresenta elevado Ponto de Fumaça (200 °C) e maior tempo de aquecimento, em relação aos óleos vegetais, sem apresentar degradação devido às altas temperaturas. No entanto, sabe-se que as gorduras hidrogenadas e parcialmente hidrogenadas possuem quantidades significativas de ácidos graxos na configuração *trans*, decorrente do processo catalítico de hidrogenação, contrariando, assim, as exigências do mercado consumidor e da resolução RDC nº360 da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Assim, a substituição da síntese química de monoacilgliceróis pela rota enzimática apresenta-se como uma alternativa bastante atrativa, já que, neste processo, são utilizadas condições amenas de temperatura e de pH, não havendo a formação de compostos indesejáveis e também não apresentando necessidade de utilização de gordura hidrogenada pois as condições de temperaturas requeridas no processo enzimático possibilitam utilizar óleos vegetais e gorduras sem que haja degradação térmica.

Para produção de emulsificantes MAG e DAG várias rotas químicas ou enzimáticas podem ser adotadas, como por exemplo, a glicerólise de triacilgliceróis e esterificação do glicerol com ácidos graxos livres. Uma vez que a base para produção de MAG e DAG são triacilgliceróis e glicerina, a reação de glicerólise foi escolhida para desenvolvimento deste trabalho. Os triacilgliceróis são encontrados nos óleos vegetais, abundantemente produzidos no Brasil tendo como maior representante o óleo de soja seguido do óleo de algodão. Já a glicerina apresenta-se hoje como um produto de baixo custo devido à produção excessiva iniciada pelo grande incentivo para a produção de biodiesel como

aditivo ao diesel fóssil. O destino para glicerina excedente da produção de biodiesel é hoje um grande problema a ser solucionado. O fato que atualmente vem despertando grande interesse da comunidade científica é justamente como encontrar alternativas para os excedentes de glicerina derivada do biodiesel, o que tornaria mais interessante à produção de biodiesel.

Uma das aplicações do glicerol é sua utilização na produção de insumos petroquímicos, como propanodióis e dioxanos a partir de fontes renováveis, com a vantagem de gerar polímeros com maior facilidade de decomposição. Outra interessante aplicação para o glicerol é utilizá-lo como matéria prima na produção de monoacilgliceróis. Essa aplicação para o glicerol oriundo da produção do biodiesel é destaque nos últimos anos, independentemente dessa reação se dar por rota química ou enzimática (BENZAZZI, 2005; FREGOLENTE et al, 2008).

Diante do objetivo de produzir mono e diacilgliceróis empregando tecnologia limpa, vários processos são focados de modo a integrar diferentes áreas de pesquisa – processos enzimáticos, separação, purificação e caracterização de produtos – visando sempre empregar idéias de comprometimento com o meio ambiente e geração de produtos saudáveis.

1.1 OBJETIVOS

Desenvolvimento de um processo integrado, consistindo na aplicação conjunta de glicerólise enzimática de óleo de soja e destilação molecular para a obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis.

Dentro desse objetivo global, são observados estudos sobre:

- Glicerólise enzimática do óleo de soja empregando sistemas livre de solventes utilizando-se diversas lipases comerciais.
- Melhoramento das condições de reação na produção dos emulsificantes monoacilgliceróis e diacilgliceróis.
- Reaproveitamento das lipases livres e imobilizadas no processo enzimático visando viabilizar os custos do processo.
- Utilização da glicerina derivada do biodiesel na reação de glicerólise enzimática para produção de emulsificantes.
- Separação e purificação dos produtos emulsificantes pelo processo de destilação molecular.
- Validação do protótipo nacional de destilador molecular centrífugo de escala piloto em relação ao destilador molecular de escala laboratorial quanto à possibilidade e capacidade de cada equipamento na separação dos produtos da reação enzimática.
- Caracterização dos produtos obtidos após a separação e purificação no destilador molecular.

CAPITULO 2

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROCESSOS ENZIMÁTICOS

A maioria das transformações químicas clássicas descobertas pela química orgânica moderna e medicinal, pré-existem nos ciclos químicos naturais, observados na natureza. Pesquisas consideram que as reações de catálise enzimática realizadas pelas enzimas nos metabolismos são, de fato, mais eficientes e seletivas do que muitas das rotas análogas desenvolvidas em laboratório.

Preocupações com questões ambientais com a qualidade dos produtos e com o consumo de energia vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias mais limpas e eficientes. Neste contexto, a tecnologia enzimática surgiu como uma alternativa para a substituição gradual de processos químicos por processos biocatalisados. Esta tendência é bastante clara e pode ser historicamente exemplificada pelo processamento enzimático do amido em escala industrial em substituição ao uso de hidrólise ácida (BON et al, 2008).

Novas tecnologias desenvolvidas na última década deram origem a novas enzimas a fim de viabilizar economicamente os processos enzimáticos nos diversos segmentos industriais (ROBERTSON e BORNSCHEUER, 2005). Enzimas isoladas ou purificadas possuem um extenso número de propriedades que tornam seu uso atrativo como catalisador em biotransformação, tais como eficiência catalítica, seletividade, atuação em condições brandas de temperatura (30 a 70°C) e pressão atmosférica, além da redução de resíduos dos processos.

A demanda mundial de enzimas industriais (para aplicações em detergentes, cosméticos, alimentos, etc.) e enzimas especiais (para fins mais específicos, como pesquisas e diagnósticos) vem crescendo expressivamente, como reportado por BON et al (2008). A Figura 1 ilustra o crescimento nos investimentos industriais na área da catálise enzimática. Só no que di respeito às enzimas industriais, o faturamento em 2004 somou 2,3 bilhões de dólares, com uma projeção de faturamento para 2014 de 4 bilhões de dólares. Atualmente, as aplicações das enzimas estão concentradas nas indústrias de detergentes e amido, porém o mercado é bastante promissor com aplicações em diversos campos, como indústrias farmacêuticas, química fina, cosméticos, oleoquímica, couros, celulose e tratamento de resíduos industriais. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos relacionados às aplicações de enzimas em diversos setores industriais.

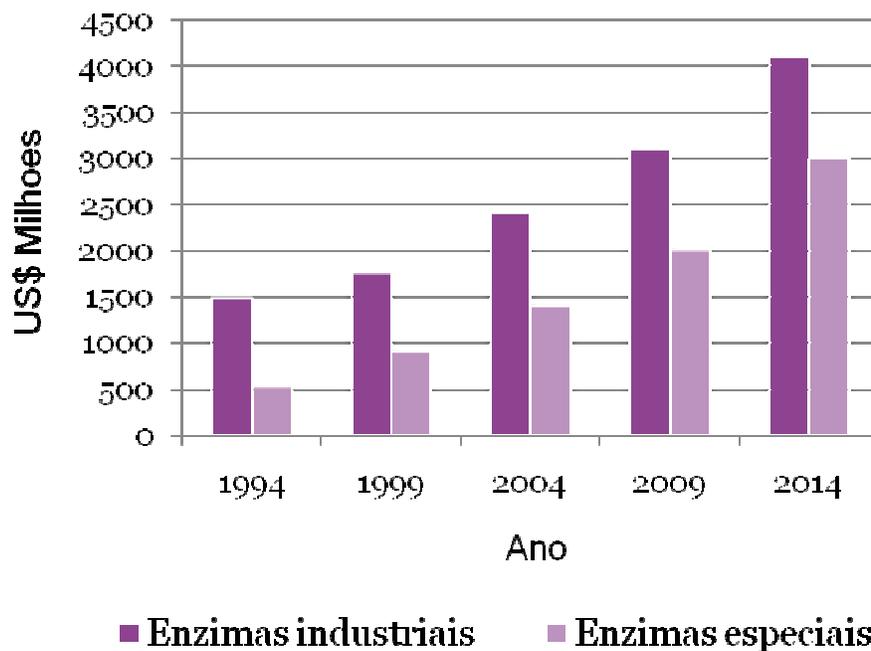


Figura 1 – Demanda mundial de enzimas industriais e especiais.

.Fonte: BON et al, 2008.

Tabela 1 – Algumas aplicações industriais de lipases.

Setor industrial	Utilização	Produto	Referência
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos	MIKIO et al., 2001
Panificação	Melhoramento do sabor e qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos	GANDHI, 1997
Derivados do ovo	Melhoramento da qualidade de aroma e remoção de excesso de gorduras	Maionese, molhos e cremes	SISAK et al., 2006
Processamento de carnes e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Produtos embutidos	MOTOK e SEGURO, 1998.
Processamento de Óleos	Transesterificação de óleos naturais; Hidrólise de óleos (ácidos graxos), diacilgliceróis e monoacilgliceróis.	Óleos e gorduras modificadas.	BORNSCHEUER, 1995 KOGURI, 2007.
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres	BORNSCHEUER, 1999. SHIMADA et al., 2007.
Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gordura	Detergentes	HASAN et al, 2006.
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos	FUSE et al., 2000.
Cosmético	Remoção de lipídeos, hidratação da pele Clareamento de manchas	Cosméticos em geral	BOUSQUET et al., 1999. GUTH e LENTNER, 2006.
Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais Processamento de couro	Produtos de couro	THANIKAIVELAN et al., 2004.

Seguindo alguns exemplos de aplicação de enzimas em diversos segmentos, podem-se citar:

Enzimas no processamento de fibras têxteis: Para aumentar a resistência e evitar a ruptura dos fios na fabricação de tecidos planos de algodão, os fios de urdume são engomados. Cerca de 75 % das gomas usadas são a base de amido. A degomagem pode ser feita de forma oxidativa com peróxidos e detergentes em meio alcalino (H_2O_2 , NaOCl ou persulfatos), ou via enzimática. As amilases são capazes de hidrolisar seletivamente o amido em diferentes açúcares solúveis em água que podem ser removidos por lavagem sem danificar o material celulótico. Ainda, as celulases são utilizadas no processamento têxtil de fibras celulósicas com o objetivo de eliminar microfibras superficiais e criar uma superfície mais lisa, aumentar o brilho, evitar formação de peloteamento, desbotar peças tingidas (BON et al, 2008).

Enzimas nas indústrias de Papel: Um método de branqueamento de polpa considerado seguro sob ponto de vista ambiental e econômico é o “biobranqueamento” da polpa com auxílio de xilanases. Outras aplicações de enzimas nesse setor empregam amilases para hidrolisar amido para eliminação desse material do papel, tornando o processo de desintegração mais fácil a fim de promover reciclagem de papel (BON et al, 2008).

Enzimas em medicamentos e diagnósticos: Atualmente existe no mercado uma ampla variedade de medicamentos à base de enzimas para aplicação na terapia de Leucemia (Asparaginase – aprovada pra uso clínico, úlceras de pele (Colagenase), antibióticos (Lisozima), inflamação (Tripsina, Catalase), antiviral (Ribonuclease), etc. A utilização de enzimas em análises clínicas pode ser exemplificada com a avaliação de substratos tais

como o álcool (álcool-oxidase e álcool-desidrogenase), ácido úrico (Catalase/Aldeído-desidrogenase), Colesterol total (Colesterol oxidase), glicose (Peroxidase), uréia (Urease), etc., ou em diagnósticos clínicos de doenças tais como câncer de próstata (Fosfatase ácida), leprose e cirrose biliar (enzima conversora de angiotensina), câncer de testículo (Lactatodesidrogenase), pancreatite aguda (Amilase), etc (BON et al, 2008).

Enzimas na indústria de cosméticos: O estudo de enzimas na área cosmética é chamado de enzimocosmética, e visa facilitar ou dificultar as reações bioquímicas da pele, proteger ou reparar a pele como também em alguns casos, destruir ou remover intencionalmente, parcial ou totalmente algumas das estruturas da pele. Como exemplo tem-se proteases em produtos para *peeling*, estrias, produtos para limpeza de dentaduras; lipase em produtos auxiliares do tratamento da celulite; lipase, amilase e protease na redução da oleosidade e da seborréia capilar, etc (BON et al, 2008).

Enzimas no tratamento de efluentes: No tratamento de efluentes, bactérias como *Pseudomonas sp* e *Sphingomonas sp*, têm sido reportadas na degradação de azocorantes. Ainda, fungos de decomposição branca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Neurospora crassa* e *Geotrichum candidum*, são conhecidos por degradar vários tipos de corantes têxteis (KAMIDA et al., 2005; KUNZ et al., 2002).

Outros exemplos da utilização de lipases em processos biotecnológicos são a produção de biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres (GROSS et al., 2001), na produção de biodiesel (geralmente obtido através de rotas químicas) através da transesterificação de triacilgliceróis utilizando lipases em solventes orgânicos (ISO et al., 2001) e na produção de químicos finos, utilizados como intermediários em reações de

síntese, como produtos farmacêuticos, agroquímicos e compostos aromáticos (fragrâncias, por exemplo, mentil metacrilato sintetizado a partir do rac-mentol), geralmente difíceis de serem obtidos através da síntese química (ATHAWALE et al., 2001).

Cerca de 90% da produção anual de enzimas provém das maiores empresas como Novozymes (Dinamarca), Gist Brocades (Holanda), Amano (Japão), Solvay Pfizer e Genencor (Estados Unidos). Entretanto, para tornar a comercialização de enzimas atrativa para o setor industrial, sua atividade (e seletividade, exceto para uso de detergente) precisa ser alta, seu tempo de vida precisa ser prolongado, a versatilidade e facilidades de operação necessitam ser bastante gerais para diversos fins e o custo das enzimas acessível para utilização em larga escala.

Novos estudos sobre produção de enzimas e diminuição dos custos para o setor industrial estão em vigor. Uma idéia inovadora patrocinada pelo Departamento de Energia dos EUA através do National Renewable Energy Laboratory (NREL) pretende converter biomassa em etanol de maneira economicamente viável. Para isso, pesquisadores da Novozymes, empresa da área de biotecnologia de produção de enzimas e microorganismos, estão trabalhando no desenvolvimento de enzimas celulases mais econômicas, em um projeto de pesquisa que envolve milhões de dólares. A base tecnológica para a fabricação de etanol a partir da biomassa está em processo de desenvolvimento. O processo é baseado no pré-tratamento da biomassa com ácido, seguido de tratamento enzimático e fermentação. Um dos objetivos do projeto é que o custo das celulases se reduza em pelo menos dez vezes, para que a fabricação de etanol a partir da biomassa possua retorno financeiro (BIOTIMES, 2007). Por enquanto, as enzimas alvo do projeto são as celulases, mas os projetos de desenvolvimento dessa pesquisa serão úteis para que as empresas

produtoras de biocatalisadores estendam essas tecnologias para o descobrimento de novas enzimas a custos mais viáveis para outros setores industriais.

De acordo com pesquisas recentes do *BCC Research*, o mercado global para enzimas industriais em 2007 foi de US\$ 2,3 bilhões, e é esperado para 2012 um aumento para US\$ 2,7 bilhões (BUSINESS WIRE, 2007). Porém, de acordo com BON et al (2008) esses dados são ainda mais animadores. De acordo com os autores, em 2004 o mercado mundial de enzimas correspondeu a US\$ 3,6 bilhões e as previsões apontam para um crescimento sustentado de 6,6% ao ano. Esses estudos provam que cada vez mais pesquisadores e empresários industriais estão interessados nos processos enzimáticos.

É importante ressaltar que o processamento enzimático de matérias-primas leva a produtos de maior valor agregado, por suas qualidades e por serem produzidos por meio de tecnologias limpas, o que favorece o desenvolvimento econômico das empresas e facilita a colocação dos seus produtos nos mercados domésticos e externo.

2.2 LIPASES

Lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes em aplicações biotecnológicas, devido principalmente à versatilidade de suas aplicações e em produção em grande escala.

Lipase, ou triacilglicerol hidrolase (E.C. 3.1.1.3) é um tipo de carboxi-esterase. Pertencentes à classe das serinas¹ hidrolases, não necessitam de cofatores². Sob condições

¹ *Serina hidrolase* – representa a família de enzimas que compreende as lipases, esterases, proteases e amilases. Kidd D, Liu Y, Cravatt BF, *Biochemistry* (2001) 4005-15.

fisiológicas favoráveis, esta enzima catalisa a hidrólise de óleos e gorduras, metabolizando essencialmente lipídios. É uma enzima solúvel em água que atua na interface água/óleo, hidrolisando as ligações de ésteres do meio não-aquoso. Sua função natural é a hidrólise de triacilgliceróis em glicerídeos e ácidos graxos durante a digestão. Inicialmente eram obtidas a partir de pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (HASAN et al, 2006).

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum sp*, por leveduras de *Tulopsis sp* e *Candida sp* e bactérias como *Pseudomonas sp*, *Achromobacter sp* e *Staphylococcus sp*. Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis às lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo do seu isolamento (DALLA-VECHIA et al, 2004).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molar variando entre 20 a 75 kDa, apresentam atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são geralmente estáveis em soluções aquosas neutras, apresentando atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, porém sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica.

O mecanismo de atuação da lipase é ilustrado na Figura 2. Primeiramente, o oxigênio hidroxil (Ö) da cadeia serina da lipase faz o ataque nucleofílico no carbono

²*Cofatores* – substâncias inorgânicas necessárias para ajudar na catálise ou aumentar a taxa de reação da mesma.

carbonil do substrato lipídico ($R_1 - COO - R_2$) resultando em uma enzima acil intermediária. O hidrogênio (H) do grupo serina hidroxil é, então, temporariamente transferido ao resíduo histidina mais próximo. O intermediário formado é ligado covalentemente ao grupo acil ($R_1 - C=O -$) do grupo serina da lipase. O hidrogênio da histidina é transferido ao álcool do substrato ($-O - R_2$) para formar um álcool ($HO - R_2$). Os passos 1 e 2 constituem a reação de hidrólise/alcóólise, depois da formação dos produtos. Depois disso, o oxigênio hidroxil (\ddot{O}) de outro álcool ou água ($HO - R_3$) faz um ataque nucleofílico no carbono carbonil ligado à serina da lipase. A partir disso, outro “novo” intermediário acil da enzima é formado. Os passos 3 e 4 são denominados esterificação ou síntese de ésteres (MALCATA, et al, 1992; DAMSTRUP, 2008).

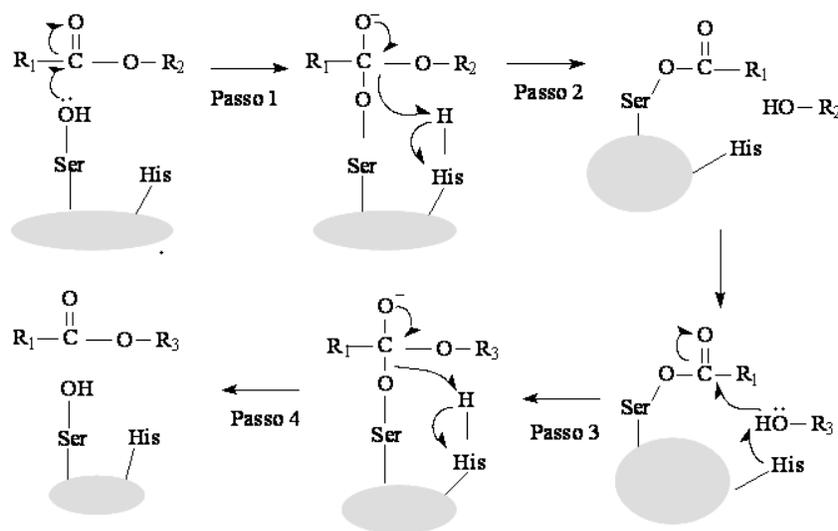


Figura 2 – Mecanismo proposto para ação catalítica das lipases (DAMSTRUP, 2008).

Em relação à aplicação de lipases na indústria de oleoquímicos, as lipases da família das hidrolases catalisam reações de hidrólise de lipídios em sistemas livre de solventes, apenas água e substrato, ou na presença de solventes orgânicos. Neste último, o meio orgânico pode propiciar o aumento do poder catalítico da lipase, um fenômeno

chamado ativação interfacial. O mecanismo de ativação interfacial está associado à mudança conformacional na enzima (Figura 3): o sítio ativo dessas enzimas é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica ou lid, que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo, permitindo o livre acesso ao mesmo (MARUYAMA et al., 2000). Descobriu-se mais recentemente, entretanto, que várias lipases não são passíveis de ativação interfacial. É o caso da lipase de *Candida Antarctica B*, apesar da alta homologia desta enzima com outras lipases capazes de ativação interfacial. Mesmo assim, o fato de a maioria das lipases conhecidas ser ativada na interface orgânico-aquosa, propiciou o desenvolvimento de diversas metodologias de estudo da ativação interfacial. Observou-se que a superfície de diversas lipases tem caráter mais hidrofóbico na região que contém a tampa. As estruturas tridimensionais das lipases conhecidas até hoje mostram que o grau de mobilidade da tampa ou *lid* varia fortemente encontrando desde casos em que parece haver dois estados extremos – aberto e fechado – com níveis de energia significativamente inferiores aos dos estados de transição, até casos com tampas muito móveis com vários estados de energias (MINGARRO et al, 1995; BON et al , 2008).

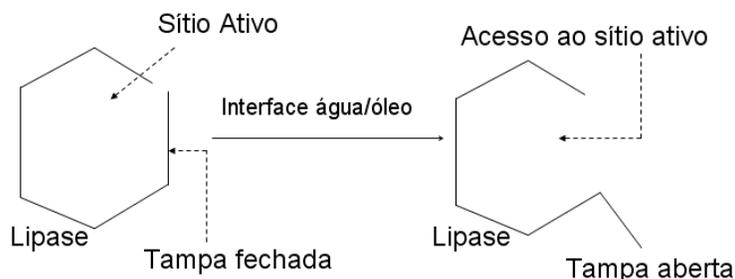


Figura 3 – Esquema do mecanismo de ativação interfacial da lipase.

Embora muitos aspectos do mecanismo catalítico das lipases ainda não estejam esclarecidos, os dados estruturais das lipases permitem algumas conclusões: a) a maioria das lipases apresentam profundas mudanças estruturais durante a ativação interfacial: a “tampa” (lid) se move deixando a enzima na forma aberta e ativa, proporcionando uma grande superfície hidrofóbica de interação lipídeo-proteína; b) a abertura da tampa pode ser facilitada por solventes orgânicos, provavelmente por diminuição da constante dielétrica do meio (BON et al , 2008).

2.2.1 APLICAÇÕES GERAIS DAS LIPASES

O campo comercial de maior importância da aplicação de lipases hidrolíticas é sua adição em detergentes, que são usados principalmente em lavanderias domésticas e industriais e limpeza doméstica. O comércio mundial de enzimas para aplicações em detergentes é estimado em 450 milhões de dólares por ano (SHANLEY, 1998). Para melhorar o poder de detergência, geralmente são adicionados nos detergentes mais de um tipo de enzimas, como as proteases, amilases, celulasas e lipases. As enzimas podem reduzir o impacto ambiental causado pelos produtos detergentes, uma vez que a quantidade de compostos químicos nos detergentes é reduzida, são biodegradáveis, não produzem resíduos nocivos à saúde e não apresentam risco à vida aquática.

Embora, atualmente, as aplicações industriais das lipases estejam concentradas nas indústrias de detergentes, novas aplicações vêm se estabelecendo nos mais diversos campos, tais como indústria farmacêutica, química fina, cosmética, oleoquímica, couros, polpa de celulose e papel no tratamento de resíduos industriais, entre outros (Tabela 1). As

lipases vêm deste modo, conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais.

Em se tratando de redução de resíduos e produtos que causam impacto ambiental, as lipases tem se tornado um dos mais importantes grupos de enzimas para a produção de polímeros biodegradáveis em síntese orgânica. *1*-Butil oleato foi produzido por esterificação direta do butanol e ácido oléico a fim de diminuir a viscosidade do biodiesel quando este é utilizado em climas frios. Ésteres de tri-metil-propano foram também sintetizados para uso como lubrificantes. As lipases podem catalisar síntese de ésteres e reações de transesterificação em sistemas utilizando solventes orgânicos tem ampliado as possibilidades de produção de poliésteres biodegradáveis e poliésteres aromáticos através da catálise enzimática (LINKO et al., 1998).

Na indústria oleoquímica, a aplicação de lipases com o objetivo de obter concentrados de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como ômega 3 e 6, de importância nutricional ou médica têm despertado interesse de muitos pesquisadores e de fabricantes de produtos alimentícios com a finalidade de comercializar produtos (leite e derivados, biscoitos, pães, sucos, etc.) enriquecidos com óleos ricos em AGPI (KOLANOWSKI e LAUFENBERG, 2006). É conhecido que os ésteres de AGPI com alcoóis primários apresentam absorção praticamente nula e podem resultar em metabólitos tóxicos. Por sua vez, os AGPI livres apresentam uma extensão de absorção significativa, mas possuem a desvantagem de sofrerem facilmente deterioração oxidativa. Em contrapartida, os AGPI esterificados ao glicerol na forma de acilgliceróis são melhores absorvidos, sendo esta forma a mais facilmente obtida pelas reações enzimáticas catalisadas pelas lipases (CARVALHO et al., 2003).

Uma área que ganhou relevância nos últimos anos é o emprego de lipases na produção de biodiesel, através da transesterificação de TAG com alcoóis de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível, com a vantagem de não ocorrer a geração de óxidos de enxofre e de particulados (ISO et al, 2001). Diversas lipases e óleos vegetais, como óleo de mamona, de girassol, soja, palma, estão em testes como substrato para a reação de transesterificação.

Para tornar economicamente viável o uso de lipases como catalisadores de processos industriais a área de Engenharia de Proteína disponibiliza técnicas que podem contribuir para a obtenção de enzimas com os requisitos necessários para aplicação no setor industrial. Dentre as técnicas ainda em estudo destaca-se a mutagênese sítio-dirigida, gerando lipases mutantes com enantiosseletividade aumentada. Embora as técnicas forneçam resultados promissores no sentido de gerar lipases com características mais apropriadas à sua utilização como catalisadores de processos industriais, muitos esforços ainda são necessários para o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados, sistemas de reação multifásicos e processos de produção e purificação de lipases de menor custo (BON et al, 2008).

2.2.2 ESPECIFICIDADE DE LIPASES

Para aplicação industrial, a especificidade da lipases é um fator crucial. Há três grupos que dividem as lipases quanto à sua especificidade: i) Lipases não-específicas; ii) Lipases 1,3-específicas; iii) Lipases ácido graxos específicas.

As lipases chamadas 1,3-específicas (ex: *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium roquefortii*) catalisam as reações nas posições dos alcoóis primários do glicerol (posição sn-1 ou sn-3), formando assim, produtos com composições diferentes daqueles obtidos por lipases não-seletivas ou mesmo por catalisadores químicos. Lipases chamadas não-específicas (ex: *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp.*) atuam nas três posições dos alcoóis primários (sn-1, sn-2 ou sn-3) aleatoriamente (Figura 4).

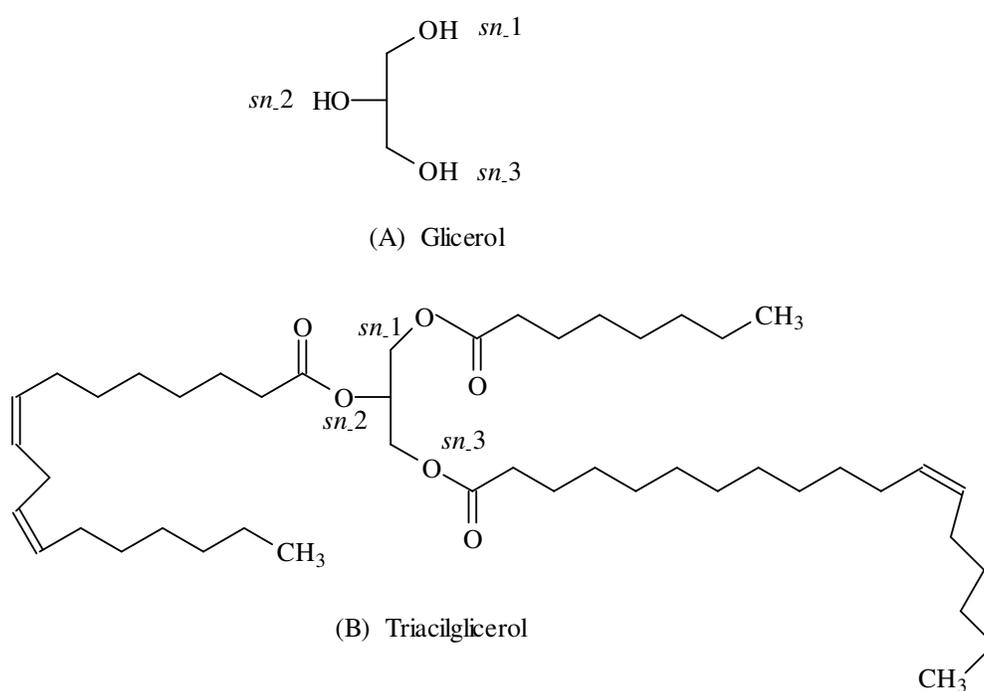


Figura 4 – Esquema das posições dos alcoóis primários na (A) molécula de glicerol; (B) posições sn-1, sn-2, sn-3 na molécula de triacilglicerol.

Lipases de *Rhizomucor* e *Penicillium* são 1,3-específicas, porém a lipase de *Candida antarctica* apresenta os dois tipos, 1,3-específica (*Candida antactica B*) e não específica (*Candida antactica A*). As lipases 1,3-específicas diferem entre si no grau de

seletividade (ou especificidade), como indicado qualitativamente na Tabela 2. Exemplos de reações que utilizam lipases 1,3-específicas serão apresentados no Item 2.6.4.

Tabela 2 – Regioseletividade de algumas lipases.

Lipase	Regioseletividade	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	Moderadamente 1,3-específica	Macrae e Hammond (1985)
<i>Candida antarctica B</i>	1,3- específica	Novo Nordisk
<i>Candida antarctica A</i>	não- específica ou 2- específica	Novo Nordisk
<i>Candida rugosa</i>	Não- específica	Amano pharmaceutical
<i>Rhizomucor oryzae</i>	Altamente 1,3- específica	Amano pharmaceutical
<i>Rhizomucor miehei</i>	Moderadamente 1,3- específica	Berger et al., (1992)
<i>Geotrichum candidum</i>	Ácido graxo específica	Amano pharmaceutical
<i>Rhizomuco javanicus</i>	Levemente 1,3- específica	Macrae e Hammond (1985)

Fonte: BORNSCHEUER e KAZLAUSKAS, 1999.

As enzimas pertencentes à classe de lipases ácido graxo específicas atuam especificamente na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados ou sem insaturação no carbono 9 são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado é a lipase de *Geotrichum candidum*, seletiva para ligações duplas na posição *cis* Δ^9 ³.

³ Primeira dupla ligação na posição *cis* do carbono 9.

2.3 EMULSIFICANTES

Emulsificantes são compostos orgânicos constituídos por moléculas anfifílicas contendo partes polares (cabeça) e apolares (cauda), que se posicionam entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando a película interfacial que diminui a tensão entre elas estabilizando o sistema (ADAMSON e GAST, 1997).

Os emulsificantes podem ser classificados segundo algumas características e propriedades (STAMPFLI e NERSTEN, 1995):

Origem: naturais ou sintéticos;

Propriedades de solubilidade;

Presença de grupos funcionais;

Equilíbrio hidrofílico/lipofílico (EHL);

Potencial para ionização (iônico versus não iônico).

A principal função dos emulsificantes no processamento dos alimentos é reduzir a tensão interfacial entre as fases em uma emulsão, geralmente óleo e água. Em um sistema de duas fases, uma fase é dispersa na outra em forma de gotas. São denominadas emulsões óleo/água quando a fase contínua é água, como leite ou sorvetes, e emulsões água/óleo quando a fase contínua é óleo, assim como manteigas e margarinas (ADAMSON e GAST, 1997).

Uma emulsão é considerada termodinamicamente instável. Para ser considerada termodinamicamente estável, a emulsão deveria espontaneamente voltar ao estado de emulsão após uma separação de suas fases através de, por exemplo, uma centrifugação. Entretanto, experiências mostram que, depois de separadas as fases de uma emulsão, elas permanecem separadas até que sejam misturadas por uma força externa.

Uma emulsão estável apenas retarda o inevitável, agindo de modo a evitar que a separação de fases seja visível, pelo menos dentro do tempo normal de vida do produto (GUNSTONE e PADLEY, 1997). Como exemplo, pode-se citar a margarina como um produto essencialmente estável, e a mistura apropriada de gordura combinada com proteínas do leite, lecitinas e mono- e diacilgliceróis saturados usados na produção da margarina aumentam a estabilidade e as propriedades alimentícias. A utilização desses tensoativos na indústria alimentícia, além de estabilizar emulsões, ainda modifica a cristalização da gordura; modifica a consistência, a aderência da massa, além das características de geleificação do amido pela complexação com amido, proteína e açúcares; lubrificam as massas com baixo teor de gordura, entre outras propriedades.

Todos os emulsificantes apresentam uma característica comum, que é o fato de serem moléculas que possuem uma porção polar, solúvel em água, também chamada de porção hidrofílica e uma porção apolar, insolúvel em água, também chamada de lipofílica ou hidrofóbica. O balanço entre essas duas porções moleculares com características opostas é denominado EHL - equilíbrio hidrofílico-lipofílico (do inglês HLB – *hydrophilic-lipophilic balance*). Este representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares (GRIFFIN, 1954). Estas propriedades fazem com que os emulsificantes sejam amplamente utilizados em aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Na Tabela 3, são apresentados alguns valores de EHL para alguns emulsificantes empregados em panificação.

Com respeito à origem dos emulsificantes, estes podem ser naturais, como a lecitina, ou sintéticos, produzidos especialmente a partir de monoacilgliceróis de glicerol e ésteres de ácido láctico. Os monoacilgliceróis, mais comumente empregados, pertencem à categoria dos produtos reconhecidos como seguros, apresentando o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (NABESHIMA et al., 2003; FREITAS et al., 2008).

A Figura 5 exemplifica as razões pelos quais os monoacilgliceróis são geralmente empregados preferencialmente nas indústrias alimentícias como agentes emulsificantes. Neste caso, é avaliada a firmeza da massa à base de sêmola de trigo com adição dos emulsificantes: estearoil-2-lactil lactato de sódio (SSL), lecitina de soja e monoacilgliceróis (MAG) nas dosagens de 0,1; 0,3 e 0,5%.

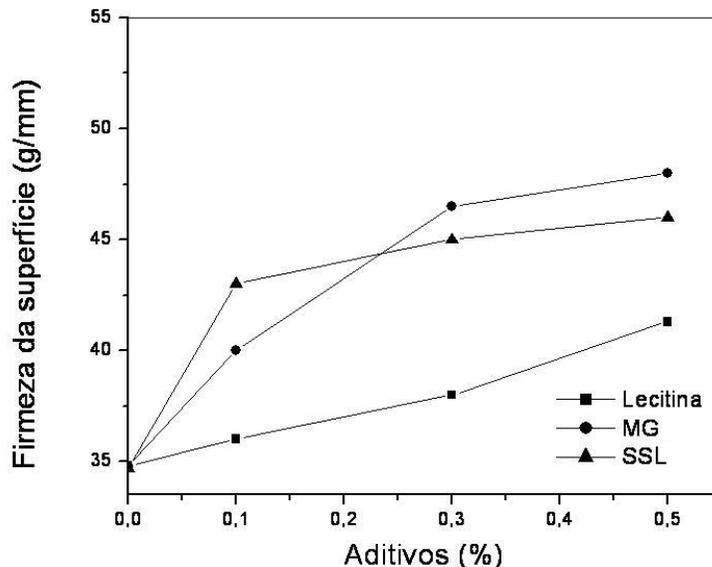


Figura 5 - Firmeza da superfície de massas (g/mm) a base de semolina em função da dosagem de emulsificante (%). Fonte: RHO et al, 1989.

A partir desses dados, verifica-se que os emulsificantes mais efetivos empregados na massa à base de sêmola de trigo foram o monoacilglicerol e o SSL, que a partir de 0,3% apresentaram resultados de firmeza muito similares. A lecitina foi menos efetiva em comparação com os outros emulsificantes (CICHELLO et al., 2000; RHO et al., 1989).

Também, na indústria de panificação, MAG e DAG são altamente empregados. Ainda na Tabela 3 são apresentados alguns tipos de emulsificantes utilizados em panificação e os mais adequados para cada aplicação (com amido ou glúten). No caso de emulsificantes empregados na indústria cosmética, os modernos emulsificantes lipídicos, que não exibem suas propriedades características abaixo de 50°C e mostram solubilidade relativamente baixa em água à temperatura ambiente, oferecem boa resistência à água em emulsões óleo/água.

Tabela 3 – Dados para seleção de emulsificantes adequados empregados em panificação.

Emulsificante	Nome comum	EHL	Interação com amido	Interação com glúten	Dosagens usuais
Polisorbato 60	PS-60	14 -15	Moderado	Excelente	0,15 – 0,30
Polisorbato 80	PS-80				
Estearoil-2-lactil lactato de sódio	SSL	7 -9	Muito bom	Bom	0,25 – 0,50
Estearoil-2-lactil lactato de cálcio	CSL	18 – 21	Bom	Bom	0,25 – 0,50
Mono e Diacilgliceróis	MAG/DAG	2 – 5	Excelente	Moderado	0,10 – 0,50
Estearato de polioxietilenoglicol	–	11	Excelente	Moderado	0,30 – 0,50
Diacetil tartarato de mono e diacilgliceróis	DATEM	8 -10	Moderado	Excelente	0,25 – 0,50

Fonte: PALMA et al (2004).

2.4 LIPÍDIOS

Lipídios são substâncias caracterizadas pela baixa solubilidade em água e outros solventes polares e pela alta solubilidade em solventes apolares. Os lipídeos podem ser divididos em algumas classes de compostos mais simples como ácidos graxos, triacilgliceróis e lipídeos mais complexos, tais como ceras, fosfoglicerídeos (fosfolipídeos), esfingolipídeos, lipoproteínas, esteróis e vitaminas lipossolúveis.

Os triacilgliceróis, ou triglicerídeos (TAG), são lipídios formados pela ligação de 3 moléculas de ácidos graxos com o glicerol, um triálcool de 3 carbonos, através de ligações do tipo éster, como ilustrado pela Figura 6 .

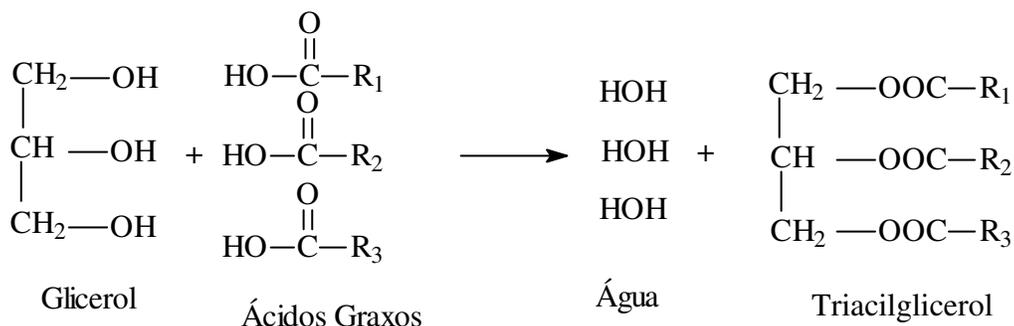


Figura 6 – Formação de uma molécula de triacilglicerol. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos saturadas ou insaturadas.

São absolutamente hidrofóbicos, sendo também chamados de "Gorduras Neutras". Os ácidos graxos que participam da estrutura de um TAG são, geralmente, diferentes entre si. Algumas estruturas de ácidos graxos podem ser observadas na Figura 7. No geral apresentam estruturas alifáticas podendo possuir uma ou mais duplas ligações, apresentam normalmente isômeros cis, e variam de acordo com o tipo de óleo ou gordura. A presença

de duplas ligações (insaturações) na cadeia do ácido graxo faz com que haja uma modificação espacial na cadeia carbônica promovendo seu dobramento no plano. Esta estrutura proporcionada pelas insaturações da cadeia confere um arranjo mais fraco entre as moléculas, permitindo uma dissociação mais fácil, conferindo o estado físico mais liquefeito em relação ao ácido graxo saturado de número de carbonos correspondente.

Os TAG mistos de ácidos graxos insaturados ou saturados de cadeia longa podem existir na forma de diapasão (I) e/ou de cadeira (II), como ilustra a Figura 8 (SILVA, 1999).

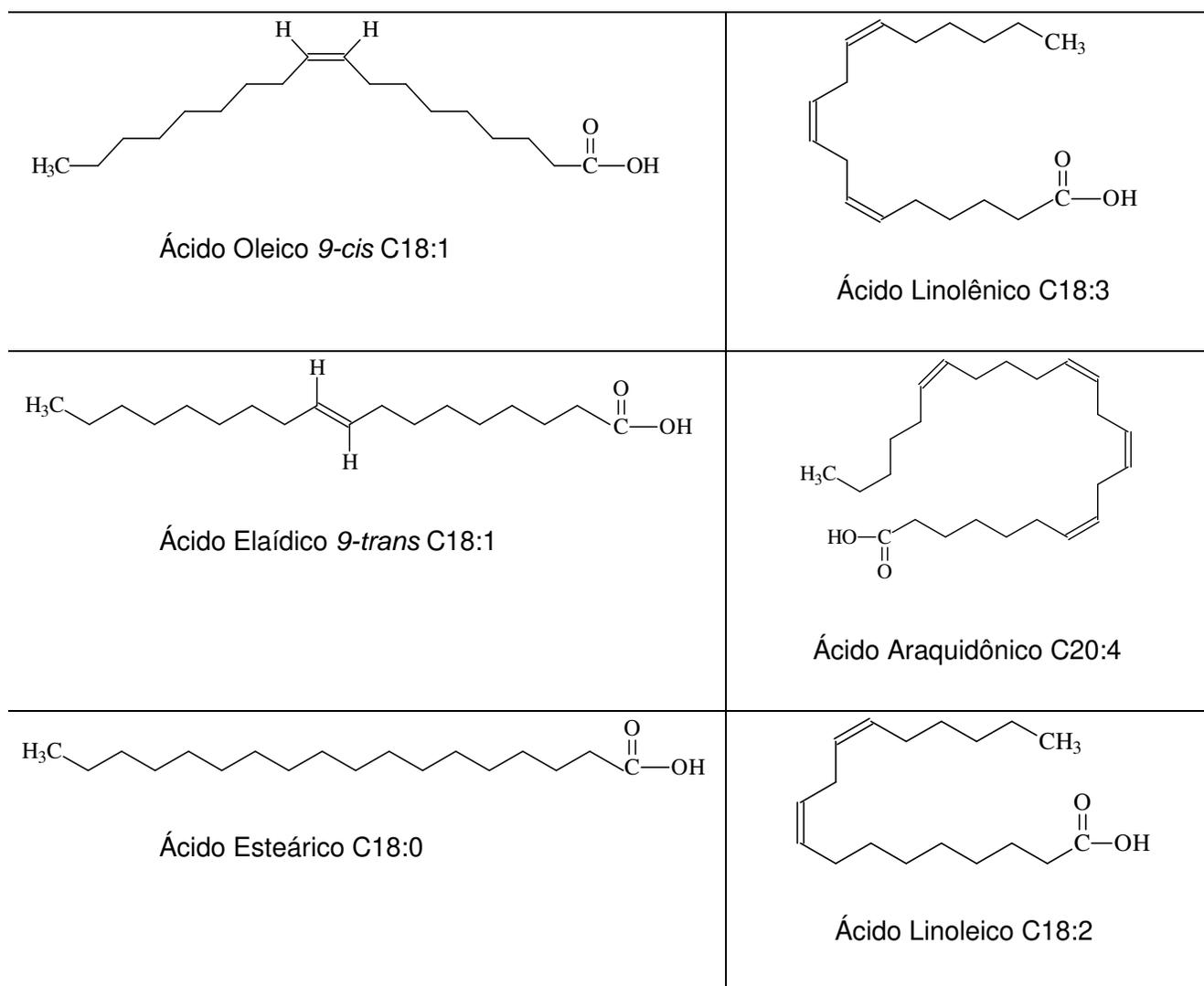


Figura 7 – Estruturas de alguns ácidos graxos presentes em óleos e gorduras.

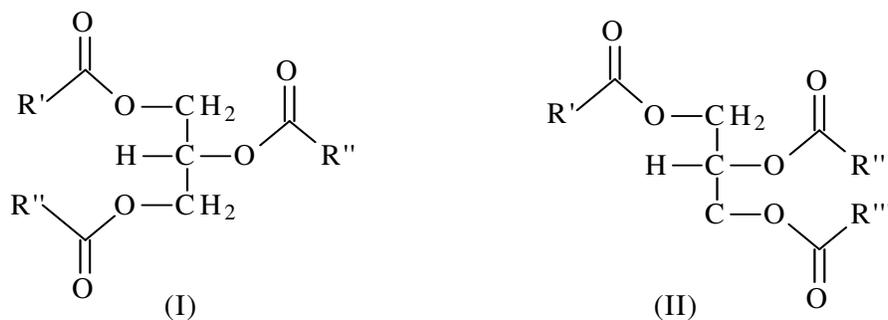


Figura 8 – Possíveis conformações da molécula de lipídio de TAG. R', R'' e R''' são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas.

2.4.1 LIPÍDIOS ESTRUTURADOS

As dietas ricas em gorduras *trans* e gorduras saturadas apresentam inúmeros malefícios para a saúde em função da relação de sua elevada ingestão com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e circulatórias. Implicações negativas para a saúde associados com o consumo de *trans* e gorduras saturadas podem ser revertidas minimizando a ingestão dessas gorduras e pela substituição destas por gorduras poliinsaturadas, por exemplo.

Para reduzir o nível de ácidos graxos saturados e *trans* nos alimentos, as indústrias precisam investigar alternativas aos tradicionais TAG de estruturas saturadas e *trans*. Infelizmente, lipídios que possuem estruturas na configuração *trans*-saturada garantem a textura e firmeza em diversos alimentos como sorvetes, queijo, manteiga, margarina, *fast-foods*, bolos e tortas industrializadas, etc. Uma vez que essas estruturas de TAG são responsáveis pelas características dos alimentos de boa consistência e textura, muitas vezes

há dificuldade em eliminá-los para melhorar os aspectos saudáveis do produto sem sacrificar algumas das propriedades e características desejadas (ROGERS, 2009).

Desse modo, alterações nas estruturas dos TAG, que permitam substituir ácidos graxos saturados ou *trans* dos TAG por outros e que ainda que forneçam características e propriedades semelhantes nos alimentos que as estruturas *trans*-saturadas, são objetos de pesquisa de diversos estudos (BOT et al, 2009; ROGERS, 2009; PERNETTI et al, 2007) . Estes estudos visam alterar os lipídios de forma que as propriedades alimentícias sejam preservadas (por exemplo, textura e firmeza de produtos) melhorando as características nutricionais dos mesmos.

Lipídios estruturados podem ser definidos como TAG reestruturados ou modificados para alterar composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição na cadeia de glicerol. Estas modificações podem ser realizadas por vias químicas ou enzimáticas. São sintetizados com o objetivo de obter lipídios nutracêuticos ou funcionais, com composição particular de ácidos graxos ou TAG, que podem proporcionar benefícios específicos para a saúde, bem como melhorar as características físicas e químicas dos TAG, alterar ou incrementar as propriedades nutricionais dos alimentos (CHIU et al, 2008) ou apresentar propriedades desejáveis como valor calórico reduzido ou alteração no ponto de fusão (D'AGOSTINI, 2001). Como exemplo, o valor nutricional dos TAG e as suas propriedades físico-químicas não só são determinados pela composição em ácidos graxos, mas também pela distribuição posicional dos grupos de acila ligados ao glicerol. TAG especiais do tipo ABA que contém ácidos graxos de cadeia média (por exemplo, C8) nas posições sn - 1,3 (A) e um ácido graxo de cadeia longa não saturada (por exemplo, C16-C22), na posição sn-

2 (B), é uma fonte de energia efetiva para pacientes com mal-absorção de TAG (JANDACEK et al, 1987).

É desejável que a dieta humana seja composta de quantidades equivalentes de gorduras saturadas, poliinsaturadas e monoinsaturadas da ordem de 1:1:1, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). Devido às dificuldades em obter óleos e gorduras que atendam as necessidades requisitadas pela OMS, faz-se necessárias modificações nas estruturas dos óleos e gorduras a fim de se obter lipídios estruturados que atendam essas exigências nutricionais (TRIVEDI e SINGH, 2005).

Em sua pesquisa, Filleti J. (2005) obteve lipídios estruturados a partir da gordura de ucuúba rica em ácido mirístico C14:0 (superior a 60%, portanto trata-se de uma matéria prima com alto teor de ácidos graxos saturados e consistência dura) e ésteres etílicos de óleo de canola (com alto teor de ácido oléico) e de óleo de algas (com alto teor de ácido docosahexaenóico – DHA), utilizando-se lipases sn-1,3-específica. Desse modo, a gordura de ucuúba que inicialmente era empregada em aplicações não alimentares e de baixo valor agregado, após a modificação na estrutura com AGPI, apresenta elevado valor nutricional em alimentos e pode ser empregada em substituição à manteiga de cacau como ingredientes de baixo valor calórico (FILLETI J, 2005).

Outras aplicações de lipídios estruturados podem ser observadas em fórmulas para crianças recém-nascidas que contenham ácidos graxos de cadeia média, ácido linolênico, ácido linoléico e AGPIs nas mesmas quantidades encontradas no leite humano (OSBORN e AKOH, 2002). Silva e Gioielli (2006) estudaram os efeitos da interesterificação química nas propriedades físicas de banha e suas misturas com o óleo de soja, procurando desenvolver lipídios estruturados da gordura do leite humano (SILVA e GIOIELLI, 2009).

Lipídios estruturados são preferencialmente produzidos via transesterificação para dar origem a gorduras plásticas e óleos capazes de serem usados em substituição aos empregados em margarinas, coberturas de bolos, etc., sem apresentar ácidos graxos na configuração *trans*. Quando cadeias de ácidos graxos curtas e médias são incorporados à cadeia de glicerol, elas podem formar TAG com boas propriedades de espalhamento a baixas temperaturas, consistência macia e melhoramento das condições de fusão (OSBORN e AKOH, 2002).

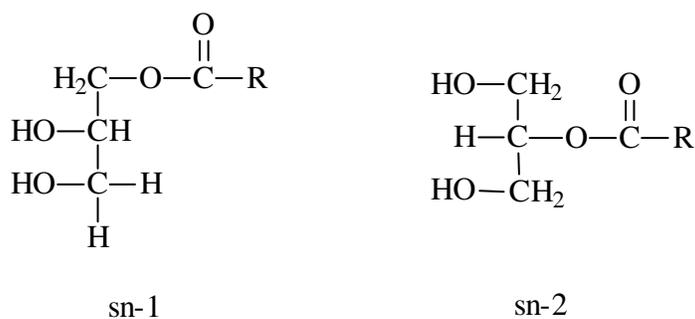
Lipídios estruturados podem ser obtidos via rotas químicas ou enzimáticas, sendo esta última mais adequada uma vez que lipases regioesletivas podem atuar especificamente nas posições do glicerol do TAG a fim de obter lipídios estruturados com maior percentual de pureza. Podem ser obtidos por esterificação direta, acidólise ou interesterificação química ou enzimática (D'AGOSTINI, 2001). As rotas de produção serão abordadas com mais detalhes no item 2.10.4.

Além dos TAG estruturados, DAG e MAG estruturados também podem ser obtidos, agregando qualidades específicas aos produtos nos quais são incorporados. DAG que apresentem na mesma estrutura do glicerol preferencialmente ácidos graxos de cadeia média e AGPI são adequados quando consumidos em alimentos, em substituição aos óleos de TAG (item 2.8) (KIM, et al, 2006). A produção de MAG a partir de óleos ou gorduras que apresentem ácidos graxos particulares como AGPIs e ácidos graxos de cadeia média ou curta, que possam adicionar qualidades aos alimentos como baixo valor calórico, capacidade de cristalização, alteração no ponto de fusão é desejável a fim de obter produtos mais saudáveis, com elevado valor nutricional.

2.5 MONOACILGLICERÓIS

Dentro da classe dos lipídeos, os monoacilgliceróis (MAG), ou monoglicerídeos, possuem grande interesse comercial. MAG são monoésteres que consistem em um único resíduo de ácido graxo esterificado a uma molécula de glicerol que, dependendo da orientação das moléculas duas formas isoméricas podem existir, conforme apresentado na Figura 9. Os ácidos graxos individuais da cadeia de MAG podem estar posicionados em diferentes carbonos da estrutura do glicerol, numerados como sn-1(3) para a posição no carbono final (α -isômeros) ou sn-2 (β -isômeros) para a posição no carbono intermediário. Dependendo da origem lipídica, as cadeias carbônicas dos ésteres podem apresentar diferentes estruturas de seus ácidos graxos: saturadas, insaturadas, longas ou curtas (DAMSTRUP, 2008).

Normalmente, a forma isomérica do MAG mais encontrada, na proporção de 1-MAG:2-MAG ~ 9:1, é a α -isomérica (1(3)-MAG). Esta razão de 9:1 é devido à acil migração - reações induzidas termodinamicamente intra molecular (LASZLO et al, 2008).



R - Cadeia carbônica saturada ou insaturada.

Figura 9 – Formas isoméricas da molécula de MAG.

Os grupos hidroxilas livres do glicerol proporcionam as características hidrofílicas, enquanto que a cadeia acil é responsável pelas características lipofílicas e hidrofílicas da molécula de MAG. Assim sendo, MAG são consideradas moléculas anfipáticas, que possuem características hidrofílicas e hidrofóbicas (YANG et al., 2005). Quando em meio aquoso, moléculas anfipáticas tendem a se agrupar formando estruturas esferóides, as micelas, atuando como surfactantes ou emulsificantes, promovendo estabilidade da emulsão por redução da tensão superficial entre as fases água e óleo.

Devido à sua capacidade emulsificante, MAG são matérias-primas para a indústria alimentícia, significando 70% dos emulsificantes utilizados (SAGALOWICZ et al, 2006; FERREIRA-DIAS et al., 2001; SONNTAG, 1982). Estes visam manter a textura, umidade e evitar que os ingredientes se separem. Dentre as aplicações de MAG, destaca-se seu uso direto na produção de produtos de panificação, bolos, massas e margarinas (BACKELS, 1976). Além disso, MAG também são utilizados como matéria-prima para a produção de diversos outros tipos de emulsificantes, em que um grupo hidroxila do glicerol é substituído por diferentes tipos de moléculas como ácido acético, láctico, cítrico, tartárico, etc. (DANISCO, 2005).

Na indústria de cosméticos, são utilizados como agentes texturizadores para melhorar a consistência de cremes e loções além de serem empregados nas indústrias farmacêuticas como suporte para liberação de medicamentos solúveis e insolúveis em água (KAEWTHONG et al., 2005).

2.6 DIACILGLICERÓIS

Diacilgliceróis (DAG), ou diglicerídeos, são freqüentemente, utilizados nas indústrias alimentícias e cosméticas, juntamente com os MAG, como emulsificantes não-iônicos e agentes texturizadores (KWON et al., 1995). DAG são constituídos de dois resíduos de ácidos graxos ligados à cadeia de glicerol, e podem ocorrer em duas formas isoméricas 1,3-DAG (α,α' - isômero) ou 1,2-DAG (α,β - isômero), como ilustrado na Figura 10. Segundo LASZLO (2008) a proporção de ocorrência entre as duas formas isoméricas dos DAG é de 2:1 de 1,3-DAG para 1,2-DAG.

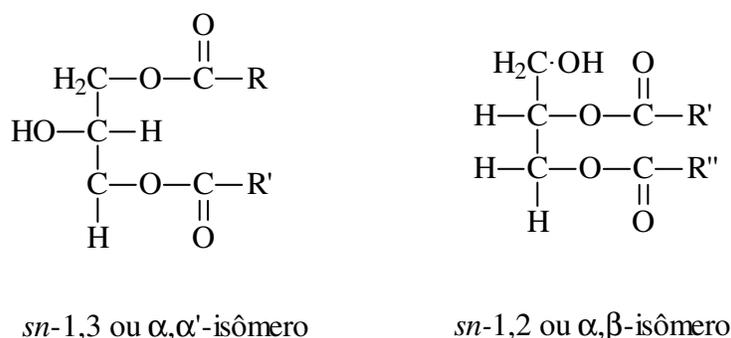


Figura 10 - Formas isoméricas da molécula de DAG. R, R' e R'' são cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas.

Desde que não haja necessidade de se ter emulsificantes a partir de MAG destilados (>90% de MAG), a incorporação de DAG na mistura é vantajosa, uma vez que este é mais barato e possui desempenho adequado às aplicações mencionadas. Além de serem empregados em misturas com MAG, regioisômeros de DAG são utilizados como intermediários químicos para síntese de fosfolipídios e glicolipídios.

Estudos recentes vêm incorporando DAG na dieta humana, substituindo TAG a fim de prevenir algumas doenças relacionadas com a obesidade. Pesquisadores afirmam

que a ingestão prolongada de uma dieta que incorpore óleo contendo principalmente DAG comparada à ingestão de TAG que apresenta ácidos graxos similares, reduz a gordura acumulada na região abdominal (TAGUCHI et al., 2001; MAKI et al., 2002; MENG et al., 2006).

É possível desenvolver juntamente com a obtenção de óleos de DAG, um produto modificado estruturalmente a fim de agregar mais valor nutricional aos alimentos a partir de, como por exemplo, alguns ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como ácido docosahexaenóico (DHA) e eicosapentanóico (EPA) da família ômega-3 e ácido γ -linolênico da família ômega-6.

Lipídios estruturados são TAG, DAG ou MAG modificados obtidos através de interesterificação química ou enzimática, com a finalidade de alterar a composição em ácidos graxos e/ou sua distribuição posicional na molécula de glicerol. São sintetizados com o objetivo de se obter lipídios que proporcionem benefícios específicos para a saúde, bem como melhorar ou modificar as características físicas e químicas dos TAG, além de modificar ou incrementar as propriedades nutricionais do alimento, tema abordado no item 2.4.1. Como exemplo, os ácidos graxos de cadeia média podem ser incorporados a gorduras e óleos formando lipídios estruturados que irão conter ácidos graxos de cadeia média nas posições sn-1 e sn-3 e um ácido graxo de cadeia longa na posição sn-2. É benéfico incorporar ácidos graxos de cadeia longa insaturados na posição sn-2 devido à baixa atividade da lipase pancreática com relação a estes ácidos graxos quando eles estão presentes nas posições sn-1 e sn-3 dos TAG. Na posição sn-2 os ácidos graxos de cadeia longa insaturados são mais biodisponíveis, devido à ação das lipases, visto que são mais facilmente absorvidos (D'AGOSTINI e GIOIELLI, 2002).

Cerca de 70% dos DAG podem ocorrer na forma 1,3-DAG, porém os regioisômeros 1,2(2,3)-DAG são mais difíceis de serem sintetizados, devido à acil migração que favorece a regioisomeria do primeiro caso (Figura 11) (BORNSCHEUER, 1999). A obtenção desses regioisômeros é dificultada pela rota química, porém novas técnicas de catálise enzimática em meio orgânico são continuamente estudadas.

FUREBY et al. (1997) pesquisaram sobre a síntese de 1,2-DAG e 1,3-DAG através da reação de alcóolise de TAG em diferentes solventes orgânicos, dentre eles hexano, isooctano, diisopropil éter e lipases comerciais, como *P. roquefortii*, *P. cyclopium*, e *Pseudomonas sp.* O melhor solvente no caso foi o diisopropil éter com a lipase de *P. roquefortii*, produzindo 95% de 1,2-DAG após 50 horas de reação.

KRISTENSEN^b et al. (2005) utilizaram reações de glicerólise enzimática de TAG, neste caso, livre de solventes para produzir DAG a partir de lipases comerciais. A lipase não-específica de *P. fluorecens* produziu, após 28 horas de reação 45% de 1,3-DAG e 20% de 1,2-DAG.

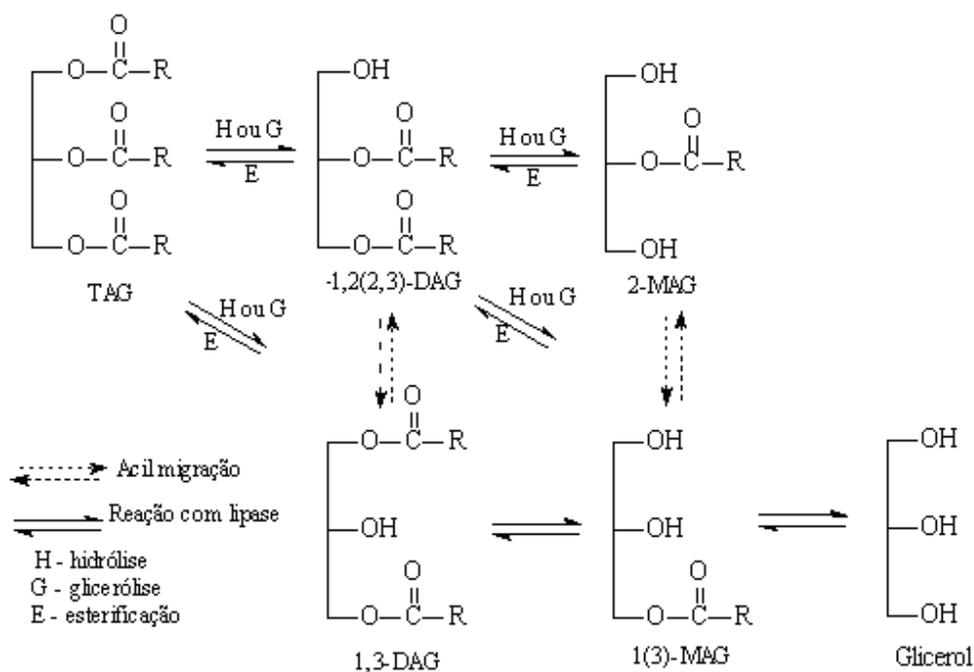


Figura 11 – Reações durante a síntese de diacilglicerol catalisada por lipase.

Fonte: BORNSCHEUER, 1999.

2.7 MONOACILGLICERÓIS DESTILADOS

Os emulsificantes são definidos pela Legislação Brasileira como as substâncias que tornam possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis nos alimentos (PAVANELLI et al, 2000).

A produção mundial de MAG é estimada em cerca de 180.000 ton por ano (BELLOT et al., 2001), das quais aproximadamente 85 mil são consumidas nos EUA, como emulsificantes em alimentos.

Em muitas aplicações, uma mistura de DAG e MAG, além de mais econômica, é suficiente para promover a homogeneidade de uma emulsão, a exemplo de algumas

margarinas e maioneses. Nesses casos, a porção de cada um na emulsão pode variar de acordo com a finalidade desejada. Entretanto, muitas vezes são necessários emulsificantes com alta concentração de MAG. Emulsificantes MAG/DAG destilados que apresentam 90% de MAG possuem característica de temperatura de fusão de 66 °C, mantendo-se sólidos à temperatura ambiente. Essa característica é fundamental para oferecer, além da função surfactante, consistência e maciez aos alimentos à temperatura ambiente, como é o caso de coberturas de bolos, pães, cremes e sorvetes.

Além disso, MAG de alta concentração são também empregados na indústria cosmética para melhoramento da consistência de cremes e loções por apresentarem forma sólida e alto ELB (equilíbrio hidrofílico/lipofílico igual a 11), pois garantem a obtenção de emulsões Óleo/Água (O/A) com alta estabilidade.

Na área farmacêutica, MAG podem ser empregados em micro-emulsões lipídicas do tipo O/A interessantes como sistemas de liberação de fármacos, oferecendo benefícios que incluem o aumento da solubilidade e absorção e controle da biodisponibilidade de fármacos (FORMARIZ, 2003).

Para obtenção dos MAG de alta concentração, normalmente é necessário mais de uma etapa de processo na produção dos emulsificantes. Nas reações de glicerólise são produzidos monoacilgliceróis, mas estes não são obtidos isoladamente. Juntamente, como produtos da reação de glicerólise, são obtidos outros acilgliceróis como TAG que não reagiram, DAG, AGL e glicerol. Há várias rotas para produção de MAG, entre elas as reações de glicerólise química produzem cerca de 50% de monoacilgliceróis, A produção de MAG através de glicerólise enzimática livre de solventes depende muito das lipases utilizadas; no entanto, a concentração de MAG normalmente não ultrapassa os 35%; e a

produção de DG é cerca de 60%. Reações de glicerólise enzimática utilizando solventes aumentam o rendimento de MAG para 60%. Em todos esses casos, é necessário que haja mais etapas de processo para separar e purificar os MAG dos acilgliceróis. Para separação e purificação dos acilgliceróis (TAG, DAG, MAG, AGL e glicerol) formados, a técnica de destilação convencional não é recomendada, pois esses compostos podem sofrer degradação e oxidação quando expostos às elevadas temperaturas. Neste caso, a destilação molecular (DM) é a técnica mais apropriada, pois consiste em um processo para separação e purificação de substâncias termicamente sensíveis, assim como de líquidos com baixa pressão de vapor. Mais detalhes sobre a metodologia de destilação molecular são abordados no item 2.12.

2.8 ÓLEOS DE DIACILGLICERÓIS

Nas últimas duas décadas, a obesidade vem se tornando um problema cada vez maior no mundo todo, ocasionada principalmente pelo novo estilo de vida das pessoas. A urbanização e a industrialização, acompanhadas de maior disponibilidade de alimentos industrializados e menor atividade física, contribuíram para a crescente prevalência da obesidade nas populações. Além de ser fator de risco cardiovascular independente, associa-se a uma série de outros, como a dislipidemia, a hipertensão arterial, o diabetes *mellitus* e a resistência à insulina (LI et al., 2008; YASUNAGA et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2006; YANAGISAWA et al., 2003; LERARIO et al., 2002).

O mecanismo pelo qual a distribuição central da adiposidade causa resistência à insulina já é bem conhecido. Depósitos viscerais de triacilgliceróis possuem *turnover* mais

acelerado que o de outras regiões, aumentando a oferta de ácidos graxos livres no sistema, que estimulam a gliconeogênese (obtenção de glicose por meio de conversão de compostos que não os açúcares e nem os carboidratos) e inibem a depuração hepática da insulina, contribuindo para elevar a glicemia, a insulinemia e a resistência insulínica. A resistência à insulina está associada a vários problemas, como aumento de trombos e lesão na parede dos vasos sanguíneos (LERARIO et al., 2002).

Entretanto, mudanças do estilo de vida e especialmente dos hábitos alimentares são caminhos efetivos para prevenir o desenvolvimento de síndromes metabólicas.

No Japão e Estados Unidos um novo óleo vegetal com base em diacilgliceróis está sendo utilizado em pesquisas com a finalidade de substituir o óleo vegetal nos alimentos.

Diacilgliceróis (DAG), ou diglicerídeos, são normalmente encontrados em óleos vegetais em concentrações baixas. No entanto, reações catalisadas por lipases 1,3 específicas permitem agora a produção de DAG em larga escala. Este novo óleo apresenta as mesmas características que o óleo de TAG e contém aproximadamente > 80% de DAG, < 20% de TAG e < 5% de MAG. Muitos estudos em humanos indicam que DAG reduz a hiperlipidemia (concentrações elevadas de gorduras - colesterol e/ou triacilglicerol - no sangue) e é efetivo na prevenção da obesidade (YAMAMOTO et al, 2006).

Pesquisas realizadas com ratos sugerem que a ingestão de óleo de DAG não somente previne o acúmulo de gordura na região abdominal, mas também favorece a perda de peso. Os efeitos do óleo de DAG foram associados com a manutenção da sensibilidade normal de insulina. A estimulação da oxidação de ácidos graxos no intestino e no fígado são alterações favoráveis provenientes da dieta a base de óleo de DAG. (SAITO et al., 2007).

No Japão o óleo de DAG foi aprovado pelo Ministério da Saúde e Bem-estar (YANAGISAWA, 2003) e já se encontra comercialmente disponível desde 1999. A partir de 2005, nos Estados Unidos, o óleo contendo 80% de DAG é comercializado, como óleo de cozinha e em alimentos processados que contém gorduras.

Pesquisas com pacientes que apresentam diabetes mostram que a contínua ingestão de óleo de DAG pode não somente prevenir doenças arterioscleróticas, mas também melhorar a qualidade de vida do paciente, uma vez que as propriedades do óleo de DAG são comparáveis às do óleo convencional. (YAMAMOTO et al, 2006), não sendo necessária a privação da alimentação com óleo por esses pacientes.

Em virtude do aquecimento do óleo a altas temperaturas quando o objetivo é obter alimentos geralmente fritos, é necessário considerar o impacto das altas temperaturas no óleo de DAG. Sabe-se que óleos convencionais expostos às altas temperaturas tendem a se degradarem rapidamente. Para efetivamente prever, controlar e avaliar a qualidade dos alimentos produzidos durante o processamento com altas temperaturas, é importante entender as alterações térmicas que ocorrem nos óleos e qualquer risco que esses produtos possam acarretar nos consumidores. SHIMIZU et al. (2004) investigaram a degradação de óleo de DAG e óleos comerciais quando submetidos a altas temperaturas e os efeitos desses óleos em ratos. Análises de deterioração térmica não revelaram qualquer diferença substancial entre os dois óleos (oxidação de ácidos graxos e grau de polimerização), nem efeitos adversos aos ratos.

2.9 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE MAG E DAG

As sínteses de MAG e DAG podem ser conduzidas de diversas formas como, por exemplo: esterificação direta de glicerol com ácidos graxos, transesterificação de ésteres de ácido graxos com glicerol e glicerólise de triacilgliceróis (BANCQUART et al., 2001). Essas sínteses podem ocorrer através de rotas químicas ou enzimáticas. A rota química é constituída por uma reação de catálise homogênea ou heterogênea, enquanto que a via enzimática é catalisada por lipases. Nos itens seguintes, serão abordados estes possíveis meios de produção de MAG e DAG.

2.9.1 GLICERÓLISE PARA PRODUÇÃO DE MAG E DAG

Como na natureza, os lipídeos mais abundantes são os triacilgliceróis, industrialmente, monoacilgliceróis são produzidos normalmente através da reação de glicerólise (UIC-GmbH, 1998), que é um caso particular de alcoólise, consistindo na reação entre moléculas de glicerol e moléculas de triacilgliceróis, Figura 12.

Esta reação é conduzida quimicamente em temperaturas acima de 200°C, na presença de catalisadores homogêneos como hidróxido de sódio. Nestas condições, normalmente, obtém-se, no equilíbrio químico, uma mistura que contém em torno de 50 % de monoacilgliceróis, 40% de diacilgliceróis e 10% de triacilgliceróis (SONNTAG, 1982). Para se produzir 03 mols de monoacilgliceróis, são necessários 02 mols de glicerol para cada mol de triacilglicerol.

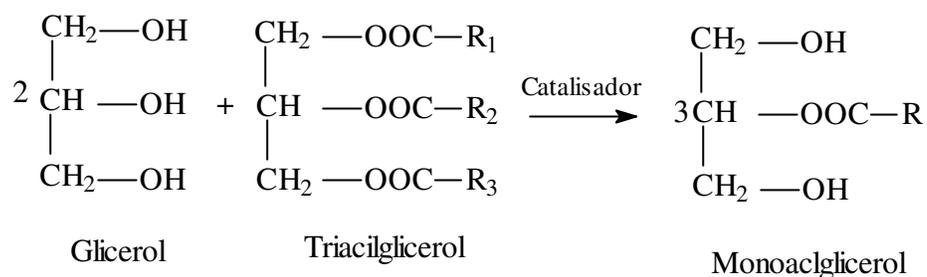


Figura 12 - Representação simplificada da reação de glicerólise.

A Figura 12 ilustra um esquema simplificado da reação uma vez que considera apenas a formação de monoacilgliceróis, no entanto, triacilgliceróis reagem com glicerol produzindo isômeros de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Então, diacilgliceróis reagem novamente com moléculas de glicerol para a formação de novas moléculas de monoacilgliceróis (CORMA et al.,1998), como é apresentado na Figura 13.

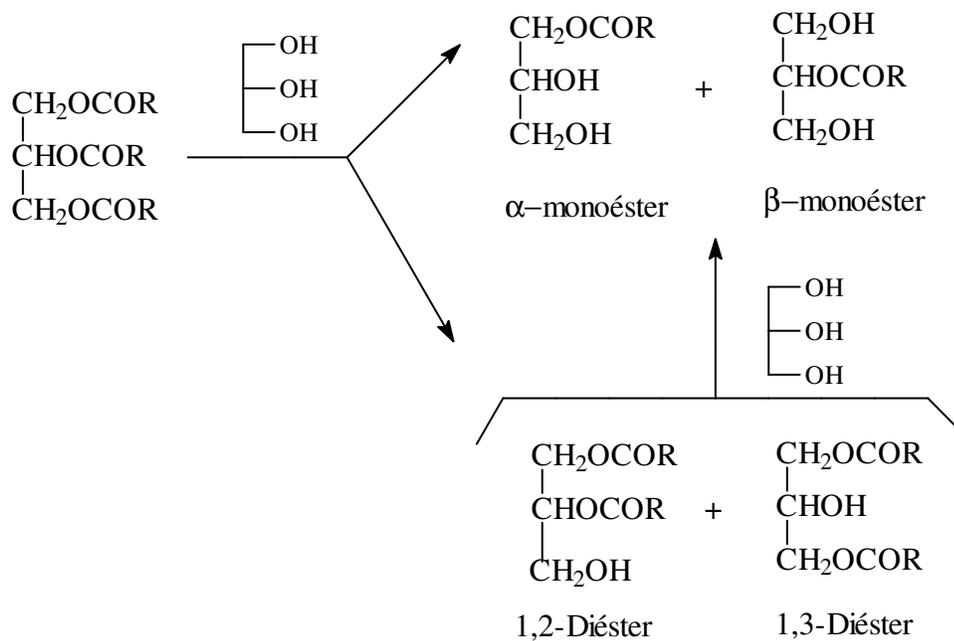


Figura 13 - Etapas da reação de glicerólise.

Devido às altas temperaturas utilizadas na produção de monoacilgliceróis através da rota química tradicional, há a ocorrência de reações de polimerização e, conseqüentemente, formação de produtos indesejáveis (SUKIYAMA et al., 2001), as quais conferem à mistura reacional cor escura e odor desagradável. Desta forma, pesquisadores têm buscado vias alternativas para a produção de monoacilgliceróis, dentre as quais se destacam os processos enzimáticos.

2.9.2 CATÁLISE HOMOGÊNEA

Em geral, os catalisadores homogêneos mais utilizados na síntese química de MAG são os ácidos inorgânicos, dentre eles os ácidos sulfúrico e sulfônico. A transesterificação de TAG com H_2SO_4 apresenta alto rendimento, entretanto a reação é lenta e requer temperaturas acima de $100^\circ C$ (SCHUCHARD et al., 1998). Quanto aos catalisadores básicos, podem ser citados o KOH, NaOH e $Ca(OH)_2$ que são neutralizados com ácido fosfórico após a reação, gerando sais que devem ser removidos.

2.9.3 CATÁLISE HETEROGÊNEA

Materiais básicos como MgO, hidrotalcitas Al-Mg assim como sepiolitas (após procedimento de troca iônica com Cs^+) e materiais mesoporosos que são peneiras moleculares de poros ordenados do tipo MCM-41 (*Mobil Composition of Mater*), são usados como catalisadores para a transesterificação do glicerol com triacilgliceróis (CORMA et al., 1998 e MÁRQUEZ et al., 2004).

Ainda, óxidos metálicos como MgO, CeO₂ e ZnO são usados como catalisadores básicos sólidos para a transesterificação do glicerol com quantidades estequiométricas de estearato de metila, na ausência de solventes.

Materiais zeolíticos apresentam canais e cavidades de dimensões moleculares nas quais se encontram moléculas de H₂O adsorvidas, bem como cátions (NH⁴⁺, H⁺, tetrametil-amônio e outros cátions nitrogenados, terras raras e metais nobres) (RIGO et al., 2009). A presença de fortes campos elétricos e propriedades controláveis de adsorção dentro dos poros fazem das zeólitas um tipo único de catalisador que por si só pode ser considerado como um microreator. Entretanto, a limitação das zeólitas como catalisadores é a pequena extensão do tamanho de seus poros, aproximadamente 1 nm. Considerando esta limitação, o desenvolvimento de uma série de peneiras moleculares de aluminosilicatos mesoporos trouxe perspectivas interessantes para a catálise em muitas aplicações industriais. Como alternativa às zeólitas, em 1992 foi desenvolvida uma peneira molecular, MCM-41, que possui um sistema de poros ordenados de tamanho ajustável entre 15 e 100 Å e área superficial muito alta (700 m² g⁻¹). Com inserção de cátions trivalentes, este material torna-se cataliticamente ativo. Em seu trabalho, BOSSAERT et al. (1999) descreveu a síntese de monolaurina via esterificação direta do glicerol com ácido láurico utilizando MCM-41, dentre outros catalisadores, funcionalizando-o com ácido propilsulfônico. O catalisador mesoporoso mencionado propiciou um alto rendimento, obtendo cerca de 53% de MAG a 110°C, empregando 5% de catalisador, por um período de 24 horas (BOSSAERT et al., 1999).

2.9.4 CATÁLISE ENZIMÁTICA

Sistemas livres de solventes para produção de MAG e DAG a partir de reações catalisadas por enzimas têm despertado grande interesse de pesquisadores no intuito de explorar as vantagens desta metodologia alternativa às reações químicas para síntese desses emulsificantes. Tanto fatores técnicos como regulatórios da FDA⁴ e da União Européia têm incentivado o desenvolvimento de processos menos poluentes para a síntese de emulsificantes, especialmente para aqueles usados em aplicações farmacêuticas ou relacionados à área de alimentos (OTERO et al., 2001). Cabe ressaltar que, do ponto de vista ambiental, o processo enzimático é tecnicamente limpo e seguro (BÖRJESSON e HÄRRÖD, 1999). Embora o custo das enzimas ainda seja um fator limitante que dificulta a produção industrial em larga escala de MAG e DAG por vias enzimáticas, por outro lado este método traz vantagens. Uma vez que as reações são realizadas em condições amenas de temperaturas (40 a 70°C) e pressão, as reações enzimáticas minimizam o consumo energético envolvido no processo, além de diminuir a ocorrência de reações indesejadas de polimerização. Além dessas vantagens, é possível explorar a seletividade das enzimas em relação aos ácidos graxos e sua regioseletividade pela primeira posição das moléculas de glicerol (posição α) em relação à segunda (posição β) (FREGOLANTE et al, 2005; NOUREDDINI et al., 2004); e enzimas imobilizadas possibilitam serem recuperadas e reutilizadas (GUO e XU, 2006).

⁴ FDA – *U.S. Food and Drugs Administration*: agência dos Estados Unidos de Serviços Humanos e da Saúde responsável pela regulamentação e supervisão de alimentos, suplementos alimentícios, vacinas, produtos biomédicos, cosméticos, entre outros.

Os estudos com reações enzimáticas para produção de MAG e DAG focam em dois tipos de sistemas: livre de solventes ou na presença de solventes orgânicos.

Um sistema livre de solventes apresenta longos tempos de reação e baixa conversão dos reagentes (30 – 50%), geralmente atribuídos à baixa miscibilidade do glicerol hidrofílico com o óleo lipofílico a baixas temperaturas (40 a 50 °C). Entretanto, um sistema com solvente melhora a miscibilidade do meio reacional, proporcionando um sistema completamente homogêneo, propiciando uma melhor interação enzima/glicerol/óleo e, conseqüentemente, aumentando o rendimento da reação. Verificou-se que a adição de terc-butanol/terc-pentanol em uma reação de glicerólise enzimática com óleo de girassol e lipase *Candida antarctica* propiciou uma conversão de MAG de 72% em apenas 2 horas de reação, a 50°C (DAMSTRUP et al., 2005). Do mesmo modo, utilizando terc-butanol, YANG et al. (2005) obtiveram 75% de MAG a partir da glicerólise enzimática .

No entanto, quando se trata da obtenção de MAG e DAG para fins alimentícios, são raras as utilizações de solventes na mistura óleo e glicerol, especialmente devido às etapas de separação deste solvente e quanto à segurança devido à toxicidade do produto (YANG et al., 2005). É desejável que a produção de produtos destinados às indústrias alimentícias e farmacêuticas siga as recomendações de segurança. Apenas n-hexano, acetona e etanol são permitidos nas indústrias de processamento de alimentos. Além da preocupação em obter produtos alimentícios seguros e livres de solventes, sob o aspecto ambiental a não utilização de solventes em processos é desejável, uma vez que evita etapas subseqüentes para eliminação do solvente do produto como também evita a geração de resíduos tóxicos.

Dentro das reações enzimáticas que têm sido exploradas estão a 1) hidrólise ou alcoólise de triacilgliceróis, 2) glicerólise de triacilglicerol e 3) esterificação ou

transesterificação de glicerol com ácidos graxos livres ou ésteres. O primeiro método produz 2-MAG (monoacilgliceróis com o grupo acila ligado na posição 2 do glicerol) enquanto que os outros geralmente produzem predominantemente 1(3)-MAG (isômeros com o grupo acila ligado nas posições 1 e 3 do glicerol) (BORNSCHEUER, 1999).

A Figura 14 ilustra resumidamente os diversos tipos de reações catalisadas por lipases como biocatalisadores, que serão abordadas em detalhes nos itens a seguir.

2.9.4.1 Hidrólise ou Alcoólise de Triacilgliceróis para produção de 2-MAG.

A hidrólise enzimática usando lipases oferece um processo alternativo para a produção de MAG e DAG em condições moderadas, requerendo, entretanto, um controle rígido da reação para evitar uma hidrólise completa. A hidrólise ou alcoólise de triacilgliceróis catalisada pela lipase 1,3 específica produz 2-MAG, com rendimentos de até 78% (Figura 15).

Migrações de grupos acil provavelmente limitam o rendimento da reação, uma vez que 1(3)-MAG formados podem sofrer reações adicionais de hidrólise. Por outro lado, a alcoólise pode ser conduzida em solventes não-polares onde a migração de grupos acil é mais lenta. Por esta razão, a alcoólise de triacilgliceróis apresenta maiores rendimentos, cerca de 75 a 97% em relação à hidrólise.

Ainda, reações de alcoólise são, geralmente, mais rápidas por não apresentarem alteração no pH durante a reação e, assim, há uma menor inibição das lipases por ácidos graxos. A adição de álcool em excesso desloca o equilíbrio da reação na direção da formação de monoacilgliceróis (BORNSCHEUER, 1999).

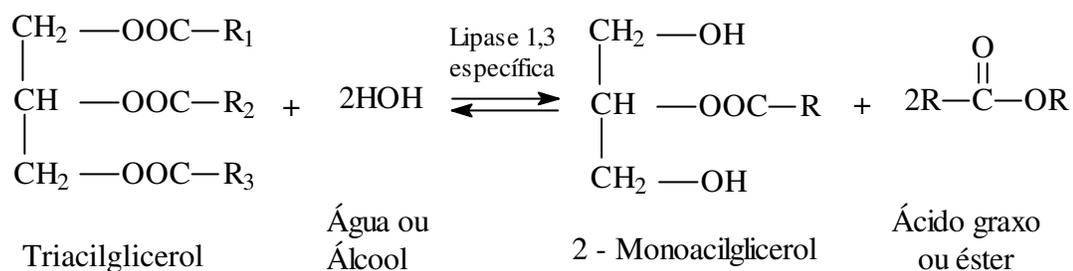


Figura 15 - Reação de hidrólise ou alcoólise para produção de 2-MAG.

2.9.4.2 Esterificação de glicerol com ácidos graxos livres ou ésteres para produção de 1(3)-MAG.

A principal desvantagem da reação de hidrólise ou alcoólise para produção de monoacilgliceróis é o desperdício de dois ácidos graxos do triacilglicerol (Figura 15), sendo, portanto, mais eficiente o método no qual o glicerol é usado como álcool, permitindo a conversão total dos três ácidos graxos (Figura 16). Quando a esterificação do glicerol ocorre na presença de ácidos graxos, a reação também pode ser chamada de acidólise. Neste método, a mistura reacional contém compostos polares que promovem a migração de grupos acil, assim, no equilíbrio químico, há predominantemente 1(3)-MAG. Quando lipases não específicas são empregadas, o glicerol pode ser esterificado na posição 1 ou 3, podendo formar 1(3) MAG e 2 MAG; 1,3 e 1,2 DAG e TAG.

Para deslocar a reação em direção à formação de monoacilgliceróis, pode-se remover a água ou o álcool do sistema utilizando vácuo. A baixa solubilidade do glicerol em solventes orgânicos não-polares prejudica o rendimento da reação. Assim, para minimizar este problema, pode-se utilizar a formação de micelas ou adicionar solventes polares ao sistema reacional (BORNSCHEUER, 1999).

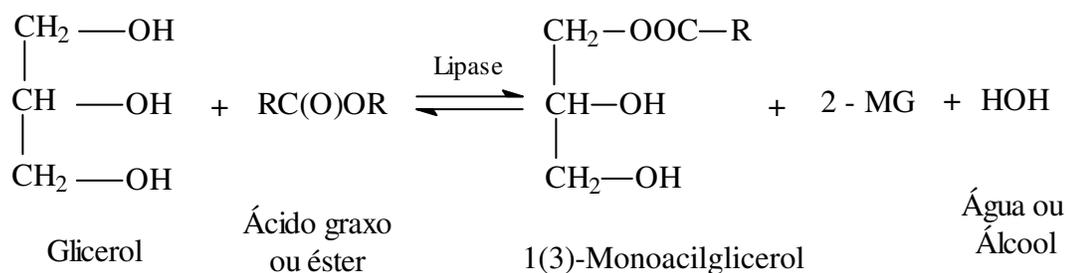


Figura 16 - Reação de esterificação do glicerol para produção de 1(3)-MAG.

PEREIRA et al. (2004) utilizaram um planejamento experimental para determinar quais as condições ótimas para produção de monolaurino a partir de esterificação direta de ácido láurico e glicerol, num sistema livre de solventes utilizando como biocatalizador a enzima imobilizada *Rhizomucor miehei*. As condições ótimas obtidas foram 55°C, uma razão molar de ácidos graxos livres e glicerol de 1:1 e 3% em massa de enzimas. O produto final obtido após 6 horas de reação foi de 45,5% (m/m) de monolaurino; 26,8% (m/m) de dilaurino; 3,1% (m/m) de trilaurino e 24,6% (m/m) de ácido láurico.

Da mesma forma, SILVA et al. (2007) obtiveram 61,5% (m/m) de monocaprino a partir de esterificação direta de ácido cáprico e glicerol.

2.9.4.3 Interesterificação enzimática de triacilgliceróis

MAG e DAG não são produzidos por esta rota de reação; são observadas apenas transformações de óleos e gorduras (Figura 14). Trata-se da substituição de ácidos graxos esterificados ao glicerol pela reação química entre um triacilglicerol e ácidos graxos. Nessa reação, seja ela química ou enzimática, há a formação de um novo triacilglicerol

estruturado, que adquire novas propriedades organolépticas, físicas e químicas. A interesterificação é usada como método alternativo à hidrogenação de óleos vegetais para a produção de margarinas e similares, como alternativa às gorduras *trans* (ADHIKARI e ADHIKARI, 1992).

2.9.4.4 Glicerólise de triacilgliceróis para produção de 1(3)-MAG.

Na glicerólise enzimática são produzidos MAG e DAG sem desperdício de ácidos graxos livres, a partir da esterificação do glicerol com TAG. Neste método, utiliza-se o glicerol como álcool, deste modo, os três ácidos graxos são aproveitados (Figura 17). Como a glicerólise de TAG apresenta baixo rendimento, geralmente produz 30 a 50% de monoacilgliceróis no equilíbrio químico, devido ao equilíbrio desfavorável da reação, diversas estratégias são adotadas para deslocar o equilíbrio no sentido desejável da reação, entre as quais são destacadas: presença ou ausência de solventes orgânicos, sistemas em estado sólido e micelas reversas (BORNSCHEUER, 1999; CHANG et al, 1991).

NOUREDDINI e HARMEIER (1998) testaram sete enzimas na glicerólise enzimática de óleo de soja. Dentre essas, a *Pseudomonas sp.* e *Rhizopus oryzae* apresentaram maior rendimento de MAG, cerca de 30 a 35% molar a 40°C e 1 hora de reação.

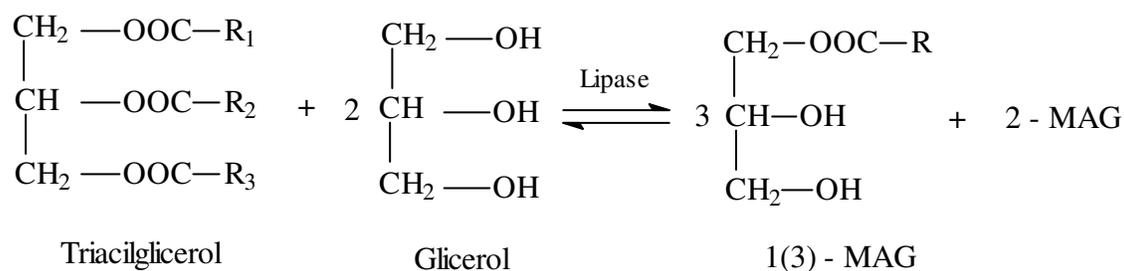


Figura 17 - Reação glicerólise para produção de 1(3) – MAG.

KAEWTHONG et al. (2005) utilizaram um reator do tipo CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*) para produção contínua de MAG pela glicerólise do óleo de palma utilizando enzimas imobilizadas. *Pseudomonas sp.* e *Candida rugosa* apresentaram produção de MAG de 50% em 6 horas de reação contínua a 30°C.

Quando se utiliza gordura animal para obter MAG a partir da glicerólise enzimática, é possível utilizar o processo de cristalização dos MAG aumentando assim a conversão, uma vez que a temperatura de cristalização (TC) de MAG obtidos a partir de gordura animal é cerca de 30 a 45°C, enquanto que a TC para MAG obtidos a partir de óleos vegetais está em torno de 5 a 10°C.

Segundo McNEIL et al. (1990), a glicerólise foi conduzida em uma emulsão de glicerol e triglicerídeo e, então, resfriada para a cristalização dos monoacilgliceróis. Com este método, o rendimento da reação aumentou de 30%, nas primeiras 25 horas de reação e 50 °C, para 70% após 50 horas à 40°C. Esta cristalização também aumenta as quantidades relativas de 1(3)-MAG sobre 2-MAG. Além da cristalização, pesquisadores têm utilizado membranas para retirada dos MAG do meio reacional e assim aumentar a produção de MAG.

2.10 UTILIZAÇÃO DA GLICERINA DERIVADA DO BIODIESEL

O glicerol é o principal componente do produto conhecido comercialmente como glicerina. O termo glicerol aplica-se somente para o composto puro, enquanto o termo glicerina (GL) aplica-se ao produto comercial com pureza normalmente maior que 95% (MOTA et al, 2009; KNOTHE et al, 2006).

Quanto à solubilidade, o glicerol é totalmente solúvel em água e álcool e pouco solúvel em éter dietílico, acetato de etila e dioxano, porém é insolúvel em hidrocarbonetos. (APPLEBY, 2005).

GL é matéria-prima empregada nas mais diversas áreas químicas, alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Uma das maneiras de se obter glicerina é através da reação de transesterificação de óleos e gorduras durante a produção de biodiesel. Ao final da produção de biodiesel formam-se duas fases. O sub-produto GL permanece na fase mais pesada, geralmente, composta por ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis não reagidos, ésteres metílicos, água, álcool e sais inorgânicos (resíduo de catalisadores). O álcool é geralmente recuperado por evaporação. A solução restante, após neutralização, será chamada de glicerina bruta. Esta mistura pode se apresentar na forma líquida ou sólida, variando sua coloração do transparente e amarelo claro até uma coloração opaca e marrom escuro, sendo necessários alguns tratamentos para que a GL alcance o grau de pureza necessário à sua utilização. Para remover as impurezas, inicialmente a glicerina bruta é filtrada ou centrifugada. Em seguida, é destilada a vácuo e branqueada por carvão ativado, para processos em larga escala, ou pode passar por troca iônica seguida de secagem tipo *flash*, para processos em pequena escala (EET, 2009). A Figura 18 ilustra diferentes colorações da GL de acordo com o avanço da purificação.

Assim, como a produção de biodiesel é realizada pela reação de transesterificação de óleos vegetais com alcoóis de cadeia curta (metanol ou etanol), conforme apresentado na

Figura 19, é gerado como subproduto desta reação moléculas de glicerol. Pode-se dizer que cerca de 100 kg de óleo reagem com 10 kg de álcool produzindo aproximadamente 100 kg de biodiesel e 10 kg de glicerina.



Figura 18 - Colorações de glicerinas de diversos graus de pureza.

Fonte: EET (2007)

Devido ao Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, desde 2010 5% de biodiesel é adicionado ao diesel fóssil (chamado B5). Em primeiro de Julho de 2009 o óleo diesel comercializado em todo o Brasil já continha 4% de Biodiesel (ANP, 2009).

O Brasil já é o terceiro maior produtor e consumidor de biodiesel do mundo com uma produção anual, em 2008, de 1,2 bilhões de litros e uma capacidade instalada, em janeiro de 2009, de 3,7 bilhões de litros (ANP, 2009). Isto significa que só em 2009 a produção de glicerina ultrapassou os 300 milhões de litros.

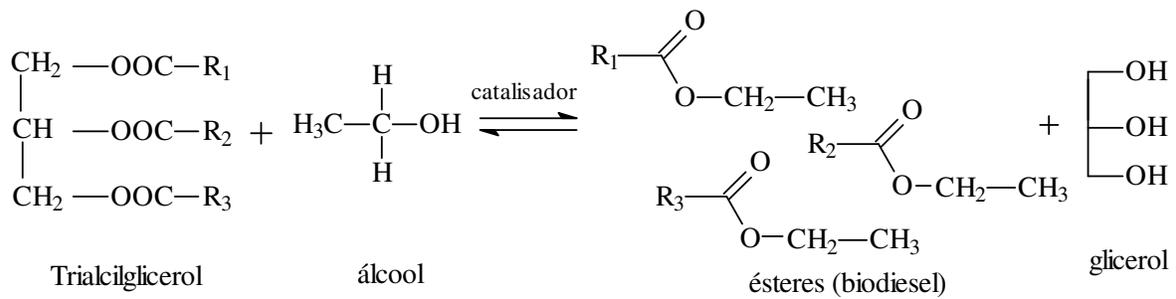


Figura 19 - Reação de transesterificação. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos (como exemplo, C10:0, C18:1, C18:2).

Nota-se que uma quantidade substancial de glicerina é produzida, sendo necessário encontrar aplicações em larga escala para este sub-produto, de modo a viabilizar a produção de biodiesel e evitar a subsequente queda dos preços do produto.

Algumas possíveis aplicações para a glicerina são plastificantes para PVC, plastificantes para amido, aditivos oxigenados para combustíveis, produtos de química fina, conversão em gás de síntese (MOTA et al, 2009).

Pesquisas recentes mencionam utilizar glicerina para produção de insumos petroquímicos, basicamente propanodióis a partir de fontes renováveis, com a vantagem de gerar polímeros com maior facilidade de decomposição quando comparado às fontes fósseis tradicionais (WANG et al., 2003; FREGOLENTE, 2007).

Como já mencionado, tanto nas reações de glicerólises químicas quanto nas enzimáticas, a GL, juntamente com o componente de triacilglicerol (óleo vegetal ou gordura animal), é o constituinte fundamental e particular para esse tipo de reação. Sendo assim, propõe-se a aplicação de GL como matéria-prima para MAG e DAG, que são

compostos com propriedades adequadas para utilização como emulsificantes em aplicações nobres, tais como na indústria alimentícia e farmacêutica.

2.11 DESTILAÇÃO MOLECULAR

Dependendo da finalidade para qual são produzidos, como exemplo, para indústria de alimentos, entre outras, é necessária a purificação dos MAG. Na literatura podem ser encontrados vários estudos envolvendo a concentração e purificação de MAG, tais como cromatografia de partição centrífuga, adsorção em coluna, resfriamento por solvente, cromatografia líquida de alta eficiência e destilação molecular. Particularmente, a destilação molecular consiste em um processo de destilação apropriado para a separação e purificação de substâncias termicamente sensíveis, assim como de líquidos com baixa pressão de vapor (MICOV, 1997).

Este processo ocorre em pressões baixas de modo que o efeito do vapor gerado sobre o líquido praticamente não influencia a taxa e o fator de separação da evaporação. Para tanto, a superfície de evaporação e a superfície de condensação devem estar separadas entre si a uma distância da ordem de grandeza do livre percurso médio das moléculas evaporadas, ou seja, as moléculas evaporadas atingirão o condensador facilmente, uma vez que encontrarão um percurso relativamente desobstruído. Isso difere da destilação convencional porque nem o ponto de bolha nem a formação de bolha são fatores determinantes no processo; além da evaporação, pelo fato que ela ocorre quando existe uma diferença de temperatura entre as superfícies de evaporação e condensação, e é

independente da condição da fase vapor. Por esse motivo, a destilação molecular é considerada um processo de não equilíbrio (BATISTELLA, 1996; HICKMAN, 1943).

Basicamente, existem dois tipos de destiladores moleculares: destilador de filme descendente e destilador centrífugo (BATISTELLA, 1996). Ambos os modelos têm como princípio de separação o alto vácuo e a formação de um filme líquido sobre a superfície do evaporador. Este filme é responsável por promover efetivas transferências de massa e calor. Tais características permitem a utilização de temperaturas amenas de operação para a realização das separações, quando comparadas às temperaturas utilizadas em processos convencionais de destilação. Além disso, a formação do filme líquido sobre a superfície do evaporador permite que haja apenas um curto tempo de exposição do líquido a ser destilado às temperaturas de operação, devido ao reduzido tempo de residência das moléculas no interior do destilador.

2.11.1 DESTILADOR MOLECULAR DE FILME DESCENDENTE

Destiladores moleculares de filme descendente utilizam a força da gravidade para promoverem a formação do filme líquido sobre a superfície do evaporador cilíndrico, geralmente com agitadores responsáveis pela distribuição uniforme do filme sobre toda a superfície do evaporador (CVEGROS et al., 2001). Quando há a presença destes agitadores em destiladores de filme descendente, alguns autores preferem utilizar o termo “destiladores de filme agitado” (MARTINS, 2005). O esquema de um destilador de filme descendente está ilustrado na Figura 20.

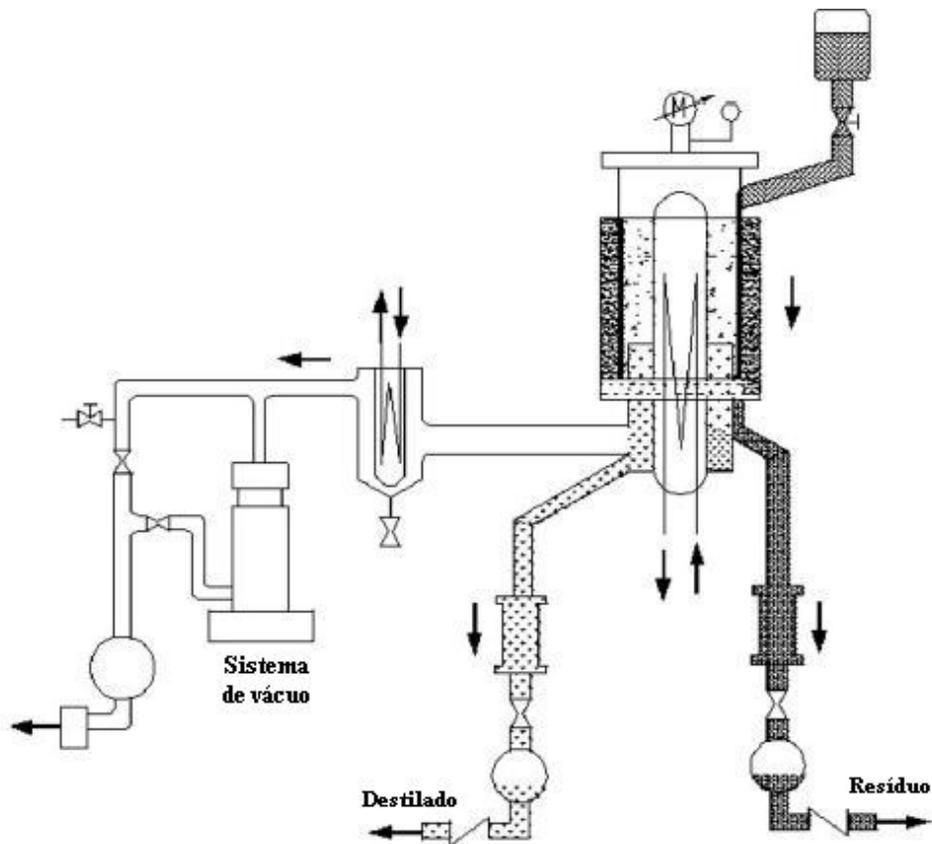


Figura 20 – Diagrama esquemático de um destilador de filme descendente.

2.11.2 DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO

Os destiladores moleculares centrífugos utilizam a força centrífuga para promoverem a distribuição do filme líquido sobre o evaporador, que possui forma cônica. A Figura 21 apresenta um esquema simplificado de um destilador molecular centrífugo. A cúpula que envolve o destilador geralmente é em vidro e tem por finalidade básica isolar o processo do meio externo, permitindo o vácuo. Apresenta-se também como um condensador complementar, resfriado a ar. O condensador tem a forma de um disco, de diâmetro próximo ao do evaporador e normalmente fica a uma distância média de alguns

centímetros do evaporador cônico. Este é fixado na base por meio de rolamentos e sistema de gaxetas, movido por um motor elétrico conferindo um movimento de rotação e é aquecido por radiação de um calefador elétrico. Uma vez que o material a ser destilado é mantido no evaporador pela força centrífuga, a operação é independente da força de gravidade.

No processo de destilação em um destilador molecular centrífugo, o líquido a ser destilado é aquecido até a temperatura de alimentação e conduzido por um tubo até o centro do rotor, onde há uma cavidade para melhor espalhar o líquido. Pela força centrífuga gerada pela rotação do disco o líquido destilante é conduzido até as bordas do evaporador formando uma camada líquida.

Na destilação molecular, as moléculas de vapor formadas encontram um caminho livre entre as superfícies do evaporador e condensador, ou seja, a distância entre estes dois componentes é menor do que o livre percurso médio das moléculas evaporadas. Nestas condições, teoricamente não há retorno de moléculas da fase vapor para a fase líquida devido à colisão entre moléculas (BATISTELLA, 2000). No entanto, em plantas industriais, a distância entre as superfícies do condensador e do evaporador é maior do que o livre percurso médio das moléculas de vapor. Neste caso, o processo passa a ser chamado de destilação de curto percurso (CHEN et al., 2005).

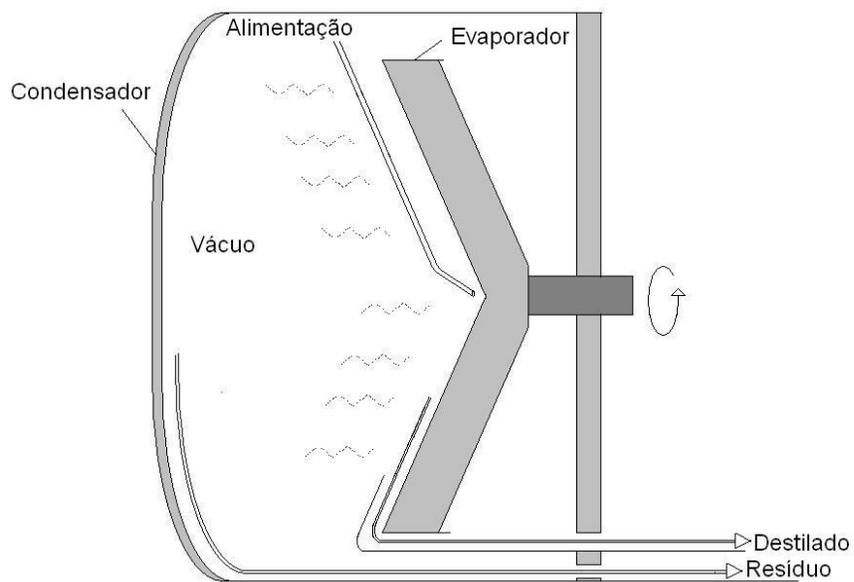


Figura 21 - Ilustração simplificada de um destilador molecular centrífugo (FREGOLENTE et al, 2009).

A eficiência do processo depende de variáveis de projeto, tais como geometria do evaporador (KAWALA, 2002), tipo de condensador (CVENGROS, 2000), presença de componentes entre o evaporador e o condensador (LUSITAN, 1998) etc., assim como de condições de operação do processo, como pressão de operação, temperatura de alimentação da matéria prima, temperatura do condensador entre outras.

Quando comparado o desempenho dos dois tipos de destiladores, filme descendente e centrífugo, o tempo de destilação do primeiro é cerca de 4 vezes maior, já que a força centrífuga aumenta a velocidade do líquido destilante (BATISTELLA, 1996). Assim, o destilador de filme descendente pode operar a uma temperatura menor que o destilador centrífugo, e ao final a quantidade de destilado é a mesma. Por outro lado, a desvantagem do filme descendente é que, sendo maior o tempo de exposição à temperatura do líquido a

ser destilado neste caso, pode levar à decomposição de alguns componentes sensíveis termicamente. Em casos de componentes mais sensíveis à temperatura, o destilador centrífugo é melhor, uma vez que este equipamento é mais compacto e a distribuição do líquido no rotor é mais uniforme, promovendo uma boa transferência de massa e energia, aumentando a eficiência (BATISTELLA, 1996).

2.11.3 APLICAÇÃO DA DESTILAÇÃO MOLECULAR – MODELO CENTRÍFUGO

O processo de destilação molecular representa uma contribuição importante, do ponto de vista tecnológico, para as indústrias produtoras de emulsificantes que têm interesse na produção de monoacilgliceróis de alta concentração. Nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos, representam cerca de 70% de todos os emulsificantes sintéticos utilizados (FERREIRA-DIAS et al., 2001). Através da destilação molecular utilizando o modelo centrífugo, FREGOLENTE (2005) obteve uma concentração de monoacilgliceróis de 96,3% fazendo várias destilações consecutivas a partir de uma mistura de acilgliceróis e ácidos graxos livres contendo inicialmente 43,6% de monoacilgliceróis.

Com relação à aplicação da destilação molecular na área de lipídeos, além da concentração de monoacilgliceróis, um vasto número de trabalhos tem sido publicados na área, como a recuperação de carotenóides a partir do óleo de palma (BATISTELLA et al., 2002), recuperação de tocoferol a partir do destilado da desodorização do óleo de soja (MORAES et al., 2004), purificação e desodorização de lipídeos estruturados (XU et al., 2002) e preparação de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados (BREIVIK, 1997).

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizados óleo de soja refinado, glicerina (99%) e as seguintes lipases cedidas gentilmente pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Denmark): *Thermomyces lanuginosus* (lipases livre líquida e imobilizadas), *Aspergillus niger* (lipase livre líquida), *Candida antarctica* B (lipase imobilizada) e *Rhizomucor miehei* (lipase imobilizada), e a lipase *Candida rugosa* (extrato de lipase livre) cedida pela Amano S/A. As características de cada lipase, referentes às suas seletividades estão descritas na Tabela 4.

As lipases imobilizadas foram obtidas na forma de sólidos granulados em diferentes matrizes de suportes, com exceção da CR obtida como extrato de lipase sólido. As lipases livres, de grau alimentício, foram obtidas na forma líquida em soluções aquosas. As características físicas das lipases empregadas na pesquisa são apresentadas na Tabela 5. As enzimas foram adicionadas às reações sem tratamento prévio, conforme especificado na ficha técnica fornecida pela Novozymes S/A.

Tabela 4 - Regioseletividade das diferentes lipases utilizadas.

SIGLA	Microrganismos de origem	Regioseletividade	Seletividade por tamanho da cadeia de AGL
RM-IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	moderadamente 1,3 seletiva	curta
CR	<i>Candida rugosa</i>	não seletiva	curta, média e longa
CA-IM	<i>Candida antarctica B</i>	1,3 seletiva	
AN-L	<i>Aspergillus niger</i>	1,3 seletiva	curta, média e longa
TL-L	<i>Thermomices lanuginosus</i>	levemente 1,3 seletiva	
TL-IM	<i>Thermomimes lanuginosus</i>	levemente 1,3 seletiva	

Tabela 5 – Características físicas das lipases utilizadas.

SIGLA	Matrizes de Suportes	Concentração de lipases em meio aquoso (% mássica)*	Atividade da Lipase (U/mg)
RM-IM	Resina fenólica de troca iônica		39,1
CA-IM	Resina acrílica macroporosa		45
AN-L		60,0 ± 2,5	230
TL-L		52,0 ± 2,0	246
TL-IM	Dióxido de silicone		145

*Determinado por análise de quantidade de água, método Karl Fischer.

3.1 REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTES

Os experimentos de glicerólise enzimática foram realizados num sistema em batelada em um reator de vidro encamisado com saídas para retirada de amostras e medição de temperatura, de acordo com a Figura 22 (A e B). A mistura de substrato

consistiu em óleo de soja e GL nas seguintes condições: razão molar glicerina/óleo (GL: TG) igual a 4 ou 8; 10, 5 ou 2% de meio enzimático (lipases) em relação à massa de óleo, 3,5% de água (em relação à massa de GL, para o caso de lipases imobilizadas). A mistura de substrato foi agitada na presença de lipases livres ou imobilizadas, através de agitadores magnéticos a 300 rpm. A temperatura de todas as reações foram as temperaturas ótimas pré-estipuladas nas fichas técnicas para cada lipase utilizada e estas variaram de 40 a 70°C.

O reator da Figura 22 (A) foi empregado nos experimentos de reutilização de lipases e o reator (B) foi empregado para obtenção de cerca de 6 L de acilgliceróis para testes de separação em destilador molecular.



Figura 22 – Reatores de vidro utilizados em reações de glicerólise enzimática; (A) Reator de 70 mL com agitação magnética; (B) Reator de 2 L com agitação mecânica.

3.2 REAÇÕES DE GLICERÓLISE QUÍMICA DO ÓLEO DE SOJA

Os experimentos de glicerólise química foram realizados num sistema em batelada em um reator de vidro redondo com três bocas, inserido em uma manta aquecedora com controle de temperatura, termopar interno para controle da temperatura da reação e agitação mecânica. A mistura de substrato consistiu em óleo de soja e GL totalizando 50 g de substrato nas seguintes condições: razão molar glicerina/óleo (GL: TG) igual a 4; 0,10 g de NaOH como catalisador, 210 °C e pressão atmosférica. A reação foi acompanhada por um tempo total de 3 horas. As condições escolhidas para a reação foram estipuladas e adaptadas através de condições operacionais de trabalhos publicados na literatura (FREGOLENTE et al, 2005; NOUREDDINI e MEDIKONDURU, 1997; POUILLOUX et al, 2000;).

3.3 REAÇÕES DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA EM SISTEMAS UTILIZANDO SOLVENTES

Os experimentos de glicerólise enzimática utilizando solventes orgânicos foram realizados num sistema em batelada em um reator de vidro encamisado com saídas para retirada de amostras e medição de temperatura, de acordo com a Figura 22 (A). A mistura de substrato consistiu em óleo de soja e GL nas seguintes condições: razão molar glicerina/óleo (GL: TG) igual a 4, 10 ou 2% de meio enzimático (lipases) em relação à massa de óleo, razão mássica solvente/óleo (A/O) igual a 1,5 ou 2. Para este experimento foram testados os seguintes solventes: Hexano, Acetona, Hexano/Acetona (50:50) e Álcool *terc*-Butanol. A mistura de substrato foi agitada na presença de lipases livres ou

imobilizadas, através de agitadores magnéticos a 300 rpm. A temperatura de todas as reações foram as temperaturas ótimas pré-estipuladas nas fichas técnicas para cada lipase utilizada e estas variaram de 40 a 70°C.

3.4 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GLICERINA DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Foram realizadas reações de glicerólise enzimática de óleo de soja, desta vez com GL obtida do processo de produção de biodiesel do próprio laboratório onde esta tese está sendo desenvolvida.

Após a reação de transesterificação que converte a matéria graxa em ésteres (biodiesel), a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação ou por centrifugação. A fase mais pesada é composta de glicerina (GL) bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água, e de impurezas inerentes à matéria-prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas. A fase pesada, contendo água e álcool, foi submetida a um processo de evaporação, eliminando-se da glicerina bruta esses constituintes voláteis, sendo estes vapores voláteis liquefeitos num condensador apropriado.

Após a retirada do álcool, a GL bruta obtida foi submetida a um processo de purificação para então ser utilizada diretamente nos experimentos para produção de MAG e DAG. As amostras de GL bruta e purificada foram cedidas pela pesquisadora do Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação – LDPS/UNICAMP – Nívea de Lima da Silva (SILVA, 2009; SILVA et al, 2006).

Na tentativa de se utilizar a GL bruta nas reações enzimáticas para produção de MAG e DAG, a GL bruta obtida após a evaporação do álcool foi utilizada diretamente nas reações. A GL bruta continha 70% de GL, 2% de TAG, 18% de DAG, 8% de MAG e 2% de AGL. A GL bruta apresentava pH 5,5, indicando acidez da amostra. As condições utilizadas na reação foram as seguintes: razão molar G/O = 8, 2% de lipase de CA-IM (em relação à massa de óleo), 3,5% de água (em relação à massa de GL), T = 70°C, tempo de 24 horas.

3.5 REUTILIZAÇÃO DE LIPASES EM SISTEMAS LIVRES DE SOLVENTES

No caso em particular da glicerólise enzimática para produção de MAG e DAG, a lipase é adicionada ao meio contendo GL e TAG, com adição de água (caso a lipase seja imobilizada), como descrito no item 3.1. As fases GL e TAG não são miscíveis e após cada etapa de 24 horas de reação, mesmo após o TAG converter-se parcialmente em DAG, MAG e AGL, a fase lipofílica contendo os acilgliceróis e a fase hidrofílica, glicerol e lipases, são separadas espontaneamente. Visto isso, o seguinte experimento visando verificar a reciclabilidade das lipases no sistema de glicerólise enzimática, em sistemas livres de solventes, foi efetuado.

Inicialmente, a reação de glicerólise enzimática foi acompanhada normalmente, durante 24 horas. Após este período, sem que houvesse a retirada total de todos os componentes finais da reação, foi retirada do reator batelada apenas a fase superior contendo TAG, DAG, MAG e AGL. A fase inferior contendo GL, água extra (caso utilizado lipase imobilizada) e a lipase foi mantida no reator. Após a remoção do reator dos

acilgliceróis, uma nova carga de TAG proveniente do óleo de soja, igual à primeira alimentação de TAG (levando-se em conta razão molar GL:TAG de 8:1) foi adicionada ao reator, e um novo ciclo de reação de 24 horas foi acompanhado. Este procedimento foi realizado até serem completados quatro ciclos de reação, sempre com a mesma carga de GL e a mesma quantidade inicial de lipase.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE

A determinação da atividade de hidrólise por titulometria foi baseado no método descrito por Thomson (1999), através da titulação com KOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima sobre os triacilgliceróis presentes no óleo de oliva. A atividade foi determinada utilizando-se uma curva padrão de ácido oléico puro. Uma unidade de atividade lipolítica é definida como a quantidade de enzima que libera um micromol de ácidos graxo por minuto, nas condições de ensaio descritas (THOMSON et al, 1999).

3.7 ANÁLISE DE ACILGLICERÓIS, AGL E GL

A análise de acilgliceróis, AGL e GL foi efetuada por meio de cromatografia por exclusão de tamanhos (*high-performance size exclusion chromatography*, HPSEC), baseando-se no trabalho de SCHOENFELDER (2003), como ilustrado na Figura 23 sobre a análise de um padrão de acilgliceróis. O sistema cromatográfico utilizado consiste de uma bomba isocrática, modelo 515 HPLC pump (Waters), um detector de índice de refração modelo 2410 (Waters) e um módulo de controle de temperatura (Waters). As

amostras foram injetadas utilizando-se um injetor manual, modelo Rheodyne 7725i com um *loop* de 20 µl (Waters). Duas colunas, Styragel HR 0,5 e HR 1 (Waters) de 7,8 x 300 mm de dimensão e tamanho de partícula de 5 µm foram posicionadas em série. A primeira coluna possui uma capacidade de separação de moléculas de massa molar na faixa de 100 até 5000 Da e a segunda de 1000 até 10.000 Da. A fase móvel utilizada foi tetraidrofurano grau HPLC (Tedia) a uma vazão de 1 mL/min. Para esta vazão, a pressão típica de operação é de 450psi (3102kPa). Todas as análises foram efetuadas a 40°C.

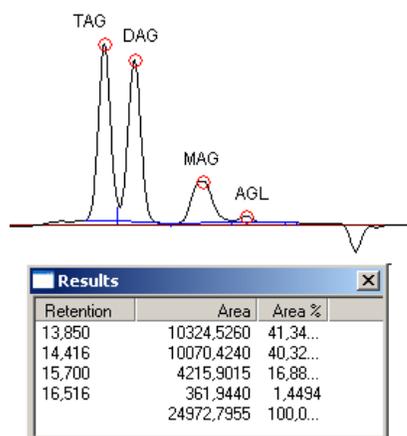


Figura 23 – Ilustração de cromatograma por exclusão de tamanhos típico da separação de acilgliceróis.

3.8 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE SOJA

A determinação da composição de ácidos graxos foi realizada através da cromatografia a gás, convertendo os acilgliceróis produzidos na glicerólise a metil ésteres através do método de HARTMAN (1973).

As análises foram conduzidas injetando-se 1 µL da amostra num cromatógrafo Varian modelo STAR 3600CX, equipado com um detector de ionização de chama. Uma coluna DB23 de 30m de comprimento, diâmetro interno igual a 0,25mm e filme de 0,20 µm foi utilizada. As condições empregadas nas análises foram pré-estabelecidas: Pressão na cabeça da coluna de 15 psi, temperatura do injetor de 250°C, temperatura do detector de 300°C, Split de 1:100. A rampa de aquecimento utilizada na coluna cromatográfica foi: 50°C por 2 min, de 50 até 180°C a 10°C/min, 180°C por 5 min e 180 até 240°C a 5°C/min.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção dos componentes presentes em cada amostra com os tempos de retenção dos componentes presentes no padrão F.A.M.E. (Fatty Acid Methyl Ester) e em óleos de composição conhecida.

3.9 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ POR TITULOMETRIA

A quantificação da acidez foi realizada seguindo o método oficial Ca 5a-40 da AOCS (2004). A concentração de ácidos graxos livres foi calculada segundo a equação:

$$AGL(\%) = \frac{28,2 \cdot V \cdot C}{P},$$

onde V é o volume de solução de NaOH gasto, C é a concentração da solução de NaOH, P é a massa da amostra e 28,2 é o fator de correção para o ácido oleico.

3.10 DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO - ESCALA LABORATORIAL

Foi utilizado um destilador molecular centrífugo da marca Myers Vaccum inc. com área de evaporação igual a $0,0046\text{m}^2$ para experimentos em escala laboratorial. O equipamento utilizado é mostrado na Figura 24. A mistura a ser destilada é aquecida até a temperatura de alimentação (TA) de 60°C e através de uma bomba dosadora é alimentado no centro do evaporador a uma vazão pré-determinada. Através da força centrífuga, um fino filme líquido é formado uniformemente na superfície do evaporador, o qual é aquecido por resistências elétricas e gira a uma velocidade de 1450 rpm/min. A temperatura do evaporador (TE) variou de 100 a 250°C . Uma fração mais leve do material a ser destilado é evaporada na superfície do evaporador, a qual atinge a superfície do condensador aquecida, que está a uma distância do evaporador menor do que o livre caminho médio das moléculas destiladas. A temperatura do condensador (TC) é mantida em 60°C , assim como as temperaturas das correntes de saída de destilado e resíduo (TLS).



Figura 24 – Destilador molecular centrífugo, escala laboratorial.

3.11 DESTILADOR MOLECULAR CENTRÍFUGO - ESCALA PILOTO

Em experimentos em escala piloto, foi utilizado o protótipo nacional de destilador molecular centrífugo (processo FAPESP 01/10092-2) (BATISTELLA, 2008). Este protótipo possui capacidade de processamento de 5 a 40 L/h e área de evaporação de 0,1252 m².

As condições de temperaturas de alimentação e saída de material são similares ao equipamento importado de escala laboratorial. A temperatura do condensador (TC) é mantida em 60°C, assim como as temperaturas das correntes de saída de destilado e resíduo (TD e TR).

A máxima velocidade de rotação é de 500 rpm. A temperatura do evaporador (TE) variou de 100 a 200°C. Uma fração mais leve do material a ser destilado é evaporada na

superfície do evaporador, a qual atinge a superfície do condensador aquecida, que está a uma distância do evaporador menor do que o livre caminho médio das moléculas destiladas.

3.12 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE DAG

Para preparar as amostras de óleo de DAG para análises posteriores, estas foram centrifugadas a fim de retirar materiais em suspensão provenientes das últimas etapas das destilações. A centrifuga utilizada foi uma Centrifuga Microprocessada NT810, marca Novatécnica, com rotação máxima de 3300 rpm durante 20 minutos.

3.13 ANÁLISE DA MASSA ESPECÍFICA DOS LIPÍDIOS

As análises de massa específica (g/cm^3) dos óleos utilizados e acilgliceróis obtidos nas reações enzimáticas e após destilações moleculares foram realizadas em um Viscosímetro Stabinger SVM 3000/Anton Paar, a várias temperaturas.

3.14 ANÁLISES TÉRMICAS DOS LIPÍDIOS

Experimentos de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) das amostras de óleo de soja e glicerídeos após reações enzimáticas e separação por destilação molecular foram conduzidos em um equipamento DSC Mettler Toledo Star, modelo 823. Aproximadamente 8 mg de amostra foram colocadas em cápsulas de alumínio, com uma cápsula vazia como

referência. A análise de Degradação Térmica foi conduzida em atmosfera de Nitrogênio, com fluxo de 50 mL/min, com aquecimento de -50 a 300°C a uma taxa de 10°C/min.

3.15 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁGUA DE LIPASES LIVRES

A determinação da quantidade de água das lipases livres (AN-L e TL-L) solúveis doadas foi feita através de titulação coulométrica de água pelo método de Karl Fischer, em equipamento Mettler Toledo DL31, de acordo com norma ASTM E203 (2001).

CAPÍTULO 4

4 RESULTADOS

4.1 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

4.1.1 *SCREENING DE LIPASES*

Para selecionar as lipases mais adequadas para a produção de DAG e MAG através de glicerólise enzimática, diferentes lipases foram verificadas, sobre as mesmas condições operacionais, diferenciando apenas as temperaturas de reação dependendo de cada lipase, uma vez que as enzimas apresentam desempenhos diferentes em diferentes temperaturas. Os produtos das reações são apresentados como frações mássicas (%) de TAG, DAG, MAG e AGL. As porcentagens das frações mássicas de TAG, DAG, MAG e AGL após 24 horas de reação para cada lipase são apresentadas na Figura 25.

Observou-se que a lipase RM-IM não apresentou um desempenho satisfatório para produzir DAG e MAG. Verificou-se que as partículas desta enzima tendem a se aglomerar juntamente com a fase glicerol, devido a uma maior afinidade com a fase hidrofílica.

Além disso, de acordo com BORNSCHEUER (1999) e MUKHERJEE (1998), esta lipase apresenta maior seletividade com moléculas que possuem cadeia de ácidos graxos de cadeia curta (10 – 6 carbonos). Porém, estes ácidos graxos menores não possuem presença significativa na composição do óleo de soja, como pode ser observado na Tabela 6, o que teria influência na conversão da reação quando utilizada essa lipase. No entanto será

abordado a seguir que este pode não ser o único fator que levaria a um baixo rendimento por parte desta lipase, mas que outros fatores influenciam, por exemplo, o tipo de material a que a lipase esta imobilizada.

Tabela 6 – Composição inicial de ácidos graxos do óleo de soja.

Ácido Graxo	Composição % (m/m)
C16:0 – Palmítico	11,6
C18:0 – Esteárico	2,5
C18:1 – Oléico	22,5
C18:2 – Linoleico	54,9
C18:3 – α -Linolênico	5,5
C20:0 – Araquídico	0,4
C20:1 – Gadolênico	0,4
Saturados	16,6
Insaturados	83,4

Nas condições de reação descritas na Figura 25, a lipase de *Candida rugosa* (CR) também não obteve resultados satisfatórios na produção de DAG e MAG. A Figura 25 mostra que a reação catalisada pela lipase de *Candida antarctica* (CA-IM) apresentou o melhor desempenho na produção de DAG e MAG. De acordo com FERREIRA-DIAS et al. (2001), a aquafilicidade (Aq) do suporte pode ser usada como um indicador de sua afinidade pela água e pela fase hidrofílica do glicerol e, desta maneira, poder avaliar as possíveis diferenças na hidrofilicidade entre os suportes usados nas lipases imobilizadas. O suporte utilizado para imobilizar a lipase CA-IM apresenta hidrofilicidade menor do que os

suportes usados como matriz para imobilizar a lipase RM-IM (FERREIRA-DIAS et al. 2001). Os resultados podem ser explicados através das diferentes afinidades do glicerol (composto hidrofílico) por cada suporte. De acordo com FERREIRA-DIAS et al. (2001) o suporte de RM-IM apresenta Aq cerca de 06 vezes maior que CA-IM, levando, assim, a uma maior concentração de glicerol no microambiente da lipase. A formação de uma camada de glicerol ao redor das partículas de lipase pode restringir o contato entre lipase e o substrato hidrofóbico, no caso TAG e DAG.

TL-IM, TL-L e AN-L propiciaram uma alta produção de DAG (40%) e ambas apresentaram uma produção aproximada de MAG (cerca de 20%); em contrapartida, os resultados obtidos por TL-L mostram também uma elevada produção de AGL nas condições do experimento. Esta lipase livre apresenta uma alta conversão de TAG, assim como os resultados apresentados pela lipase AN-L. Devido ao fato dessas lipases serem previamente solúveis em fase aquosa, a porcentagem em massa de água no meio reacional durante a reação eleva-se um pouco em relação à quantidade calculada. Neste caso, devido ao excesso de água decorrente da lipase livre estar dispersa em fase aquosa, a reação de hidrólise pode predominar sobre a reação de glicerólise, produzindo uma quantidade maior de AGL – que é a principal característica da reação de hidrólise.

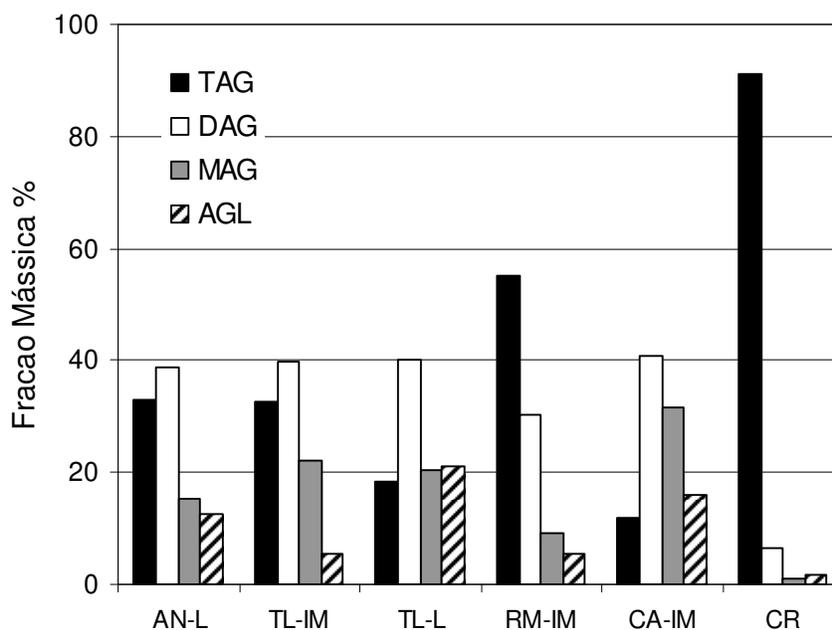


Figura 25 – Glicerólise do óleo de soja utilizando várias lipases. Condições: 10% de enzima (% em relação à massa de óleo), 3,5% de água (% em relação à massa de glicerol), 24 horas de reação. T = 40°C (AN-L, TL-L, RM-IM), 50°C (TL-IM, CR-IM) e 70°C (CA-IM). Razão molar do substrato Glicerol/Óleo = 4 (AN-L, TL-L, RM-IM) e 8 (TL-IM, CA-IM e CR).

Através das condições das reações descritas na Figura 25, observa-se que foi fixado uma concentração de 3,5% de água, em relação à massa de glicerol, quantidade essa que se repetirá em todas as outras reações enzimáticas que necessitem de água no sistema (como será discutido posteriormente). Essa quantidade foi pré-estabelecida através de outros trabalhos da literatura que empregaram a glicerólise enzimática em reações livres de solventes. Em relação às quantidades de óleo e glicerol na reação de glicerólise, esta segue a regra da estequiometria da reação. Ao contrário, para a quantidade de água, não há uma relação obrigatória, desde que essa quantidade seja suficiente para promover uma interface

entre a lipase e os substratos. Na literatura são encontrados trabalhos empregando glicerólise enzimática de triacilgliceróis para produção de MAG e DAG que usam desde 3% (KRISTENSEN, 2005) 3,5% (NOUREDDINI, 1998; KRISTENSEN, 2005b) até 4% (PAWONGRAT, 2007; KAEWTHONG, 2005) de água, em relação à massa do glicerol.

No entanto, será discutido nos itens seguintes que a quantidade de água no sistema de glicerólise enzimática de triacilgliceróis livre de solventes interfere na produção de AGL, afetando a produção de MAG e DAG.

4.1.2 ESTUDO COM LIPASE TL IM – SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

Enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua estrutura e flexibilidade. A concentração de água é necessária uma vez que as enzimas atuam na interface óleo/água, permitindo a formação de um complexo acil-enzima. Como pode ser observado na Figura 26(a) a conversão de TG para a reação que contém 3,5% de água é 48,15% maior que a reação isenta de água, nas mesmas condições, Figura 26(b). A reação ilustrada pela Figura 26(b) ocorreu devido a um mínimo de 0,5% de água presente na composição inicial do glicerol. As produções de DAG e MAG são, respectivamente, 23 e 58% menor quando a glicerólise enzimática ocorre na ausência de quantidade extra de água.

Tabela 7 – Efeito da concentração de água no glicerol na produção de DAG, MAG e AGL para as lipases TL-L e AN-L.

Lipases		Fração Mássica (%)			
		TAG	DAG	MAG	FFA
TL-L	(a)	19,47	47,00	22,87	10,65
	(b)	18,46	40,20	20,37	20,96
AN-L	(a)	31,14	44,88	16,66	7,31
	(b)	33,13	38,89	15,30	12,66
TL-IM	(b)	29,43	44,59	21,41	4,56

(a): Ausência de água extra;

(b): 3,5% de água extra (wt % da massa de glicerol)

T = 50°C, Razão molar Glicerol: Óleo = 8, 10% quantidade de lipase (wt% da massa de óleo), 24 horas de reação. Erro padrão = $\pm 0,72$.

De acordo com a Tabela 7, lipases livres na ausência de quantidade extra de água produzem cerca de 50 – 57% menos AGL devido à diminuição na competição entre as reações de glicerólise e hidrólise. Essas lipases foram obtidas livres em solução aquosa, segundo a Tabela 5. De modo similar, as frações mássicas de DAG e MAG para ambas as lipases livres aumentam, 15 e 13% de DAG e MAG para TL-L e 11 e 8% de DAG e MAG para AN-L, respectivamente, prevalecendo a reação de glicerólise quando a água presente no meio reacional provem apenas da solução aquosa da própria lipase. Os resultados das reações que utilizam TL-L, porém sem adição de água extra podem ser comparadas aos das reações que utilizam TL-IM. Sabe-se que a quantidade efetiva de lipase é diminuída pela metade, porém de acordo com a Tabela 5, a atividade enzimática da lipase livre é duas vezes a atividade da lipase TL-IM. Entretanto, o emprego de lipases livres apresenta algumas desvantagens, como por exemplo a impossibilidade de haver reciclo de lipases no

sistemas convencionais. Em capítulos posteriores são apresentadas alternativas que viabilizam o emprego de lipases livres na produção de MAG e DAG.

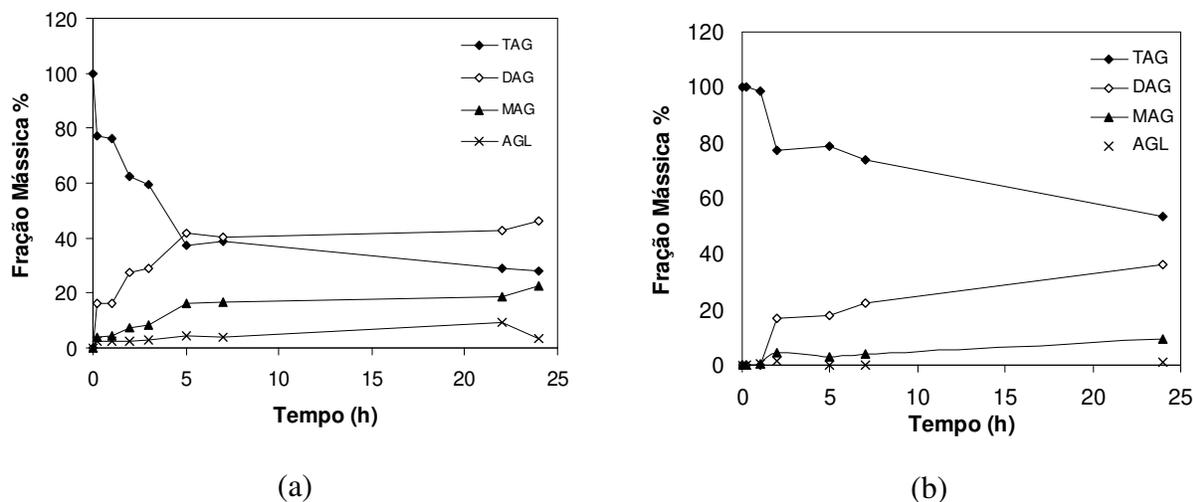
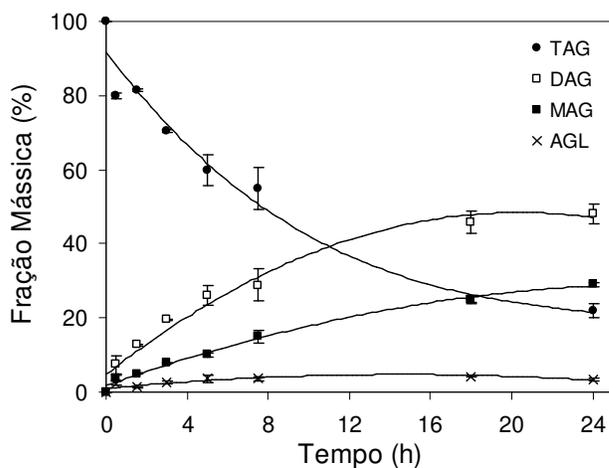


Figura 26 – Glicerólise enzimática do óleo de soja utilizando 10% de TL-IM (em relação à massa de óleo), a 40 °C, razão molar G/O = 8; a) 3,5% de água (em relação à massa de glicerol), b) ausência de água.

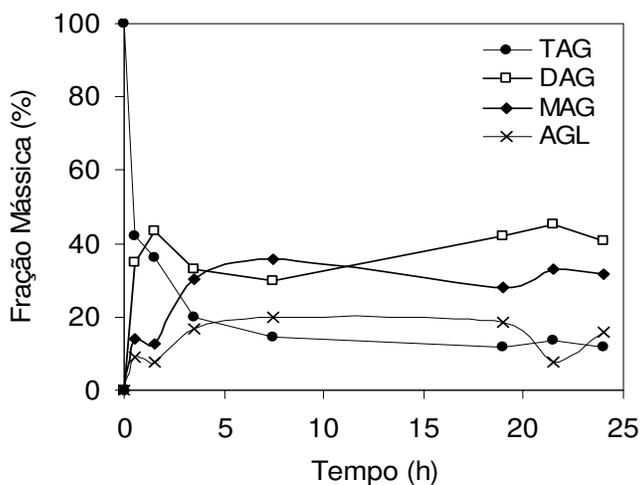
4.1.3 LIPASE CA-IM - EFEITO DA QUANTIDADE DE ENZIMAS

O efeito da quantidade de lipases nas reações de glicerólise foi investigado utilizando lipases imobilizadas de *Candida antarctica* B (CR-IM), uma vez que esta apresentou a melhor performance na produção de DAG e MAG. A Figura 27 (a, b) mostra a cinética da glicerólise enzimática do óleo de soja em um sistema livre de solventes quando utilizados 2% (a) e 10% (b) de CA-IM a 70 °C. Como pode ser observado, adicionando-se 2% de CA-IM a reação alcança o equilíbrio mais lentamente e as composições de DAG e MAG são 48,76 e 24,02%, respectivamente, e 5,2% de AGL após 24 horas. O mesmo comportamento de reação é observado quando utilizado 5% de CA-IM

(em relação à massa de óleo), nas mesmas condições de reação (Figura 28). Para 5% de lipase, as concentrações finais de DAG e MAG são similares, 48,28 e 24,64%, respectivamente, com 5,83% de AGL. As conversões obtidas para cada reação de glicerólise quando utilizado 2, 5 e 10% de lipase no meio reacional são, respectivamente, 74, 78 e 88%. A Figura 28 mostra que a utilização de uma concentração de 10% de lipase no meio reacional aumenta em 30% a produção de MAG. Em contrapartida, diminui em 23% a produção de DAG e aumenta drasticamente a produção de AGL, de 3,36% (quando utilizado 2% de lipase) para 16,76% de AGL (quando utilizado 10% de lipase no meio reacional). As vantagens de se obter maior conversão de reação (88%) e maior produção de MAG quando se utiliza 10% de *Candida antarctica B* não supera as desvantagens de se empregar altas quantidades de lipase na reação (visto que o preço das lipases é o fator dominante quando se trata de custo do processo enzimático) e da alta produção de AGL, pois a separação dos MAG e AGL é dificultada mesmo utilizando a técnica de destilação molecular.



(a)



(b)

Figura 27 – Quantidade de enzima (% em relação à massa de óleo) na glicerólise à 70°C, razão molar de substrato G/O = 8, a) 2% de CA-IM; b) 10 % CA-IM.

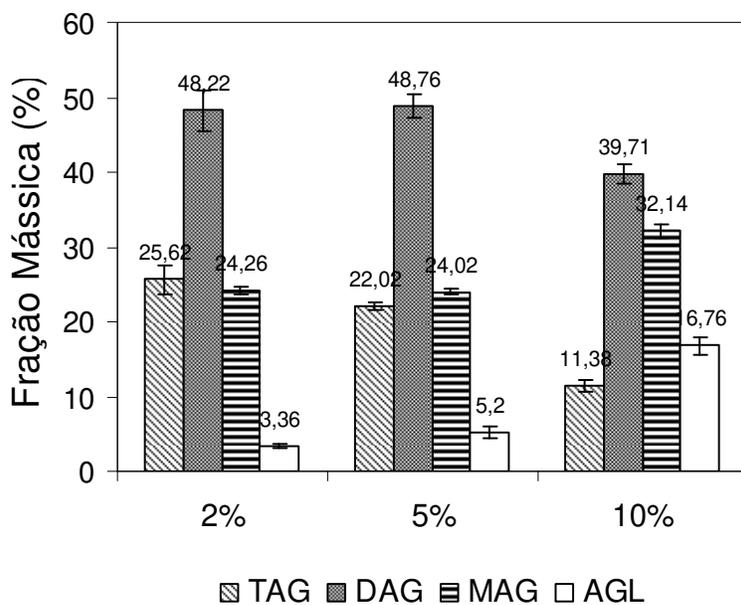


Figura 28 – Acilgliceróis (TAG, DAG, MAG, AGL) produzidos por glicerólise enzimática do óleo de soja a diferentes concentrações (2, 5 e 10%) de lipase de *Candida antarctica* B. Condições: T = 70°C, Razão Molar G/O = 8, água = 3,5% (em relação à massa de glicerol).

4.1.4 DIFERENÇAS ENTRE GLICERÓLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA

Atualmente, a produção de MAG e DAG se dá por síntese química, uma vez que por esta rota a reação é mais rápida, podendo obter em torno de 50 – 55% de MAG. O catalisador normalmente utilizado é NaOH, e devido às altas temperaturas de reação, muitos subprodutos oriundos de reações paralelas de polimerização e degradação dos produtos podem ocorrer. Ao final da reação química, o produto obtido apresenta coloração escura e forte odor desagradável. Em escala laboratorial, a reação química foi acompanhada durante 3 horas, a 210 °C, como apresentado na Figura 29. Como resultados, foram obtidos 58% de MAG e 40% de DAG, com conversão de TAG de 95%.

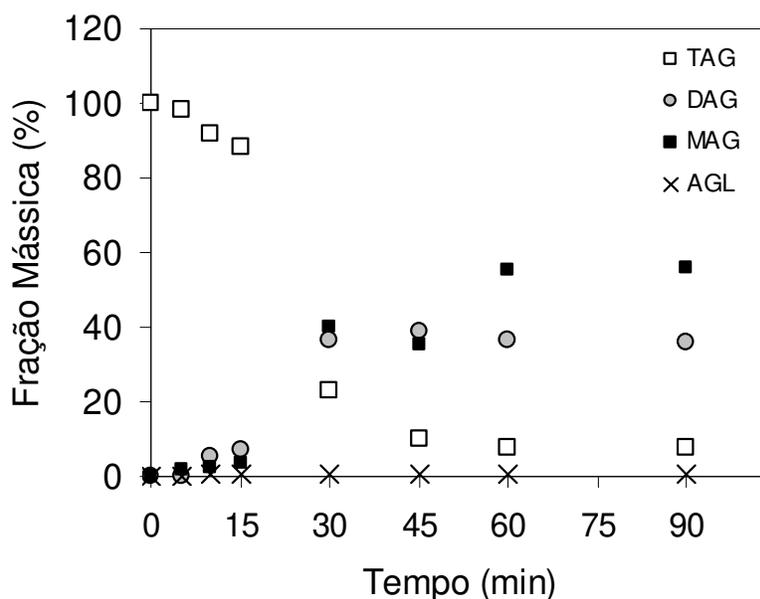


Figura 29 – Acompanhamento da reação de glicerólise química para produção de MAG a 210°C.

Ao término da reação, as afirmações sobre cor e odor encontradas na literatura para os produtos da reação química foram confirmados. Como exemplo, a Figura 30 ilustra as diferenças de coloração entre (A) produto da reação enzimática, (B) produto da reação química e (C) óleo de soja refinado comum. O contraste de cor é forte indício dos subprodutos, possível degradação de produtos e resíduo de catalisador que a reação química contém.

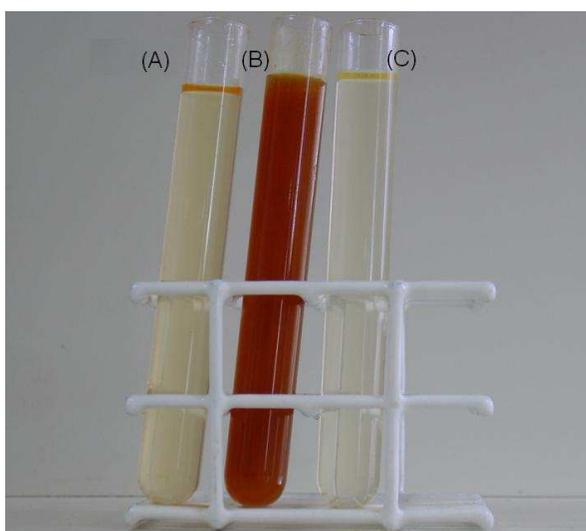


Figura 30 – Diferenças de coloração entre glicerólise química e enzimática para produção de MAG e DAG. (A) Reação enzimática após 24 horas; (B) Reação química após 3 horas com NaOH; (C) Óleo de Soja refinado.

Devido aos exemplos observados sobre a reação química para produção de emulsificantes, as indústrias precisam modificar seus processos para tecnologias mais limpas e que gerem produtos de alta qualidade para o consumidor mais exigente. É o caso das reações enzimáticas em substituição às reações químicas para esta finalidade. Mesmo que a rota enzimática necessite de um tempo maior de reação, utilize biocatalisadores mais caros que os catalisadores químicos convencionais, esta rota vem ganhando espaço nas

pesquisas e conseqüentemente sendo implementada em escala industrial. Essa compensação se dá uma vez que o processo enzimático é considerado tecnologia limpa, com mínima geração de poluentes, não necessita de grandes fontes energéticas pois não são necessárias altas temperaturas no processo e produz produtos de alta qualidade para o mercado consumidor cada vez mais exigente em qualidade.

4.2 APROVEITAMENTO DE GLICERINA – RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Foram realizadas reações de glicerólise enzimática de óleo de soja, desta vez com GL bruta e GL purificada obtida do processo de produção de biodiesel. Os primeiros testes realizados diretamente com GL bruta não obtiveram resultados satisfatórios pois o pH ácido da GL bruta e as impurezas inerentes à reação de transesterificação (mono, di e triacilglicerol que não reagiram, resíduo de ácidos graxos, sabões, resíduo de catalisadores) provocaram desnaturação da lipase, não apresentando conversão para este caso.

Desse modo, para utilizar a GL excedente da reação de biodiesel no processo enzimático para obtenção de emulsificantes, é necessário que haja eliminação das impurezas da GL bruta. A GL purificada apresentou características de transparência, incolor e bastante espessa, mais viscosa que a GL comercial. Nas reações de glicerólise, observa-se que mesmo a GL comercial apresenta pouca miscibilidade com óleo; porém, foi observado que a GL do biodiesel destilada não apresentava miscibilidade com o TAG dentro do reator mesmo com alta rotação e dessa forma pôde ser observada a divisão de fases óleo/glicerina dentro do reator. Para a reação com essa GL destilada foram utilizadas

as mesmas condições anteriores que para a reação com GL bruta. A reação foi acompanhada periodicamente e é apresentada na Figura 31.

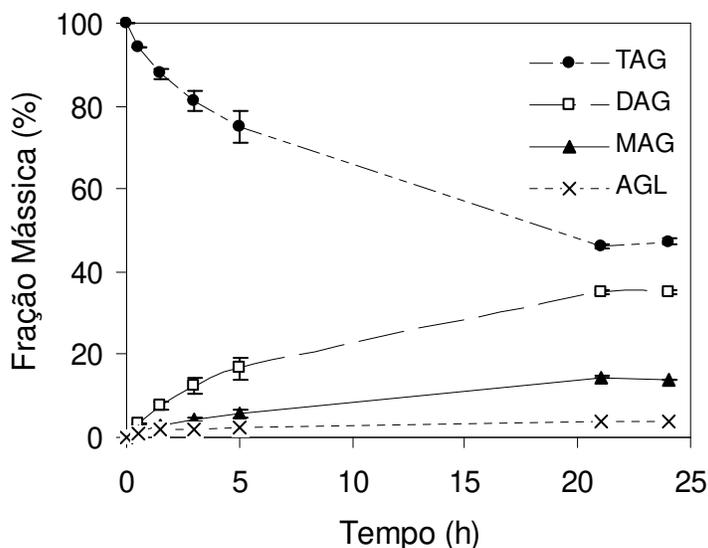


Figura 31 – Reação de Glicerólise enzimática do óleo de soja com glicerina destilada, obtida da reação de biodiesel.

Observa-se que, devido à dificuldade em promover a completa miscibilidade entre as fases óleo/glicerina durante a reação, a produção de DAG e MAG após 24 horas de reação não se igualou aos resultados de reações, quando utilizadas as mesmas condições de reação, porém com GL comercial. No caso do uso da GL destilada, a produção de DAG foi de 35% e de MAG de 14%. Comparando-se com resultados obtidos com glicerina comercial, nas mesmas condições, as produções de DAG e MAG são 48,76 e 24,02%, respectivamente (Figura 27b).

No entanto, o teste foi satisfatório, pois demonstrou ser possível aproveitar a glicerina proveniente da reação de biodiesel como reagente da reação de glicerólise. No momento em que a produção de biodiesel cresce no país, o excedente de glicerina também

gerada se torna um resíduo, que necessita de uma finalidade, e não apenas ser descartado. A aplicação direta dessa glicerina produz dois produtos de valor econômico: os MAG como emulsificantes e óleo rico em DAG.

Nesse sentido, é possível apresentar um processo que integre a produção do biodiesel e a utilização da glicerina excedente para produção de outros produtos de alto valor de mercado. A Figura 32 ilustra um fluxograma que exemplifica os passos de cada processo, desde a produção do biodiesel e a geração de glicerina, e esta sendo aplicada para produção de outros produtos, como por exemplo, os MAG e DAG.

Vale ressaltar que os resíduos da GL bruta inerentes a matéria-prima da transesterificação para produção de biodiesel (MAG, DAG, TAG e AGL) não prejudicam a posterior utilização dessa GL na produção de MAG e DAG por lipases. O pH ácido da GL e resíduo de sabões decorrentes da neutralização desta é que desnaturam a lipase e impossibilitam a produção de MAG e DAG por glicerólise enzimática. Desse modo, se a reação de transesterificação para produção de biodiesel fosse realizada enzimaticamente utilizando-se lipases como catalisadores, a GL bruta obtida não necessitaria passar por processos de purificação e neutralização, podendo ser diretamente utilizada como reagente da reação de glicerólise enzimática, juntamente com TAG de diversas fontes (vegetal ou animal).

A produção de biodiesel via rota enzimática livre de solventes é possível e vários trabalhos relatam alta conversão de TAG em ésteres etílicos/metílicos (OLIVEIRA et al, 2004; WANG et al, 2006; ALVES et al, 2010; LLOYD et al, 2006). Porém, a utilização de lipases para esta finalidade ainda está em fase de estudo, pois a desvantagem do custo dos biocatalisadores é grande frente aos catalisadores NaOH e KOH facilmente encontrados e

muito mais acessíveis economicamente. No entanto, a iniciativa de utilizar a GL bruta oriunda das reações enzimáticas de transesterificação de TAG para produção de biodiesel diretamente em outros processos, como exemplo deste presente estudo sobre produção de MAG e DAG, já vem como alternativa que viabilizaria a produção ambientalmente segura de biodiesel através de rotas enzimáticas.

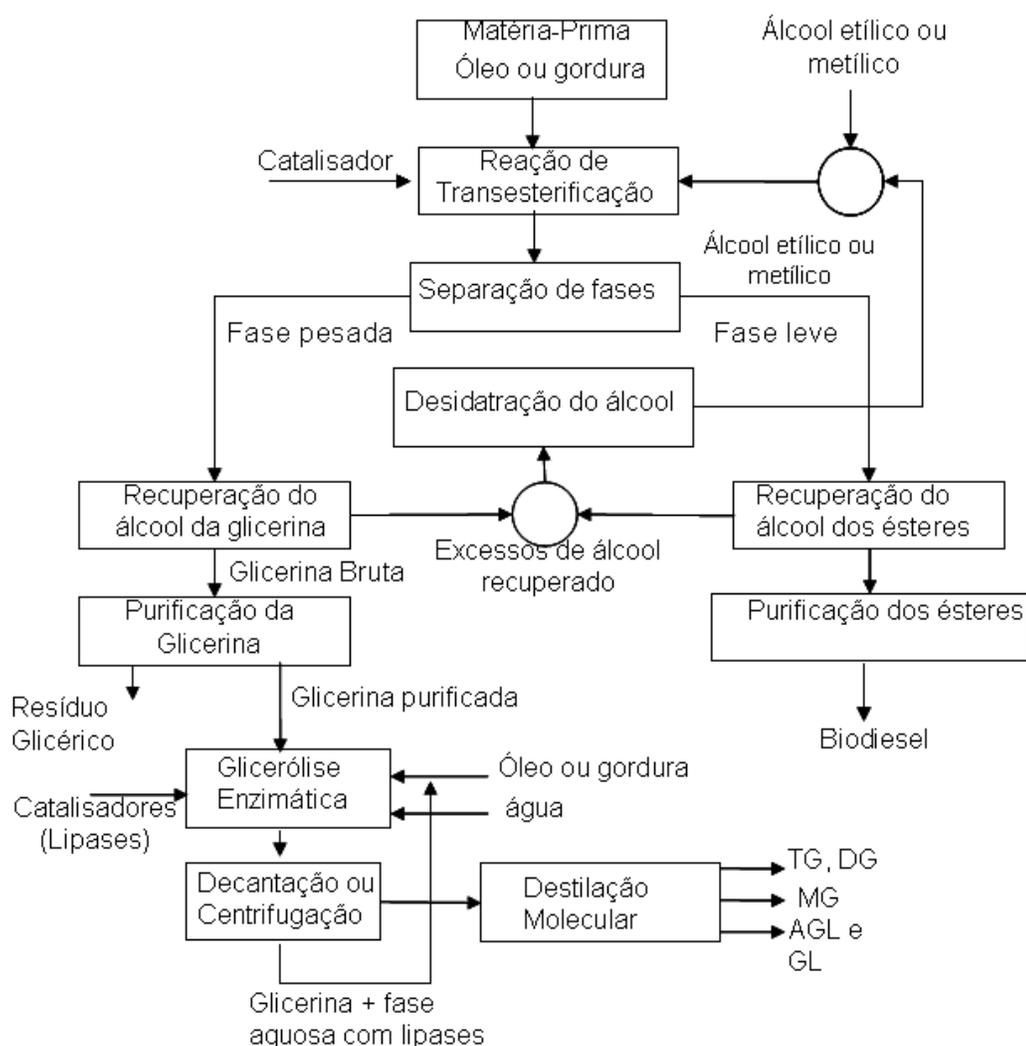


Figura 32 – Esquema para um processo integrado: produção de biodiesel e obtenção de emulsificantes (MAG e DAG).

4.3 ESTUDO COM LIPASES - SISTEMA UTILIZANDO SOLVENTES ORGÂNICOS

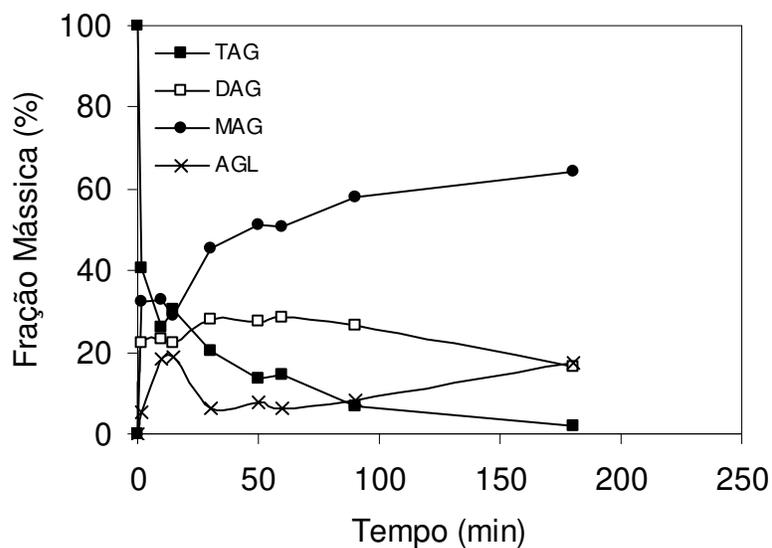
A utilização de solventes em reações de glicerólise enzimática é eficiente e traz muitas vantagens em relação ao sistema livre de solventes, porém, pode ocorrer contaminação dos produtos com o solvente utilizado e fazendo-se necessário uma etapa de separação do solvente da mistura reacional final.

Utilizando-se solventes, o meio reacional permanece completamente homogêneo do início ao final da reação, aumentando a miscibilidade das fases hidrofílicas (glicerol) e lipofílicas (óleo) propiciando assim uma maior conversão de produtos. A adição de solventes diminui o tempo de reação comparado com o sistema livre de solventes, pois a transferência de massa do glicerol é facilitada. Dessa forma, a reação se dá de forma rápida, como ilustra a Figura 33.

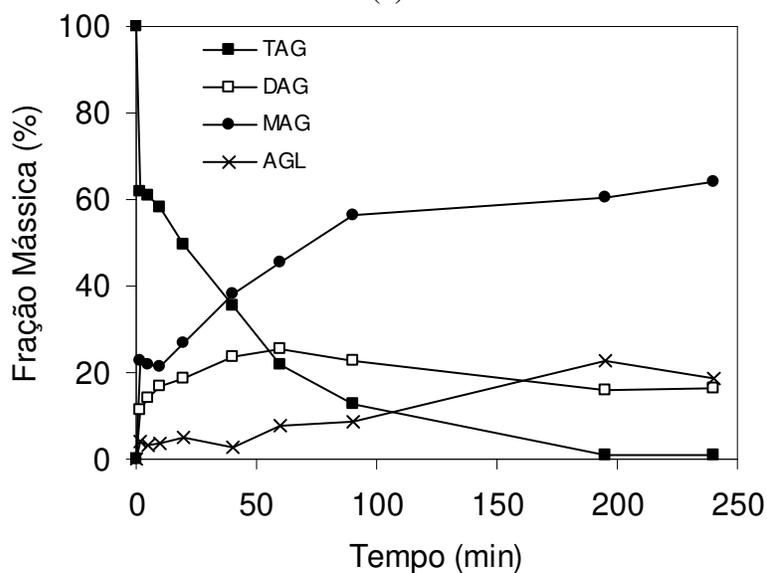
Foram testados os seguintes solventes nas reações de glicerólise enzimática: Hexano, Acetona, Hexano/Acetona (50:50) e álcool *terc*-Butanol. Dentre esses solventes, apenas o álcool *terc*-Butanol apresentou resultados satisfatórios. Dentre as lipases testadas estão a CA-IM, TL-IM, TL-L, RM-IM e AN-L. Das lipases empregadas, apenas CA-IM e TL-L apresentaram resultados satisfatórios, de acordo com os resultados a seguir.

A Figura 33 (a) apresenta a produção de MAG de 64% num período de 180 minutos (3 horas), enquanto que a Figura (b), com uma relação álcool/óleo de 1,5 indica a mesma produção de MAG num período de 240 minutos (4 horas). Ao contrário do observado para um sistema livre de solventes, quando utilizado o álcool *terc*-butanol no meio reacional o rendimento de MAG é maior que DAG. Observa-se neste caso que a produção de DAG

aumenta até certo momento e decai, indicando consumo de AGL das moléculas de DAG, fato não observado numa reação livre de solvente quando utilizado a mesma enzima TL-L.



(a)



(b)

Figura 33 – Reação de glicerólise enzimática utilizando sistema com solvente (álcool terciário) Razão Molar: a) *tert*-Butanol / Óleo = 2,2 e b) *Terc*-Butanol / Óleo = 1,5). G/O = 4; 10% de lipase em relação ao óleo, T = 40°C.

Nem todas as enzimas apresentaram alta solubilidade e/ou afinidade com o meio polar, propiciado pelo álcool *terc*-butanol. As lipases TL-IM, RM-IM e AN-L não apresentaram resultados para este caso.

A lipase de CA-IM apresentou resultados satisfatórios quanto à produção de MAG e DAG quando utilizado *terc*-butanol como solvente no meio reacional. De acordo com a literatura, nem todas as lipases respondem da mesma maneira a todos os solventes orgânicos (BON et al., 2008). No Capítulo 4, item 2.1.1, é apresentado que a estrutura da lipase se altera quando em contato com um solvente orgânico. O *lid*, ou a tampa que dá acesso ao sítio ativo da lipase sofre alteração na conformação, podendo ou permanecer totalmente aberto, aumentando o poder catalítico da lipase, ou permanecer fechado, bloqueando o acesso ao sítio ativo, dependendo do tipo do meio reacional a que a lipase é exposta.

A lipase de CA-IM apresentou resultados satisfatórios quanto à produção de MAG e DAG quando utilizado *terc*-butanol como solvente no meio reacional. As condições da reação foram: razão molar *terc*-butanol/óleo = 2, razão molar glicerol/óleo = 4, 2% de lipase em relação ao óleo de soja, 3,5% de água em relação à massa de glicerol, temperatura de 70°C. Ao final de 3 horas de reação, foram obtidos 5,52% de TAG, 14,25% de DAG, 39,42% de MAG e 28,23% de AGL, com erro experimental de $\pm 1,29$. A fração mássica para a produção de MAG foi bastante elevada, porém a porcentagem da produção de AGL foi bastante alta. Sabe-se que, a separação desses dois componentes, mesmo por destilação molecular, é dificultada devido às massas molares serem muito próximas. Neste caso, o estudo necessita de mais variáveis de processo para minimizar a produção de AGL com a lipase de CA-IM.

4.4 REUSO DE LIPASES EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTES

O emprego de enzimas como biocatalisadores é cada vez mais presente em processos industriais, porém, não de forma mais expressiva devido ao alto custo da produção das enzimas. O custo do biocatalisador é hoje o fator limitante que restringe a utilização dos sistemas enzimáticos em processos em larga escala.

Para contornar esse fato e tornar o uso de lipases mais atrativo, há hoje no mercado várias opções de lipases imobilizadas em diversos substratos (sílica-gel, fibras, partículas de cerâmica, microesferas de PVA), fazendo com que as lipases possam ser reutilizadas no processo sem diminuir a atividade hidrolítica, a estabilidade e a seletividade das mesmas.

Em plantas industriais, a reutilização das enzimas é fundamental para diminuição de custos do processo enzimático. No entanto, a reutilização desses biocatalisadores em uma determinada reação implica em processos adicionais de separação no processo e preparação das enzimas a fim de estarem hábeis para nova utilização. Esses processos adicionais na planta industrial envolvem encarecimento do produto final.

CRUZ (2007) em sua tese estudou a síntese de MAG acetilados por glicerólise enzimática utilizando diversas lipases imobilizadas e livres, entre elas lipase *Thermomices lanuginosus* livre e imobilizada e *Rhizomucor miehei* imobilizada. A reutilização de lipases foi realizada por 4 ciclos, apenas com as lipases imobilizadas, sendo que estas eram retiradas do meio reacional e filtradas a vácuo e só então re-adicionadas na reação para outro ciclo de produção de MAG.

No entanto, observando a produção de emulsificantes MAG e DAG, foi verificado que processos extras de separação e preparação das lipases, para então serem recolocadas em diferentes ciclos de reação enzimática, poderiam ser evitados.

Neste caso particular da glicerólise enzimática para produção de MAG e DAG, a lipase é adicionada ao meio contendo GL e TAG, com adição de água (caso a lipase seja imobilizada, como já discutido em item anterior). As fases GL e TAG não são miscíveis e após cada etapa de 24 horas de reação, mesmo após o TAG converter-se parcialmente em DAG, MAG e AGL, a fase lipofílica contendo os acilgliceróis e a fase hidrofílica, glicerol e lipases, separam-se imediatamente de forma espontânea (Figuras 34 e 35). Visto isso, o seguinte experimento visando verificar o reuso das lipases no sistema de glicerólise enzimática, em sistemas livres de solventes, foi efetuado, conforme descrito no item 4.2, e os resultados obtidos serão discutidos nos itens seguintes.



Figura 34 – Início da Separação de fases após 24 horas com lipase imobilizada de CA-IM (I), Separação de fases completa após 24 horas (II): (A) acilgliceróis, (B) lipases, (C) glicerina e água.



(I)

Figura 35 - Início da Separação de fases após 24 horas com lipase livre de TL-L (I), Separação de fases completa após 24 horas (II): (A) acilgliceróis, (B) lipases dispersas na fase glicerina e água.

4.4.1 REUSO DE LIPASE IMOBILIZADA

A lipase imobilizada de CA-IM foi utilizada em nove ciclos de glicerólise enzimática durante a produção de MAG e DAG. Após 24 horas de cada ciclo, o reuso da lipase, sua estabilidade frente à exposição prolongada nos diversos ciclos de reação e as composições de cada componente TAG, DAG, MAG e AGL produzidos nos ciclos de reação com a lipase CA-IM são mostradas na Figura 36. A lipase imobilizada pôde ser utilizada durante 9 ciclos sem perdas na estabilidade, uma vez que não houve decréscimo nas produções de DAG e MAG com o tempo de uso do biocatalisador. Nessas condições, a conversão de TAG alcançou 82% e foi mantida constante durante todos os ciclos de 24 horas. Isto demonstrou a boa estabilidade da lipase, uma vez que esta apresenta afinidade

com o glicerol, geralmente utilizado como estabilizante para enzimas. Após o terceiro ciclos os rendimentos de DAG e MAG foram mantidos praticamente constantes em torno de 53% e 24%, respectivamente.

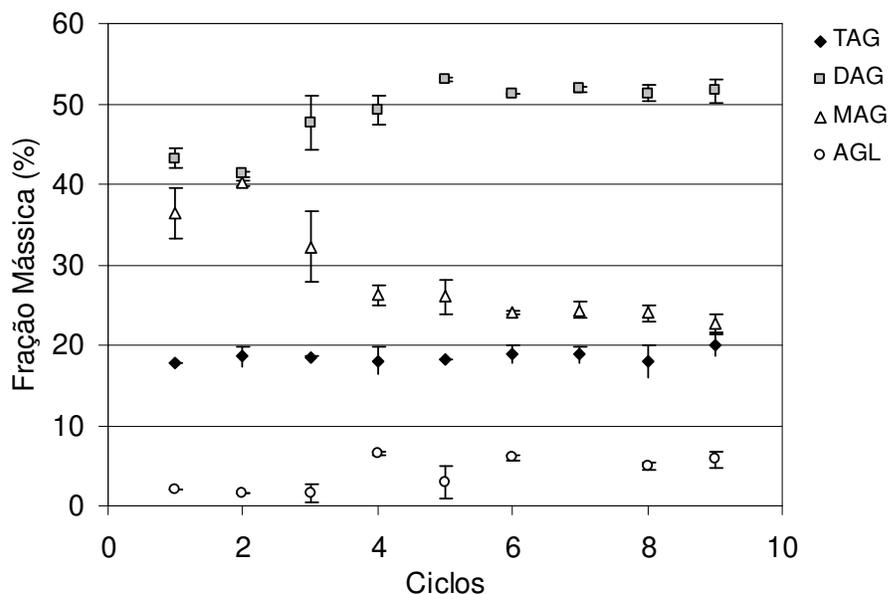


Figura 36 - Composição de acilgliceróis após 24 horas de cada ciclo de reação utilizando lipase de CA-IM.

A fim de verificar o consumo de GL no decorrer dos ciclos, é importante mencionar que a quantidade de glicerol não foi repostada durante cada nova etapa de reação, ao iniciarse um novo ciclo. Dada a estequiometria da reação, Glicerol:TAG de 2:1 de acordo com a Figura 37, o excesso inicial de GL adicionado na reação, numa razão molar GL:TAG de 8:1 foi propositalmente estipulado. Assim sendo, o consumo de GL foi o agente limitante para concluir os ciclos de reação. Durante nove ciclos foi possível verificar fases distintas que garantiram a quantidade mínima de GL que a estequiometria da reação necessitava para produzir MAG e DAG sem perdas nos rendimentos.

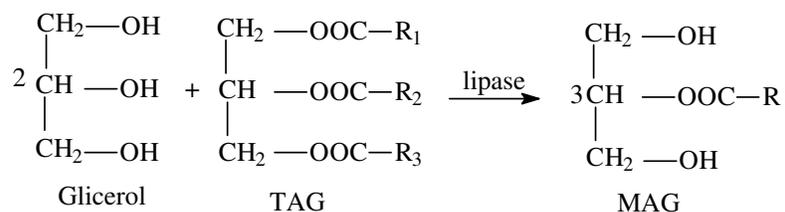


Figura 37 – Reação global da glicerólise. R1, R2 e R3 são cadeias carbônicas de ácidos graxos.

Durante os ciclos de reação com a quantidade inicial de lipase e de glicerol, a razão molar entre GL e TAG alterou-se por dois motivos: devido ao consumo e pela não reposição de glicerol. O monitoramento da razão molar entre glicerol e TAG é apresentado na Figura 38. Observando a Figura, nota-se que no nono ciclo a razão molar é de 2,4, ainda suficiente para conduzir a reação sem decréscimo na produção de MAG e DAG.

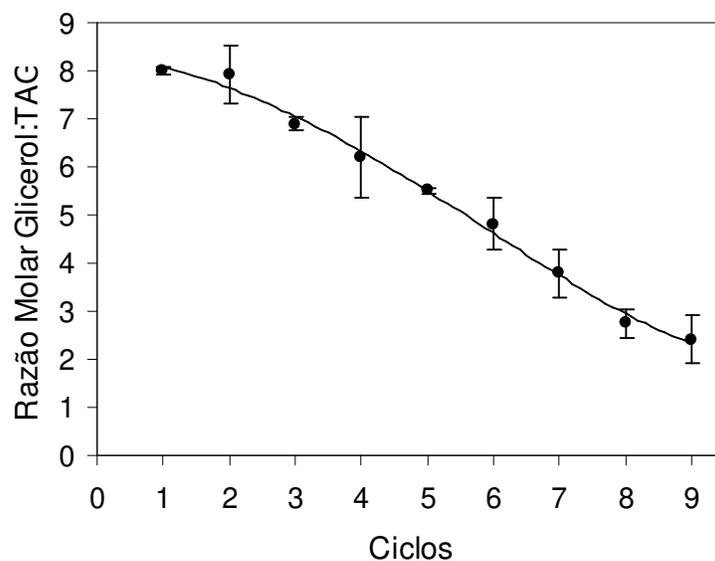


Figura 38 – Acompanhamento da Razão Molar Glicerol:TAC em cada ciclo de glicerólise enzimática.

4.4.2 REUSO DE LIPASE LIVRE

Do mesmo modo que a lipase imobilizada, a lipase livre de TL-L foi utilizada em 8 ciclos seguidos de reação, onde apenas TAG era realimentado no sistema após a retirada dos acilgliceróis produzidos a cada ciclo, como apresentado na Figura 39. É importante reafirmar que a carga de GL e lipases foi mantida sempre constante, ou seja, a mesma desde o 1º Ciclo até o 8º Ciclo.

Como pode ser observado, o reuso de lipase livre foi possível, no entanto, TL-L não apresentou a mesma estabilidade que a lipase CA-IM. O fato de CA-IM ser imobilizada manteve sua estabilidade e atividade durante o tempo prolongado de utilização e à temperatura constante de 70 °C.

Após 24 horas de cada ciclo, as composições de cada componente TAG, DAG, MAG e AGL produzidos nos ciclos de reação com a lipase TL-L são mostradas na Figura 39. O gráfico ilustra um decréscimo gradual na produção de MAG, de 20 para 10%. Já a produção de DAG manteve-se constante entre 40 e 43% nos cinco primeiros ciclos, apresentando uma queda na produção a partir do sexto ciclo, chegando a 30% de DAG no oitavo ciclo. Independente da não estabilidade da lipase livre nos ciclos de reação, a produção de MAG e DAG a partir da lipase livre reutilizada apresentou um desempenho excelente.

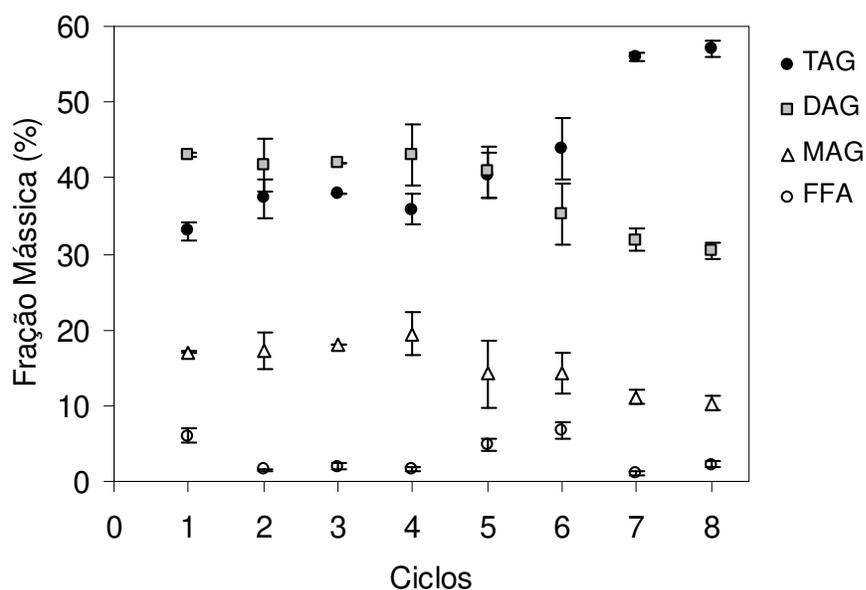


Figura 39 – Composição de acilgliceróis após 24 horas de cada ciclo de reação utilizando lipase de TL-L.

A Figura 39 apresenta a razão molar entre glicerol e TAG em cada ciclo para reações utilizando a lipase livre. Este comportamento demonstra que para a reação com a lipase livre o consumo de glicerol foi menos acentuado que a para reações com a lipase imobilizada. Este fato está em concordância com o fato de que a conversão com a lipase livre é menor. Neste caso, o oitavo ciclo apresentou uma razão molar de 4,1, em contraste com o caso anterior que apresentou 2,4 no nono ciclo.

No caso da reação com lipase livre, devido à menor conversão e menor consumo de glicerol, esta deveria ter mantido mais ciclos em vigor do que a reação com lipase imobilizada, uma vez que ainda havia glicerol a ser consumido. No entanto, apenas foi observado separação de fases durante oito ciclos. Provavelmente, após este período,

ocorreu emulsificação entre as fases glicerol – água – lipases – lipídios, impossibilitando a separação dessas. Este fato ainda deve ser mais profundamente estudado.

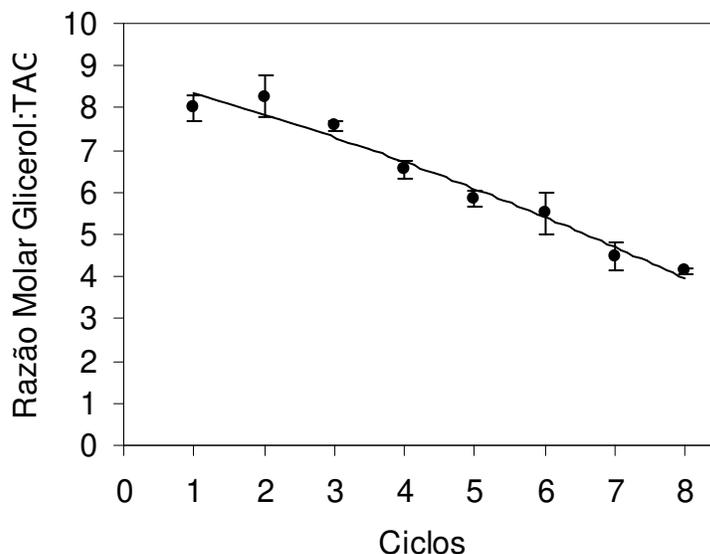


Figura 40 – Acompanhamento da Razão Molar Glicerol:TAC em cada ciclo de glicerólise enzimática para reações com lipase livre TL-L.

A Figura 40 mostra que, nas condições de reação estudadas, a conversão de TAG para as reações com a lipase livre alcançou 72% no tempo de 24 horas do primeiro ciclo e apresentou um acentuado decréscimo até 43% de conversão no oitavo ciclo. Em contraste, a conversão de TAG para a reação a lipase imobilizada de CA-IM alcançou cerca de 82% de conversão durante todos os ciclos, totalizando 192 horas de uso contínuo sem perdas da estabilidade da lipase.

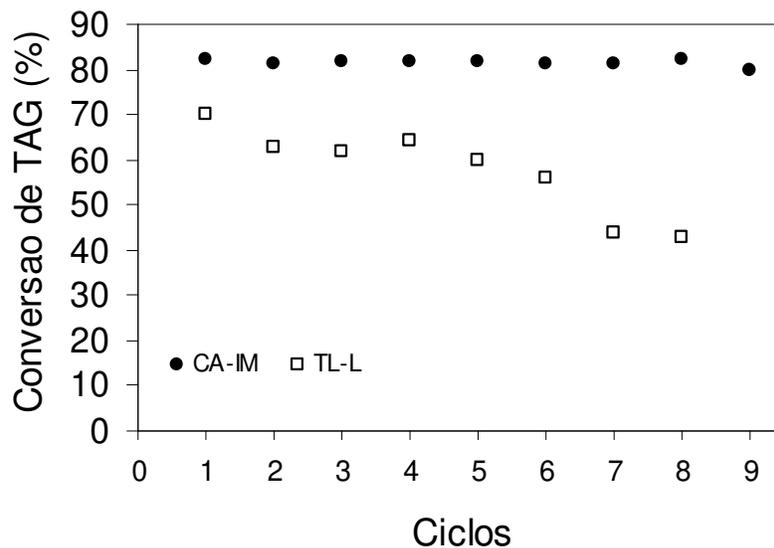


Figura 41 – Conversão de TAG em cada ciclo empregando os diferentes biocatalisadores estudados.

4.5 DESTILAÇÃO MOLECULAR

4.5.1 EXPERIMENTOS EXPLORATÓRIOS DE DESTILAÇÃO MOLECULAR

Nesta etapa, foram realizados os ensaios de separação de acilgliceróis obtidos das reações de glicerólise enzimática por destilação molecular (DM) com o objetivo de, inicialmente, determinar os parâmetros de processo. Este método de separação não se trata de uma destilação propriamente dita, pois nesta técnica, a separação dos compostos ocorre pela diferença de suas massas molares e pressões de vapor, e não através de equilíbrio entre fases. Resumindo, primeiramente, são destilados os componentes que apresentam menor massa molar, pois requerem baixas temperaturas para esta separação. Como exemplo, a

glicerina (92 g/mol) pode ser obtida em uma faixa de temperatura de 80 – 100°C, com uma pressão de destilação de 0,1 torr. Compostos que possuem maiores massas molares são obtidos na corrente de destilado a temperaturas mais elevadas, enquanto que, dependendo das condições de operação (T e P), compostos demasiadamente pesados são retirados na corrente de resíduo. Por exemplo, dependendo das condições de pressão na destilação molecular (alto vácuo), DAG e TAG não são obtidos na corrente de destilado, pois requerem temperaturas de destilação (temperatura de evaporação, TE) mais elevadas, o que ocasionaria degradação do óleo e perda de suas propriedades.

As frações mássicas dos componentes (%) da reação enzimática, considerados matérias-primas para esta etapa de destilação molecular, são apresentadas a seguir na Tabela 8.

Tabela 8 – Fração Mássica (%) dos componentes resultantes da reação de glicerólise enzimática.

TAG	DAG	MAG	AGL	GL
15,82	40,04	17,16	25,80	1,17

Glicerólise do óleo de soja, sistema livre de solventes. Condições: T = 40°C, razão molar do substrato Glicerol/Óleo = 4, 10% de enzima (% em relação à massa de óleo), 3,5% de água (% em relação à massa de glicerol), 24 horas de reação.

Devido à utilização de 10 % da lipase solúvel TL-L, verifica-se na Tabela 8 que a concentração na mistura de AGL é muito elevada. Ainda, a separação desses AGL dos MAG é tarefa difícil sem que haja perda de MAG, uma vez que a faixa de variação dos valores de massas molares para esses dois componentes são muito próximas, em média cerca de 280 g/mol para AGL e 330 g/mol para MAG. A massa molar de cada composto

(MAG, DAG e TAG) depende das massas molares dos ácidos graxos característicos do óleo de origem. No caso do óleo de soja, as percentagens dos ácidos graxos característicos estão apresentadas na Tabela 6.

A partir da mistura apresentada pela Tabela 8, foi realizada uma pré-destilação para retirada de GL e parte dos AGL. Para se operar o destilador molecular com o tipo de óleo escolhido, as linhas de entrada e saídas (destilado e resíduo) devem estar aquecidas para evitar bloqueio da tubulação devido à adesão de MAG. As condições utilizadas para a pré-destilação foram:

Temperatura do evaporador (TE) = 200° C; temperatura do condensador (TC) = 60° C; temperaturas das linhas de entrada e saída (TLE e TLS) = 60° C; rotação da placa de evaporação = 1450 rpm; pressão (P) = 0,1 torr; vazão = 6,0 mL/min.

Nestas condições, as frações mássicas do material destilado e do material recolhido na saída de resíduo na pré-destilação são verificadas na Tabela 9. Nessas condições, a GL foi praticamente toda reduzida do material obtido na corrente de resíduo, juntamente com parte dos MAG e AGL.

O material recolhido na linha de resíduo desta primeira etapa foi novamente alimentado no destilador e a TE foi elevada para 250°C. As frações mássicas dos componentes obtidos nesta etapa de destilação são descritas na Tabela 10.

Tabela 9 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na pré-destilação a 200° C.

	TAG	DAG	MAG	AGL	GL
Destilado (D)	0	0	20,32	72,53	7,15
Resíduo (R)	18,03	43,69	17,40	20,36	0,25

TE = 200°C; TC = 60°C; TLE e TLS = 60°C; P=0,1 torr; rot= 1450 rpm.

Tabela 10 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na destilação a 250° C.

	TAG	DAG	MAG	AGL	GL
Destilado (D)	1,20	13,32	30,74	52,55	2,19
Resíduo (R)	21,15	49,70	14,25	14,87	0,03

TE = 250°C; TC = 60°C; TLE e TLS = 60°C; P=0,1 torr; rot= 1450 rpm.

Nota-se que a 250°C, moléculas de TAG e DAG são detectadas na corrente de destilado. Nessa temperatura elevada de evaporação, TAG e DAG de massas molares mais baixas tem a chance de evaporar. Isso ocorre devido às diferenças de massa molar das diferentes estruturas de ácidos graxos que compõem o óleo de soja. Exemplificando, TAG e/ou DAG de ácidos graxos de baixa massa molar (ex. ácido palmítico com 16 carbonos) em temperaturas elevadas de destilação (230 – 250 °C) e baixa pressão (0,1 torr) podem evaporar e serem recolhidos na corrente de destilado.

As vazões mássicas e volumétricas de entrada e saída nas destilações a 200 e a 250° C bem como as massas específicas (μ) calculadas a partir das vazões medidas são apresentadas na Tabela 11. Os valores para μ observados na Tabela 11 equivalem às massas específicas (μ) calculadas da mistura de componentes nas correntes de entrada ou saída. A partir de dados da literatura tem-se que μ (óleo de soja) = 0,85 g/cm³ e que μ (glicerina) = 1,26 g/cm³. Esses dados da literatura concordam com os valores calculados de μ ; por exemplo, maiores μ para corrente de destilado indicam maiores concentrações de GL na amostra recolhida.

A Tabela 12 apresenta valores de vazão dos componentes em g/min, levando-se em consideração as vazões mássicas apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Vazões mássicas (g/mL) e volumétricas (mL/min) e massas específicas (g/cm³) do material presente nas correntes de entrada, destilado e resíduo.

		Entrada	Destilado	Resíduo
Destilação 200°C	Vazão (mL/min)	7,00	0,80	6,20
	Vazão (g/mL)	5,83	0,83	5,00
	ρ (g/cm ³)	0,83	1,04	0,81
Destilação 250°C	Vazão (mL/min)	7,00	1,20	5,80
	Vazão (g/mL)	6,21	1,17	5,04
	ρ (g/cm ³)	0,89	0,98	0,87

Tabela 12 – Vazões mássicas (g/min) dos componentes para cada corrente de entrada e saídas, após as duas etapas de destilação.

		TAG	DAG	MAG	AGL	GL
Destilação 200°C	Entrada	0,92	2,33	1,00	1,50	0,07
	Destilado	0,00	0,00	0,17	0,52	0,06
	Resíduo	0,90	2,18	0,87	1,03	0,01
Destilação 250°C	Entrada	1,12	2,71	1,08	1,28	0,02
	Destilado	0,01	0,16	0,36	0,61	0,03
	Resíduo	1,07	2,50	0,72	0,75	0,00

A razão de massa de material destilado (D) e massa de material alimentado (F) pode ser determinada pela equação 1. A partir dos dados experimentais da Tabela 12, verificou-se que a 200°C de TE foi obtida uma porcentagem de destilado (100D/F) de 13,0 % e a 250° C uma 100D/F de 18,8%.

$$100 \frac{D}{F} = 100 \times \frac{\text{MassaDestilado}}{\text{MassaTotal}} \quad (1)$$

Na primeira destilação a 200 °C, nota-se que DAG não foram destilados e permaneceram na corrente de resíduo, juntamente com MAG, AGL e GL que não destilaram completamente. O cálculo de recuperação de um determinado componente é determinado pela seguinte equação 2:

$$\%R_N = 100 \times \frac{\text{Destilado}_N}{\text{Alimentado}_N} \quad (2)$$

sendo N o componente escolhido e R a porcentagem de recuperação de N .

A partir dos dados da Tabela 12, foi verificada uma recuperação de 16,24% de MAG a 200°C e 36,95 % de MAG a 250°C. Entretanto, a 200°C houve uma recuperação de 33,52% de AGL e a 250°C de 48,97%.

Uma alternativa para diminuir consideravelmente a concentração de AGL na amostra inicial a fim de se obter essencialmente MAG na corrente de destilado, seria realizar várias destilações consecutivas a 170 – 180°C, ou seja, destilações em condições onde haveria menor perda de MAG junto com AGL e maior proporção de retirada de AGL e GL do restante dos componentes.

4.5.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DESTILAÇÃO MOLECULAR

Após os primeiros ensaios de destilação molecular realizados na etapa anterior, foi possível melhorar tanto as condições das reações enzimáticas, a fim de diminuir a quantidade de ácidos graxos presentes na mistura reacional (alimentação do destilador), quanto os procedimentos para dar condições de destilar preferencialmente MAG na

destilação molecular. Para essa etapa de destilação molecular foi empregada uma estratégia em formato “cascata”, a fim de realizar destilações consecutivas sempre realimentando o destilador com o material obtido na corrente de resíduo. Desde modo, a máxima recuperação de MAG na corrente de destilado pode ser alcançada, diminuindo gradativamente a concentração deste composto na corrente de resíduo.

Antes de realizar a separação no destilador molecular, os componentes acilgliceróis resultantes da reação enzimática foram devidamente separados da fase hidrofílica. Após esta primeira separação, as frações mássicas dos componentes (%) da reação enzimática consideradas matérias-primas para a destilação molecular são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Fração Mássica (%) dos componentes resultantes da reação de glicerólise enzimática utilizando lipase CA-IM.

TAG	DAG	MAG	AGL	GL
25,06	46,63	21,72	5,38	1,21

Glicerólise do óleo de soja, sistema livre de solventes. Condições: T = 70°C, razão molar do substrato Glicerol/Óleo = 8, 2% de enzima CA-IM (% em relação à massa de óleo), 3,5% de água (% em relação à massa de glicerol), 24 horas de reação.

Primeiramente, nota-se que, em virtude da utilização de apenas 2% de lipase CA-IM, a concentração de ácidos graxos foi reduzida para 5,38%, diferentemente da composição de 25,80 % de AGL observada no item anterior (ver Item 4.2.1).

A partir da mistura apresentada pela Tabela 13, foi realizada pré-destilação a 100 e 150 °C para retirada de GL e parte dos AGL. As condições utilizadas para a pré-destilação foram:

Alimentação (A) = 470g; Temperatura do evaporador (TE) = 100/150° C; temperatura do condensador (TC) = 60° C; temperaturas das linhas de entrada e saída (TLE e TLS) = 60° C; vazão entrada (Ve) = 7,5 mL/min; rotação da placa de evaporação = 1450 rpm; pressão (P) = 0,28 torr.

Nestas condições, as frações mássicas do material destilado (D) e do material recolhido na saída de resíduo (R) na pré-destilação são verificadas na Tabela 14. O material recolhido na linha de resíduo a 100 °C foi novamente alimentado no destilador e a TE foi elevada para 150°C. As frações mássicas dos componentes obtidos nesta etapa de destilação são descritas na Tabela 14.

Tabela 14 – Frações mássicas (%) dos componentes obtidos na pré-destilação a 100° C.

Temperatura (°C)	Linhas	TAG	DAG	MAG	AGL	GL
100	Alimentação (F)	25,06	46,63	21,72	5,38	1,21
	Destilado (D)	4,18	3,23	10,87	5,30	76,41
	Resíduo (R)	25,24	48,11	21,62	4,52	0,52
150	Alimentação (F) ^a	25,24	48,11	21,62	4,52	0,52
	Resíduo (R)	25,83	48,00	21,93	4,25	0,00

TE = 100/150°C; TC = 60°C; TLE e TLS = 60°C; P=0,28 torr; rot= 1450 rpm.

VD = 0,0 mL/min; VR = 7,5 mL/min = 7,36 g/min ^a não foi obtido material na corrente de destilado.

Após as etapas de pré-destilação a 100 e 150°C para eliminar e/ou diminuir as concentrações de GL e AGL na corrente de resíduo, a TE foi aumentada de 190°C até 250 °C (Figura 42). Durante todo o experimento, as vazões de alimentação, de destilado e

resíduo foram determinadas. As vazões (Q), mássicas e volumétricas a diferentes TE são apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Vazões (mássicas e volumétricas) do material presente nas correntes de entrada, destilado e resíduo.

T (°C)	Entrada		Destilado ^a		Resíduo	
	Vazão (g/min)	Vazão (mL/min)	Vazão (g/min)	Vazão (mL/min)	Vazão (g/min)	Vazão (mL/min)
100	7,36	7,50	-	-	7,36	7,50
150	5,78	6,50	-	-	5,78	6,40
190	5,54	6,20	0,41	0,40	5,13	5,80
190	9,46	10,30	0,45	0,50	9,01	9,80
230	9,68	10,60	0,83	1,00	8,85	9,60
230	6,73	7,40	0,96	1,20	5,77	6,20
250	5,85	7,00	0,93	1,40	4,92	5,60
250	9,63	11,00	0,93	1,40	8,70	9,60

^a não foi recolhido material suficiente nas correntes de destilado a 100 e 150°C para o calculo das vazões de saída de destilado.

Os experimentos utilizando-se TE igual a 100 e 150°C tiveram o objetivo de retirar ao máximo os AGL e o GL presentes na mistura. Observa-se que durante esses experimentos, a P manteve-se em 0,28 torr quando TE = 100°C e a 0,22 torr quando TE = 150°C. Isto significou que, preferencialmente, as moléculas leves estavam evaporando e afetando a pressão interna da câmara de destilação.

Foram realizadas destilações variando a vazão de entrada entre 6,0 e 10,0 mL/min, a fim de observar a influência da vazão de alimentação no evaporador, além da influência da TE nas frações destiladas (Figura 42).

Observa-se que quando se aumenta a TE, aumenta a transferência de calor do evaporador com o fluido e moléculas com massas molares mais elevadas podem ser evaporadas. Ainda, um aumento no fluxo de entrada (Q) de 6 para 10 mL/min, no caso de TE de 190 °C, provocou um aumento de 31,9 % de MAG na corrente de destilado. Da mesma forma, o aumento de Q nas temperaturas de 230 e 250 °C provocaram um aumento de 16,8 e 4,0 % de MAG destilado, respectivamente. O aumento na concentração de MAG na corrente de destilado à vazão maior de 10 ml/min se deve porque quando utilizada uma vazão de entrada relativamente baixa (no caso de 6 mL/min), pode ocorrer formação de caminhos preferenciais na superfície do evaporador, ao contrário de um filme homogêneo, negligenciando assim a transferência de calor da superfície do evaporador para o fluido. Com o aumento de Q para 10 mL/min, o fluido espalha-se homogeneamente sobre a superfície do evaporador, proporcionando uma eficiente troca de calor do evaporador com o fluido a ser evaporado.

No entanto, nota-se que, conforme se dá o aumento de TE, a diferença entre a concentração de MAG destilada a 6 e a 10mL/min diminui. Isso ocorre porque a temperatura é alta o suficiente para que haja uma boa troca de calor, mesmo sem haver o completo recobrimento do fluido sobre a superfície do evaporador.

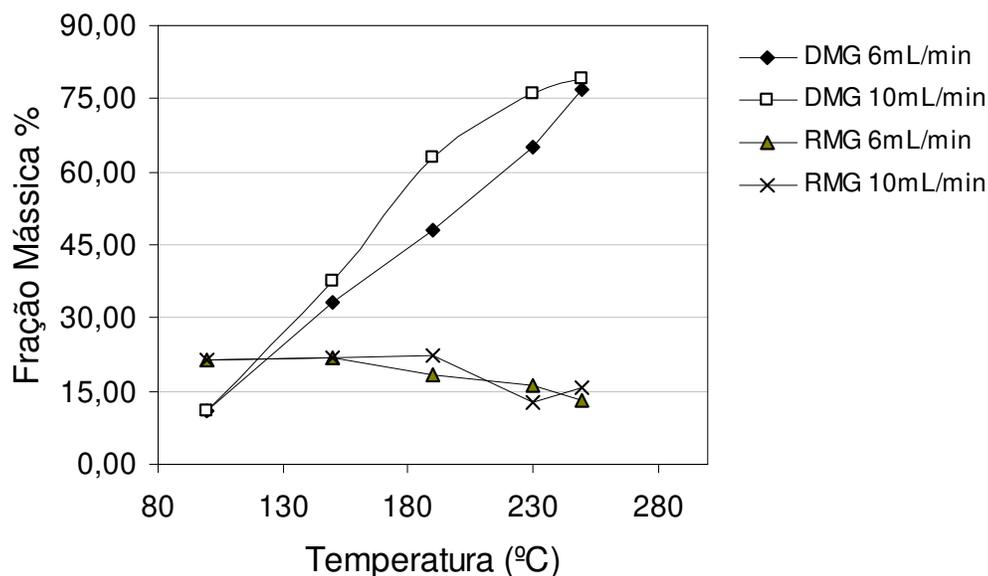


Figura 42 – Fração Mássica (%) para MAG nas correntes de destilado e resíduo em diferentes temperaturas e vazões de alimentação.

Através da Figura 42, pode-se observar que a maior concentração de 80% de DMG foi obtida com uma vazão de alimentação de 10,0 mL/min e TE = 250°C, partindo-se de uma alimentação que continha apenas 13,20% de MAG. A corrente de resíduo também contém concentrações de MAG residuais (RMG) não destilados nas condições experimentais.

A composição da corrente de alimentação é continuamente alterada a cada aumento de TE. Sendo assim, a recuperação de MAG em cada etapa de destilação é diferente. O cálculo de recuperação de um determinado componente é determinado pela equação 2 (item 4.5.1).

As recuperações de MAG, bem como as concentrações de DMG, a diferentes temperaturas e vazões de alimentação são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Recuperação de MAG a diferentes TE e vazões de alimentação.

Temperatura (°C)	Q (mL/min)	DMG (%)	Recuperação de MAG (%)
190	6,2	47,84	17
190	10,3	63,09	12
230	6,3	65,18	50
230	10,6	79,06	27
250	6,4	76,85	52
250	10,5	80,01	35

Nota-se que a recuperação de MAG é sempre maior quando Q é menor. Isto se deve ao tempo de residência das moléculas na superfície do evaporador: aumentando-se o período de contato das moléculas no evaporador, a possibilidade de todas as moléculas evaporarem, tanto as moléculas mais pesadas quanto as mais leves, é maior. Há nesse caso, maior recuperação dos componentes. No entanto, a concentração de DMG é diminuída quando Q é menor porque, sendo o filme mais fino, todas as moléculas que têm possibilidade de evaporarem naquelas condições são evaporadas devido ao maior tempo de exposição junto ao evaporador, diluindo a concentração de MAG na corrente de destilado. Em se tratando ainda da concentração mássica (%) de DMG, quando Q é aumentada, somente as moléculas mais leves, como exemplo, os MAG ou AGL, podem evaporar, sem haver tempo suficiente para outras moléculas que teriam possibilidade de evaporar, aumentando assim a concentração de MAG na corrente de destilado.

A razão de massa de material destilado (D) e massa de material alimentado (F) pode ser determinada pela equação 1. A Tabela 17 apresenta os valores de porcentagem de

destilado (100D/F) para as três últimas temperaturas de destilação estudadas. É observado que na TE de 190 °C, a porcentagem de destilado foi praticamente a mesma obtida para ambas as vazões empregadas. À medida que TE aumentou para 230 °C, houve diferenças na porcentagem de destilado para as diferentes vazões de alimentação. Na vazão de 6 mL/min 100D/F é maior que na vazão de 10 mL/min. O mesmo é verificado para a temperatura de 250 °C. Neste caso, cabe a discussão sobre recuperação de MAG ser maior também em vazões menores: a possibilidade da maioria das moléculas menores conseguirem evaporar devido a um tempo de residência maior no evaporador em função da menor vazão de alimentação no evaporador.

Tabela 17 – Porcentagem de destilado das amostras nas vazões de 6 e 10 mL/min e diferentes TE.

100D/F		
TE (°C)	Q = 6 mL/min	Q = 10 mL/min
190	10,29	12,45
230	36,46	32,58
250	32,57	27,12

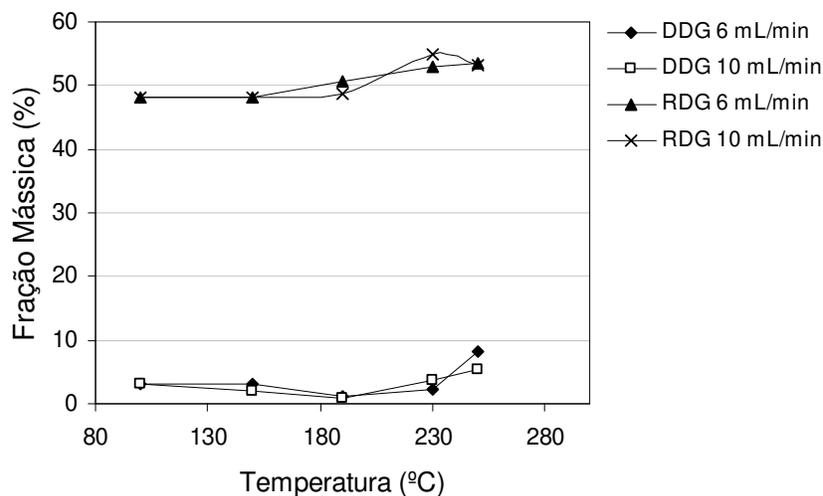


Figura 43 – Fração Mássica (%) para DAG nas correntes de destilado (DDG) e resíduo (RDG) em diferentes temperaturas e vazões de alimentação.

Em contrapartida, a Figura 43 apresenta as concentrações de DAG destilados e residuais, nas condições estudadas. A quantidade de DAG destilada é baixa, com um aumento discreto em temperaturas mais elevadas, de 230 a 250°C.

Deste modo, não se deve deixar de observar o material restante obtido a partir do último resíduo, essencialmente de DAG (TE = 250°C e Ve = 10 mL/min). De acordo com a Figura 44, grande parte de sua composição é decorrente do componente DAG: 29,83% de TAG; 53,20% de DAG; 15,64 de MAG e 1,33 % de AGL.

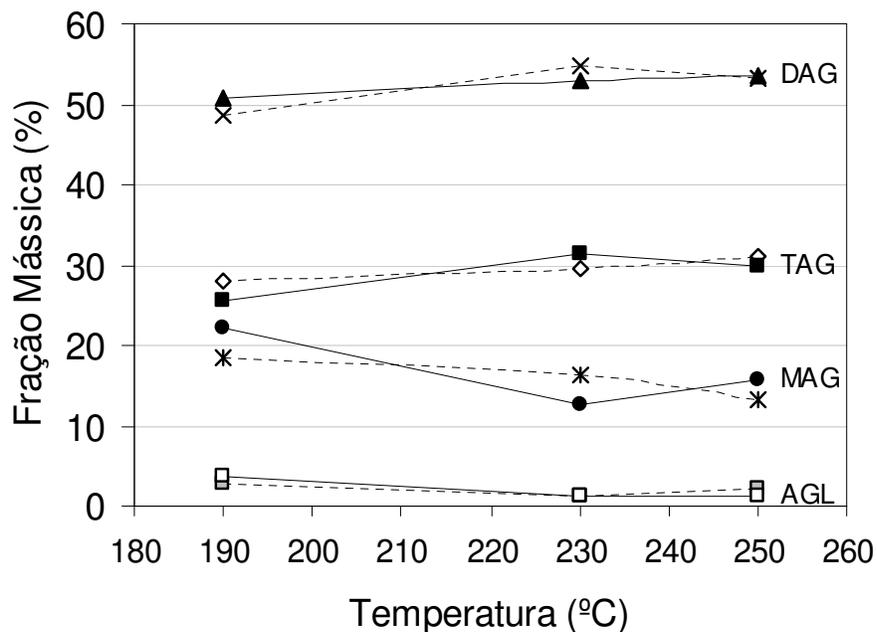


Figura 44 – Fração mássica (%) dos componentes na corrente de resíduo em função da temperatura. Vazão de alimentação de 6 mL/min (-----) e 10 mL/min (—).

De acordo com o objetivo da pesquisa, o material obtido na corrente de destilado, com 80% de MAG contém propriedades emulsificantes importantes e de qualidade para vários segmentos industriais, especialmente alimentícios e cosméticos. Para tanto, o MAG aqui obtido foi sintetizado primeiramente através de reações de glicerólise enzimática e posterior separação e concentração por destilação molecular, sempre visando a qualidade do material sintetizado e nos benefícios que este produto adicionará nas aplicações industriais posteriores.

Entretanto, após todo o procedimento da destilação molecular em “cascata”, foi obtido como resíduo um material rico em DAG com baixa acidez (Figura 44). Este subproduto torna-se produto importante para pesquisas que utilizam óleos de DAG, óleos

estes que podem ser empregados na indústria alimentícia com a finalidade de substituir os óleos de triacilgliceróis. A fim de ilustração, é apresentada uma comparação entre o óleo de soja comercial (Figura 45 (1)), a mistura de acilgliceróis oriunda da reação de glicerólise enzimática (2) e o óleo rico em DAG obtido da destilação molecular (3).

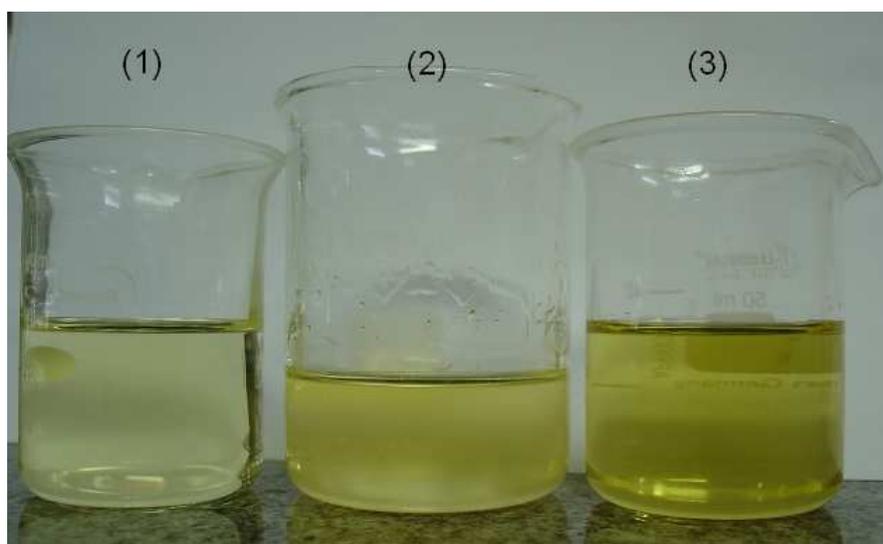


Figura 45 – Comparação de cores entre óleo de soja (1), mistura de acilgliceróis (2) e óleo de DAG (3).

Durante todo o processo de produção de MAG e DAG, desde a escolha de reações enzimáticas para síntese desses componentes, até a destilação molecular para separação com o objetivo de se obter emulsificantes importantes para vários segmentos, obtêm-se, não apenas um, mas dois produtos de igual importância industrial e acadêmica. Lembrando que durante a síntese enzimática de MAG e DAG são utilizados óleos vegetais e não gorduras hidrogenadas e baixas temperaturas de operação, estes produtos não contêm ácidos graxos com configuração *trans*, não possuem odor desagradável e a coloração é similar à do óleo vegetal inicial.

4.5.3 PRINCIPAIS DIFERENÇAS ENTRE DESTILADORES MOLECULARES - ESCALA LABORATORIAL E PILOTO

Para a etapa de purificação dos produtos da reação enzimática, foi utilizada toda a experiência e infra-estrutura do LDPS (Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação), pioneiro na área de destilação molecular no Brasil. Desta forma, além dos experimentos em escala laboratorial já apresentados (itens 4.5.1 e 4.5.2), foram feitos ensaios em maior escala, utilizando-se o protótipo nacional de destilador molecular centrífugo.

O destilador molecular escala piloto foi inicialmente adaptado para se adequar ao caráter peculiar da mistura de acilgliceróis a ser alimentada. A mistura glicérica oriunda das reações de glicerólise apresenta-se, em temperatura ambiente ou temperaturas abaixo de 40°C, num estado sólido/pastoso, não apresentando fluidez devido à presença dos componentes emulsificantes MAG e DAG. Devido às alterações realizadas, a alimentação foi diretamente direcionada para a câmara de vácuo do destilador, desativando parte do equipamento, como o degaseificador e uma bomba de alto vácuo. A linha de alimentação passou a ter uma extensão de apenas 0,5 m. Como na mistura de acilgliceróis não havia componente volátil que necessitasse ser retirado pelo degaseificador, a desativação deste foi satisfatória, uma vez que evitou que acilgliceróis ficassem acumulados na extensão das linhas, não ocorrendo perdas maiores de material. Desse modo, o esquema do destilador molecular escala piloto apresentou a mesma disposição operacional que o destilador molecular escala laboratorial. Um esquema do processo de destilação molecular é apresentado na Figura 46.

O destilador molecular importado de escala laboratorial foi operado nas seguintes condições de temperatura do evaporador: 100, 140, 190, 230 e 250 °C. No entanto, o projeto do destilador molecular centrífugo de escala piloto não possibilita aumentos de temperatura do evaporador acima de 200 °C, sob o risco de danificar o equipamento. Por este motivo, a temperatura limitante de uso foi de 200 °C, e não de 250 °C, como no caso anterior.

A espessura do filme formado na superfície do evaporador depende diretamente da rotação da placa do evaporador e da vazão de material alimentado no evaporador. Assim sendo, como foi fixada uma rotação baixa de 400 rpm, a vazão não poderia ser elevada, com o risco de formar uma camada de material espessa na superfície do evaporador. Neste caso, foram adotadas vazões de alimentação iguais a 17 e 27 mL/min.

Independentemente das principais diferenças entre os destiladores moleculares, o mesmo experimento de separação da mistura glicérica obtida da reação de glicerólise contendo TAG, DAG, MAG, AGL e GL foi realizado no destilador molecular centrífugo de escala piloto a fim de verificar o seu potencial de separação dos componentes e a viabilidade deste para o caso em questão. As diferenças mais representativas entre ambos os equipamentos são listadas na Tabela 18.

As demais condições de operação como temperatura do condensador (50 °C), temperaturas das linhas de alimentação e saídas de destilado e resíduo (60 °C) foram mantidas iguais para ambos os experimentos.

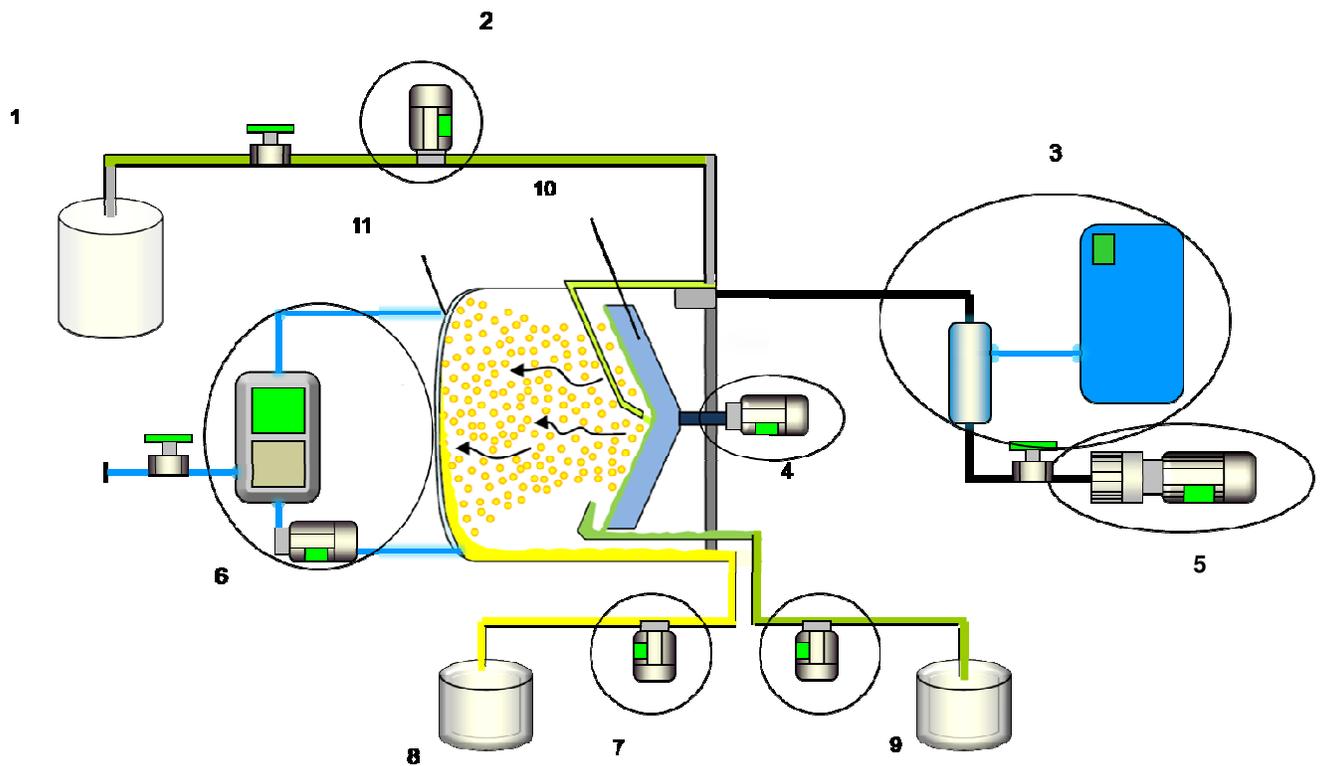


Figura 46 – Fluxograma da destilação molecular após alteração no projeto original. 1) Alimentação de Acilgliceróis TAG, DAG, MAG, AGL, GL; 2) Controle de vazão da alimentação; 3) Banho termostático a fim de evitar que materiais voláteis prejudiquem o vácuo do sistema; 4) Motor para controle de Rotação do evaporador; 5) Bomba de alto vácuo ($P = 200 \mu\text{bar} = 1,9 \times 10^{-4} \text{ atm}$); 6) Sistema de controle de temperatura do condensador; 7) Bombas de controle de vazão das linhas de saída; 8) Destilado; 9) Resíduo ou Concentrado; 10) Evaporador; 11) Condensador.

Tabela 18 – Diferenças operacionais entre os destiladores moleculares centrífugos de diferentes escalas.

	Destilador Molecular Escala Laboratorial	Destilador Molecular Escala Piloto
Rotação (RPM)	1450	400
Área de evaporação (m ²)	0,0046	0,1252
Pressão na câmara de evaporação (atm)	2,0 x 10 ⁻⁴	1,8 x 10 ⁻⁴
Temperaturas do Evaporador (°C)	100, 150, 190, 230 e 250	100, 140, 180, 200
Vazões de alimentação (mL/min)	6 e 10	17 e 27
Quantidade mínima de material alimentado (mL)	500	2000
Tempo total (estimado) de uma etapa de destilação (min)	45 – 30	80 – 50

4.5.4 EXPERIMENTOS REALIZADOS NO DESTILADOR MOLECULAR - ESCALA PILOTO

O material a ser fracionado pelo destilador molecular escala piloto foi obtido a partir de várias reações de glicerólise em reator de 2 L, como descrito no item 4.1. A Tabela 19 apresenta as concentrações em fração mássica (%) dos componentes na alimentação inicial e em cada corrente de destilado e resíduo em todas as temperaturas utilizadas. As etapas de destilação molecular foram realizadas segundo os experimentos feitos no destilador molecular centrífugo de escala laboratorial, ou seja, com destilações consecutivas sempre realimentando o destilador com o material obtido na corrente de

resíduo da etapa anterior. Deste modo, a máxima recuperação de MAG na corrente de destilado pôde ser alcançada, diminuindo gradativamente a concentração deste componente na corrente de resíduo.

Os ensaios foram realizados por etapas nas condições de temperatura e pressão descritas na Tabela 18 e de acordo com o material alimentado descrito na Tabela 19. A recuperação de MAG em cada etapa foi gradual: a 100 °C a recuperação de MAG foi de apenas 1 %, até alcançar 52 % de recuperação de MAG a 200 °C, independentemente da vazão de alimentação (Figura 47). No caso anterior da destilação molecular escala laboratorial, foram observadas recuperações de MAG nas correntes de destilado, na vazão de 6 mL/min, de 50 e 52 % nas temperaturas de 230 e 250 °C, respectivamente. No caso atual, a máxima recuperação de 52% foi observada na temperatura de 200 °C com ambas as vazões de alimentação, 17 e 27 mL/min. Ou seja, a uma temperatura mais baixa foi obtida a mesma recuperação de MAG que no caso anterior a temperatura mais elevada.

Tabela 19 – Composições dos componentes da mistura glicérica em cada etapa da destilação molecular - escala piloto.

ALIMENTAÇÃO %										
Temperatura (°C)	Vazão entrada 17,3mL/min					Vazão entrada 23,2 mL/min				
	TAG	DAG	MAG	AGL	GL	TAG	DAG	MAG	AGL	GL
100	31,64	36,74	23,65	5,63	2,34	31,64	36,74	23,65	5,63	2,34
140	37,63	28,45	22,78	8,13	3,00	32,17	38,00	22,11	5,08	2,64
180	33,20	42,45	19,20	5,15	0,00	37,15	34,42	21,23	5,36	1,84
200	38,76	36,45	17,38	4,64	2,77	35,36	39,96	19,53	5,16	0,00

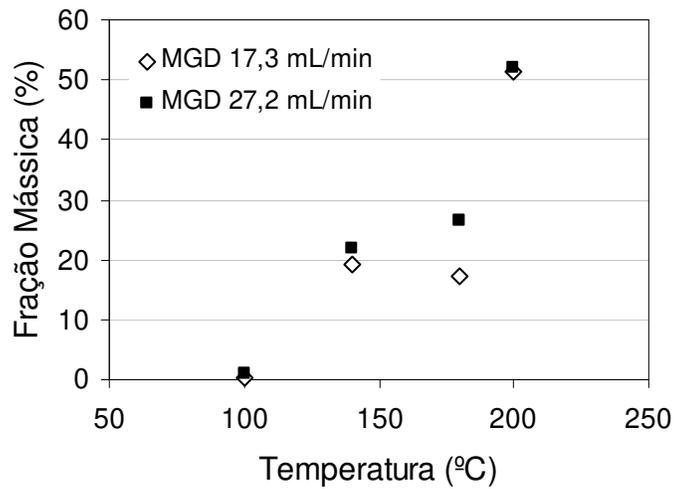


Figura 47 – Recuperação de MAG no de destilador molecular – escala piloto.

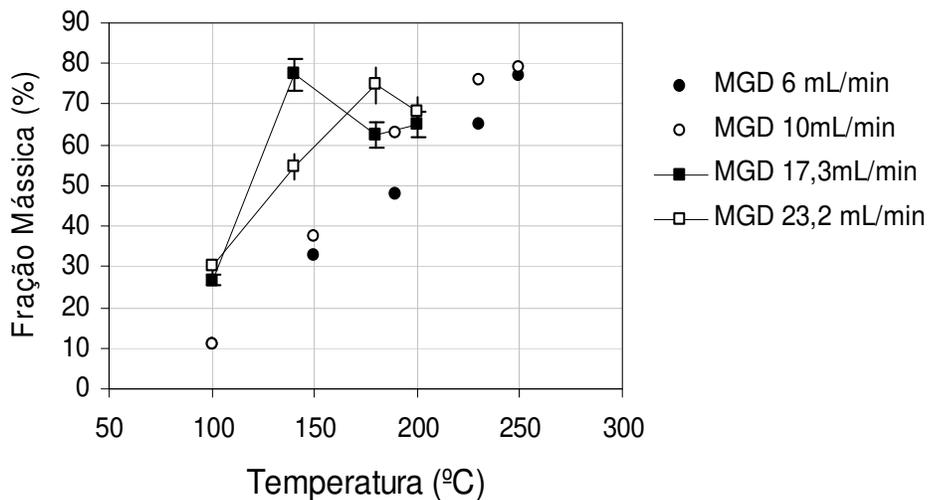


Figura 48 - Porcentagem de MAG nas amostras de destilado obtidas pelo destilador molecular de escala laboratorial (vazões 6 e 10 mL/min) e destilador molecular de escala maior (17,3 e 23,2 mL/min).

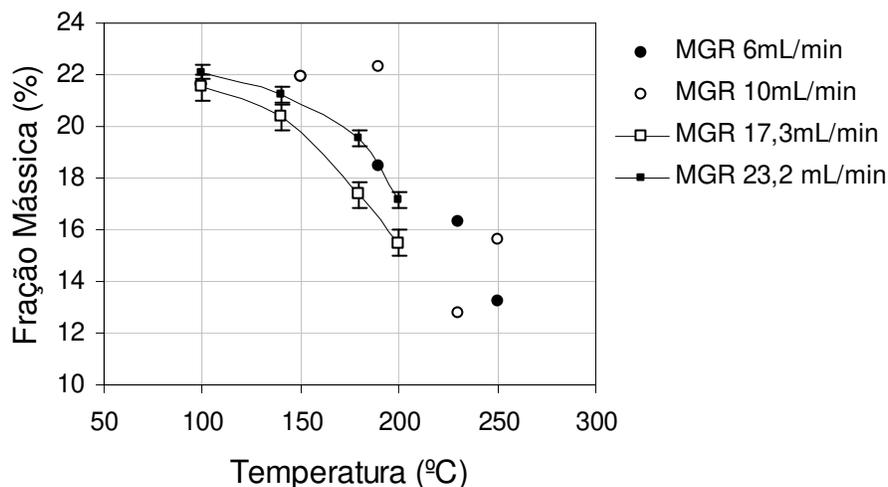


Figura 49 – Porcentagem de MAG nas amostras de resíduo (B) obtidas pelo destilador molecular de escala laboratorial (vazões 6 e 10 mL/min) e protótipo de destilador molecular de maior escala (17,3 e 23,2 mL/min).

Observando valores experimentais de separação de acilgliceróis em destilador molecular escala laboratorial, MAG são mais presentes nas correntes de destilado nas amostras obtidas com maiores vazões e maiores temperaturas de destilação, pois a combinação de maior vazão com temperatura mais elevada possibilita que quantidades maiores de moléculas de MAG sejam evaporadas. Isso é verificado na Figura 48, para as amostras obtidas no destilador molecular de menor escala. Entretanto, o mesmo comportamento das amostras de destilado obtidas no destilador molecular escala piloto não foi observado visto que o controle de todas as condições e variáveis é mais confiavelmente verificado quando se trata de uma menor escala. Manter todas as condições de operação no destilador molecular escala piloto é mais difícil, visto que nesse equipamento há mais chances de haver contaminação das amostras e o erro experimental é maior. Ainda, a

quantidade de material obtido na corrente de destilado em temperaturas abaixo de 200 °C é pequena, uma vez que nesta faixa de temperatura preferencialmente GL e AGL são evaporados, e as concentrações desses componentes no material alimentado já são consideradas baixas (Tabela 19). Isso aumenta ainda mais os riscos de contaminação com amostras anteriores. Por esses motivos, as amostras de destilado obtidas do destilador de maior escala não apresentaram o mesmo comportamento regular que as amostras retiradas no destilador de menor escala.

No entanto, para as amostras de resíduo, material mais concentrado em moléculas de TAG e DAG, observa-se uma concordância maior entre o comportamento das amostras do destilador molecular de escala laboratorial e das amostras do destilador molecular escala piloto (Figura 49). A massa total das amostras obtidas na corrente de resíduo era suficiente para minimizar contaminação com amostras anteriores, diminuindo o erro experimental, pois a maior parte do material fracionado era recolhida na corrente de resíduo. Inicialmente a amostra a ser fracionada apresentava cerca de 24 % de MAG, e ao final do processo, na temperatura de 200 °C, a quantidade de MAG nas amostras de resíduo foi diminuída para 15,5 e 17,2 % para as vazões de 17,3 e 27,2 mL/min, respectivamente.

Outro fato importante observado na Figura 49 é que a separação de MAG foi mais eficiente quando se operou o destilador molecular escala piloto a vazões menores. Desse modo a separação dessas moléculas foi mais efetiva, pois a camada de material glicérico formado na superfície do evaporador é menos espessa, proporcionando uma melhor troca de calor entre o evaporador aquecido e as moléculas a serem evaporadas naquela temperatura. Esta discussão pode ser complementada observando os valores calculados de porcentagem de destilado (100D/F) em diferentes TE e vazões empregadas (Tabela 20).

Tabela 20 - Porcentagem de destilado (100D/F) das amostras nas vazões de 6 e 10 mL/min e diferentes TE.

TE (°C)	100D/F	
	Q = 17,3 mL/min	Q = 23,2 mL/min
100	1,28	
140	13,96	16,03
180	13,96	13,91
200	54,95	47,59

No destilador molecular escala laboratorial essa diferença na taxa de evaporação de MAG a diferentes vazões também foi verificado quando se trabalhou a temperaturas menores que 200 °C. Foi observado que, a temperaturas acima de 200 °C, esse fato não é tão expressivo, e o efeito de diferentes vazões de alimentação diminui com o aumento da temperatura do evaporador para 230 e 250 °C. A partir de 200 °C a taxa de separação de MAG era preferencialmente comandada pela temperatura e não mais pela vazão de alimentação. Como no caso atual não foi possível elevar a temperatura do evaporador acima de 200 °C sob o risco de causar danos ao equipamento, esse fato não pode ser comprovado.

Ao final das etapas de destilação molecular em escala laboratorial na temperatura de evaporação de 250 °C, foi obtido um material na corrente de resíduo com alta concentração de DAG, então denominado de óleo de DAG, com composição final de 29,83 % de TAG; 53,20 % de DAG; 15,64 % de MAG e 1,33 % de AGL, a partir de uma mistura inicial contendo 25,06 % de TAG, 46,63 % de DAG, 21,72 % de MAG, 5,38 % de AGL e 1,21 % de GL. O material final obtido na corrente de resíduo após as etapas de destilação

molecular em escala piloto, na temperatura de evaporação de 200 °C, apresentou composição final de 38,14 % de TAG, 42,29 % de DAG, 17,18 % de MAG e 2,39 % de AGL, a partir de uma mistura glicérica contendo inicialmente 31,64 % de TAG, 36,74 % de DAG, 23,65 % de MAG, 5,63 % de AGL e 2,34 % de GL.

De acordo com esses resultados, houve um aumento de 20 % de TAG e 14 % de DAG nas amostras de Resíduo para ambos os equipamentos, mesmo em temperaturas de evaporação diferentes. Igualmente, houve uma redução de 72 % na concentração de MAG nas duas amostras de resíduo das destilações em escala laboratorial e piloto. No entanto, a amostra de resíduo do equipamento de escala laboratorial apresentou redução de 24,0 % de AGL, enquanto que no equipamento escala piloto a quantidade de AGL foi reduzida de 42,50 %. Para ambos os casos a glicerina foi eliminada nas primeiras etapas de destilação a temperaturas de evaporação mais baixas (100 °C).

Considerando os resultados obtidos, o destilador molecular centrífugo construído com tecnologia nacional, de escala piloto, independentemente de todas as diferenças operacionais com o equipamento importado (como diferenças nas velocidades de rotação, distâncias entre evaporador e condensador, temperatura máxima do evaporador) ofereceu grande potencial de separação das amostras de acilgliceróis contendo MAG e DAG.

Tendo em vista as condições de operação velocidade de rotação e temperatura máxima de evaporação, o destilador molecular centrífugo importado apresenta vantagens sobre o de tecnologia nacional como a maior velocidade de rotação do rotor e possibilidade de elevação da temperatura do evaporador acima de 220 °C. De acordo com discussão anterior, quanto menor a espessura da camada de material alimentado na superfície do evaporador (proporcionada por uma velocidade alta do rotor), melhor a troca de calor entre

a placa do evaporador e as moléculas na superfície. Porém, com uma velocidade de rotação menor, a camada de material alimentado não é tão fina, porém o material a ser evaporado apresenta maior tempo de residência na superfície da placa aquecida do evaporador, e as moléculas passam a ter mais chance de serem evaporadas com o tempo maior de contato. Ou seja, a desvantagem da velocidade de rotação do rotor do equipamento nacional frente à alta velocidade do rotor do equipamento importado é compensada pelo tempo maior que as moléculas permanecem em contato com o evaporador.

No caso da temperatura máxima de evaporação, esta é limitada pela temperatura de degradação do material alimentado. Acima de 250 °C há degradação dos acilgliceróis, por isso esta foi a temperatura estipulada máxima de operação no equipamento importado. No destilador nacional a temperatura máxima de evaporação foi limitada pelo próprio equipamento, porém não trouxe grandes desvantagens. Obviamente, quanto maior a temperatura de evaporação, mais MAG poderiam ser recuperados, entretanto, em temperaturas acima de 200 °C são evaporadas também moléculas mais pesadas, como DAG e até alguns TAG, que não são interessantes serem obtidas na corrente de destilado desta pesquisa.

A grande vantagem observada do destilador molecular escala piloto em relação ao de escala laboratorial foi a pressão interna de evaporação alcançada: $1,8 \times 10^{-4}$ atm contra $2,0 \times 10^{-4}$ atm no destilador de menor escala. O melhor vácuo obtido no destilador de escala piloto foi fundamental para o melhor fracionamento de componentes MAG e DAG.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DESTILADOS

4.6.1 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DAS AMOSTRAS OBTIDAS POR DESTILAÇÃO MOLECULAR

Após as etapas de destilação molecular apresentadas no item 4.5, foram realizadas cromatografias gasosas para verificar a distribuição dos diferentes ácidos graxos do óleo de soja original presentes em cada amostra de MAG e DAG. A partir dos valores de porcentagens dos diferentes ácidos graxos e, possuindo as massas molares (MM) de cada um respectivamente, foi possível determinar a Massa Molar Média (g/mol) das amostras obtidas de MAG e DAG obtidas.

Na Tabela 21 é apresentada a distribuição dos ácidos graxos presentes nas amostras de MAG, óleo enriquecido de DAG e do óleo de soja original.

Tabela 21 – Composição dos diferentes ácidos graxos nas amostras obtidas.

Ácido Graxo	MM (g/mol)	Composição (%) dos AG (m/m)		
		Óleo de Soja	Óleo de DAG	MAG destilados
C16:0 – Palmítico	270	11,6	15,0	15,8
C18:0 – Esteárico	298	2,5	3,8	3,3
C18:1 – Oléico	297	22,5	22,4	23,8
C18:2 – Linoleico	295	54,9	48,8	52,1
C18:3 – α -Linolênico	293	5,5	2,3	0,7
C20:0 – Araquídico	326	0,4	-	-
C20:1 – Gadolênico	324	2,8	3,7	3,0
Massa Molar (g/mol)		970,2	619,3	366,3

4.6.2 DETERMINAÇÃO DA MASSA ESPECÍFICA DOS ÓLEOS

As determinações das massas específicas (g/cm^3) dos óleos de soja, de DAG e acilgliceróis em diferentes temperaturas (20, 40 e 70°C) foram realizadas e são apresentadas na Tabela 22.

Em ordem crescente de massa específica temos que Acilgliceróis > DAG >TAG. Desse modo observa-se que amostras contendo maior concentração de componentes com menor massa molar apresentam maior massa específica.

Tabela 22 – Massa específica (ρ) dos óleos a diferentes temperaturas.

Amostra	Temperatura (°C)	ρ (g/cm^3)
Óleo de Soja	20	0,9207
	40	0,9076
	70	0,8876
Óleo de DAG	20	0,9246
	40	0,9119
	70	0,8900
Acilgliceróis*	40	0,9244
	70	0,9035

(*)Não foi determinada ρ na temperatura de 20°C para a mistura de acilgliceróis e MAG por apresentarem-se sólido/pastoso.

4.6.3 ANÁLISES TÉRMICAS

A decomposição térmica dos materiais e análise dos pontos de fusão foram determinados através de análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), ilustradas na Figura 50.

Praticamente não houve diferenças entre a quantidade de energia necessária para degradar as amostras de óleo de soja e óleo de DAG, visto a semelhança destas amostras quanto às porcentagens de TAG e DAG e de suas massas molares. Para amostras que apresentavam apenas MAG e AGL, foi requerido menos energia para degradar a estrutura das cadeias carbônicas.

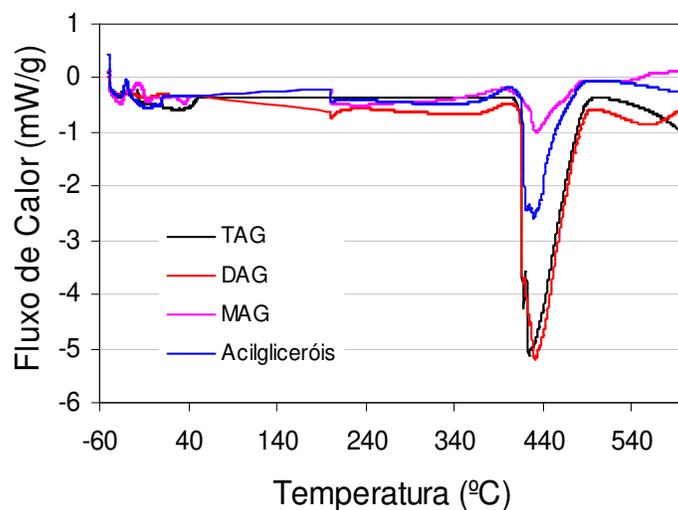


Figura 50 – Degradação térmica das amostras de óleo de soja e acilgliceróis antes e após separação por destilação molecular.

Através dos picos de fusão DSC é possível observar distintas propriedades que permitem a identificação do material, como temperatura final de fusão. A temperatura final de fusão determinada por DSC pode ser considerada pelo ponto onde termina o fenômeno da fusão e todos os cristais se transformam para a forma líquida (CHIH et al, 2008; NASSU e GONÇALVES, 1999). Assim sendo, as temperaturas finais de fusão das amostras analisadas são apresentadas na Tabela 23.

Tabela 23 – Temperaturas de degradação e temperaturas finais de fusão das amostras glicéricas.

Amostras	T. Degradação (°C)	T. Final de Fusão (°C)
TAG	431,0	-5
DAG	435,5	10
MAG	432,0	42
Acilgliceróis	431,0	20

CAPÍTULO 5

5 CONCLUSÕES

5.1 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

Os resultados sobre *screening* de lipases indicaram a enzima *Candida antarctica* (CA-IM) como a mais eficiente na catálise de reações de glicerólise para produção de MAG e DAG nas condições estudadas.

Utilizando-se a lipase TL-IM como catalisador, os resultados para MAG e DAG foram de 20 e 45 %, com baixa produção de AGL (menos de 9 %).

A presença de água é fundamental para que ocorra a reação de glicerólise, pois as lipases atuam na interface água/óleo. Porém, uma quantidade elevada de água no meio reacional propicia reações de hidrólise, ao contrário da reação desejada de glicerólise, ocasionando alta concentração de AGL no produto final.

A fim de minimizar custos do processo e diminuir a concentração de AGL na mistura glicérica, estudos com CA-IM mostraram que a redução de 10 para 2 % de lipases nas reações resultou em uma pequena redução na produção de MAG, 27 para 24 %, comparada a redução considerável na produção de AGL (12,5 para 5,38 %).

As lipases de TL-L e CA-IM apresentaram alta produção de monoacilgliceróis, cerca de 60 % em sistemas enzimático na presença de solvente terc-Butanol, superior à porcentagem obtida nos sistemas livres de solventes (geralmente, 30 % de monoacilgliceróis).

O reuso de lipases para a produção de MAG e DAG através de glicerólise enzimática utilizando sistemas livre de solventes apresentou excelentes resultados inovadores, tanto para lipase imobilizada quanto para lipase livre. Ao final das reações foi observada a formação espontânea de fases distintas: fase hidrofóbica contendo acilgliceróis e fase hidrofílica de glicerol, lipases e água. Desse modo, mantendo as lipases no reator por diversos ciclos de reação foi possível o reuso de ambas lipases. A lipase imobilizada, mais estável, mostrou alta conversão de TAG de 82 % durante nove ciclos de reação e os rendimentos de DAG e MAG foram mantidos constantes em torno de 53 e 24 %, respectivamente. Reações com lipase livre indicam a excelente possibilidade de reuso da lipase não imobilizada, porém após o quinto ciclo a lipase mostrou perda da estabilidade e decréscimo na conversão de TAG.

A utilização da glicerina destilada obtida a partir da produção de biodiesel foi efetuada com sucesso. A integração dos dois processos, transesterificação de óleos para produção de ésteres (biodiesel) adequada à glicerólise para produção de mono e diacilgliceróis, é uma alternativa para o aproveitamento da glicerina excedente.

5.2 DESTILAÇÃO MOLECULAR

A cada etapa de destilação, o material obtido na corrente de resíduo foi alimentado no destilador para a próxima etapa, caracterizando uma destilação tipo “cascata”. A concentração de MAG obtida na corrente de destilado foi de 80% nas seguintes condições de operação: TE = 250 °C, Ve = 10mL/min, P = 0,18 torr, TC = 60 °C, para o destilador molecular de escala laboratorial.

Foi obtido como resíduo um óleo contendo em sua composição preferencialmente DAG na concentração de 53 % (m/m).

Foram testados dois equipamentos de destilação molecular centrífugo: um de escala laboratorial e outro em escala piloto. Foi observado que muitos parâmetros operacionais diferem de um equipamento para outro, no entanto o equipamento nacional demonstrou eficiência na separação dos componentes desejados.

Foram obtidas recuperações máximas de MAG de 52 % para ambos os destiladores e concentrações de MAG purificado de 80 e 66 % nas amostras de destilado para os destiladores moleculares de escala laboratorial e piloto, respectivamente, para misturas de acilgliceróis da alimentação que apresentavam 22 e 23 % (m/m) de MAG, respectivamente.

6 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar reações de glicerólise enzimática com diferentes óleos vegetais (óleo de peixe, óleo de palma, óleo de prímula) e com lipases específicas a fim de produzir monoacilglicerol e óleo de diacilglicerol com elevadas propriedades e valores nutricionais.

Realizar um estudo mais amplo sobre reuso de lipases imobilizadas e livres, com diversos tipos de lipases comerciais para obtenção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Observar preferencialmente as condições de processo e possibilidade de análise de atividade enzimática durante o reuso das lipases.

Caracterizar através de cromatografias (gasosas e/ou líquida) os componentes mono e diacilgliceróis oriundos de reações enzimáticas quanto aos seus isômeros 1(3)-MAG e 2-MAG e 1,2-DAG e 1,3-DAG.

A oxidação lipídica está na origem do desenvolvimento do ranço, da produção de compostos responsáveis pela ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Este tipo de reações não só diminui o tempo de vida e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como podem gerar compostos nocivos. Em função disso, é proposto caracterizar os produtos monoacilglicerol e óleo de diacilglicerol quanto ao grau de oxidação lipídica e estabilidade antioxidante.

7 PUBLICAÇÕES

1. FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, PINTO, Glaucia Maria F., WOLF-MACIEL, Maria Regina, MACIEL FILHO, Rubens. Monoglyceride and Diglyceride Production Through Lipase-Catalyzed Glycerolysis and Molecular Distillation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *on line first*, 2009. DOI: 10.1007/s12010-009-8822-6.

2. FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, PINTO, Glaucia Maria F., WOLF-MACIEL, Maria Regina, MACIEL FILHO, Rubens, BATISTELLA, César Benedito. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. *Química Nova*, 32, 1539 – 1543, 2009.

3. CARVALHO, Patricia de Oliveira; FREGOLENTE, Leonardo Vasconcelos; FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente; WOLF-MACIEL, Maria Regina. Screening of Microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 747-756, 2009.

4. FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, FREGOLENTE, Leonardo Vasconcelos, PINTO, Glaucia Maria Ferreira, BATISTELLA, Benedito Cesar, WOLF-MACIEL, Maria Regina, MACIEL FILHO, Rubens. Monoglycerides and Diglycerides Synthesis in a Solvent-Free System by Lipase-Catalyzed Glycerolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146,165 - 172, 2008.

5. FREGOLENTE, Leonardo Vasconcelos, FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, CHICUTA, Andrea. M., BATISTELLA, Benedito Cesar., MACIEL FILHO, Rubens., WOLF-MACIEL, M. R. Effect of Operating Conditions on the Concentration of Monoglycerides Using Molecular Distillation. *Chemical Engineering Research & Design*, 85, 1744-3563, 2007.

6. FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, RIVER, Elmer. C., FREGOLENTE, Leonardo Vasconcelos, CARVALHO, Patricia de Oliveira, COSTA, Aline., WOLF-MACIEL, Maria Regina, MACIEL FILHO, Rubens. A CAPE approach to gamma-Linolenic acid production via Lipase-Catalyzed Enzymatic hydrolysis In: 17th EUROPEAN SYMPOSIUM ON COMPUTER AIDED PROCESS ENGINEERING ed. : Elsevier, 2007, 24, 1-1362.

FREGOLENTE, Patricia Bogalhos Lucente, PINTO, Glaucia Maria F., WOLF-MACIEL, Maria Regina. Investigation of reuse of free and immobilized lipases in solvent free lipase-catalyzed glycerolysis. *Process Biochemistry*, 2010. (*SUBMETIDO*).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, A. W. e GAST, A. P. Physical Chemistry of Surfaces, John Wiley & Sons, 1997.

ADHIKARI, S.; ADHIKARI, J. Detection of interesterified fats in hydrogenated fats. Journal of the American Oil Chemistry Society, 69, 10, 1051-1053, 1992.

ALVES, A.; CARDOSO, J.; ALMEIDA, M.; MELO, C.; COSTA, H.; CÁRDIAS, H. Reaproveitamento de lípase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. Reaproveitamento de lípase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. Disponível em: <www.biodiesel.gov.br/docs/.../producao/Reaproveitamento01.pdf>. Acesso em 05 de Janeiro de 2010.

ANP, Biodiesel – Introdução. O Biodiesel obrigatório. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=9204&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1261120181811>>. Acesso em 18 dez. 2009.

AOCS Ca 5a-40. Official AOCS methods for free fatty acids. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society: Champaign, 2004.

APPLEBY, D. B. Glycerol. In: KNOTHE, G. The Biodiesel Handbook. Cap. 11, New York. American Oil Chemists' Society, 2005.

ASTM E203, Standard Test Method for Water Using Volumetric Karl Fischer Titration, 2001.

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (\pm)-menthol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16, 169–173, 2001.

BACKELS, B. J. Distilled Monoglycerides, *Food Manufacture* 2, 25, 1976.

BANCQUART, S., VANHOVE, C., POUILLOUX, Y., BARRAULT, J., Glycerol Transesterification with Stearate over Solid Basic Catalysts I. Relationship Between Activity and Basicity, *Applied Catalysis A* 218,1-11, 2001.

BATISTELLA, C. B., MACIEL, M. R. W., Modeling, Simulation and Analysis of Molecular Distillators: Centrifugal and Falling Film, *Computers & Chemical Engineering* 20, 19-24, 1996.

BATISTELLA, C. B., Modelagem e Simulação de Destiladores Moleculares de filme Descendente e Centrífugo, Tese de Mestrado, Campinas, SP, 1996.

BATISTELLA, C. B., MACIEL, M. R. W., MACIEL FILHO, R., Rigorous Modeling and Simulation of Molecular Distillators: Development of a simulator under conditions of non ideality of the vapor phase, *Computers & Chemical Engineering* 24, 1309-1315, 2000.

BATISTELLA, C. B., MORAES, E. B., MACIEL FILHO, R., MACIEL, M. R. W., Molecular Distillation Process for Recovering Biodiesel and Carotenoids from Palm Oil, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98, 1149-1159, 2002.

BATISTELLA, C. B. 2008. Comunicação pessoal.

BELLOT, J. C., CHOISNARD, L., CASTILLO, E., MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 362 – 369, 2001.

BENAZZI, T. L., Estudo do comportamento de fases de sistemas contendo glicerol e óleo de oliva em propano na presença de surfactante, Tese de Mestrado, Erechim, RS, 2005.

BOSSAERT, W.; DE VOS, D. E.; RHIJN, W. V.; BULLEN, J.; GROBET, P.; JACOBS, P. Mesoporous Sulfonic Acids as Selective Heterogeneous Catalysts for the Synthesis of Monoglycerides. *Journal of Catalysis* 182, 156–164, 1999.

BÖRJESSON, I. E., HÄRRÖD, M. Synthesis of Monoglycerides by Glycerolysis of Rapeseed Oil Using Immobilized Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 701-707, 1999.

BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microbial Technology*. 17, 578-86, 1995.

BORNSCHEUER, U. T., KAZLAUSKAS R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. Weinheim: Wiley-VCH, 164-167, 1999.

BOT, A.; YVONNE, S.J.; VELDHUIZEN, R.A.; ELI C. R. Non-TAG structuring of edible oils and emulsions. *Food Hydrocolloids* 23,1184–1189, 2009.

BOUSQUET, M-P.; WILLEMOT, R-M.; MONSAN, P.; BOURES, E. Lipase-catalyzed α -butylglucoside lactate synthesis in organic solvent for dermo-cosmetic application. *Journal of Biotechnology*, 68, 61 – 69, 1999.

BRAGATHESWARAN G., *Oilseeds, Australian Commodities*, 15, 506 – 509, 2008.

BREIVIK, H., HARALDSSON, G. G., KRISTINSSON, B., Preparation of Highly Purified Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid, *Journal of the American Oil Chemists Society* 74,1425-1429, 1997.

BUSINESS WIRE (2007). Disponível em
<http://findarticles.com/p/articles/mi_m0EIN/is_2007_Dec_5/ai_n27466820>. Acesso em
21 de Janeiro de 2008.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 75 – 80, 2003.

CASTRO, H. F., MENDES, A. A., SANTOS, C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, 27, 146 – 156, 2004.

CHANG, P. S.; RHEE, J. S.; KIM, J. J. Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized in liposome in reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 1159 – 1165, 1991.

CHEN, F. , CAI, T., ZHAO, G., LIAO, X., GUO, L., HU, X., Optimizing Conditions for the Purification of Crude Octacosanol Extract from Rice Bran Wax by Molecular Distillation Analyzed Using Response Surface Methodology, *Journal of Food Engineering* 70, 47-53, 2005.

CHIU, M. C.; GIOIELLI, A. L.; GRIMALDI, R. Lipídios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média. II- pontos de amolecimento e fusão. *Química Nova*, 238-243, 2008.

CICHELO, M. S. F., PAVANELLI, A. P., PALMA, E. J., ANDRADE, M. A., Alternativas de Emulsificantes para a qualidade de massas alimentícias, Artigo Técnico, Oxiten S/A Indústria e Comércio, 1 -10, 2000.

CORMA, A.; GARCIA, H.; IBORRA, S.; PRIMO, P.; “Modified faujasite zeolites as catalysts in organic reactions: Esterification of carboxylic acids in the presence of HY zeolites”, *Journal of Catalysis*, 120, 78-87, 1998.

CRUZ, C.L.C.V. Otimização da síntese de monoacilgliceróis acetilados por via enzimática. Tese de Doutorado, UNICAMP, 2007.

CVENGROS, J., MIKOV, M., LUTISAN, J., Modelling of Fractionation in a Molecular Evaporator with Divided Condenser, *Chemical Engineering and Processing* 39, 191-199, 2000.

CVENGROS, J., POLLÁK, S., MIKOV, M., LUTISAN, J., Film Wiping in the Molecular Evaporator, *Chemical Engineering Journal* 81, 9-14, 2001.

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

D'AGOSTINI, D. Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. Tese de Doutorado, Área de Tecnologia de Alimento, Universidade de São Paulo, 2001.

D'AGOSTINI, D.; GIOIELLI, L. A. Distribuição estereoespecífica de lipídios estruturados partir de gorduras de palma, palmiste e triacilgliceróis de cadeia média. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, 345- 354, 2002.

DAMSTRUP, M. L. Process Development of Enzymatic Glycerolysis for Industrial Monoacylglycerol Production. PhD Thesis, Food Production Engineering, Technical University of Denmark, 2008.

DANISCO Corporation. Disponível em <<http://www.danisco.com>>. Acesso em: 21 de Novembro de 2005.

EET Corporation. Glycerin Purification. Disponível em:

<http://www.eetcorp.com/heepm/glycerine.htm> Acesso em: 26 de Novembro de 2009.

FERREIRA-DIAS, S.; CORREIA, A. C.; BAPTISTA, F. O.; FONSECA, M. M. R.; Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. *Journal of molecular catalysis*, 11, 699-711, 2001.

FILLETI, J. W. Síntese enzimática de triacilgliceróis estruturados de gordura de ucuúba. Tese de Doutorado, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2005.

FORMARIZ, T. P., URBAN, M. C. C., SILVA, A. A. JR., GREMIÃO, M.P. D., OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41, 301-313, 2003.

FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. Monoglicérides: produção por via enzimática e algumas aplicações. *Química Nova*, 31, 1514-1521, 2008.

FREGOLENTE, L. V., BATISTELLA, C. B., MACIEL, R., WOLF-MACIEL, M. R. Response Surface Methodology Applied to Optimization of Distilled Monoglycerides Production. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82 (9), 673-678, 2005.

FREGOLENTE, L. V., RIZZI, A. C. J., FERMOSELLI, N. E. G., LOPES, P. M. C. Aproveitamento da Glicerina Obtida como subproduto da indústria do biodiesel. Curso de especialização em Engenharia de Processamento de Petróleo. Rio de Janeiro: UERJ – Petrobras, 2007.

FREGOLENTE, P. B. L., FREGOLENTE, L. V., PINTO, F. G. M., BATISTELLA, B. C., WOLF-MACIEL, M. R., MACIEL FILHO, R. Monoglycerides and Diglycerides Synthesis

in a Solvent-Free System by Lipase-Catalyzed Glycerolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146, 165 - 172, 2008.

FREGOLENTE, P. B. L.; PINTO, G. M.F.; WOLF-MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R.; BATISTELLA, C. B. Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis via glicerólise enzimática e destilação molecular. *Química Nova*, 32, 1539 – 1543, 2009.

FUREBY, A. M.; TIAN, L.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B.; Preparation of diglycerides by lipase-catalysed alcoholysis of triglycerides. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 198-206, 1997.

FUSE, T.; ODA, G.; ARAI, K.; TAKAMURA, K. ; KUSU, F. Electrochemical determination of lipase activity in pharmaceutical preparations. *Electrochimica Acta* 45, 2933 – 2937, 2000.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. *J Journal of the American Oil Chemists' Society* 74, 621 – 634, 1997.

GRIFFIN, WC. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 5, 259,1954.

GROSS, R. A.; KALRA, B.; KUMAR, A. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. *Applied Microbiol Biotechnology* (2001) 55:655–660.

GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. *Lipid Technologies and Applications*. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997.

GUO, Z.; XU, X. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. *Green Chemical*, 8, 54 – 62, 2006.

GUTH, J.; LENTNER, V. Aqueous enzyme delivery system. World Intellectual Property Organization, WO 2006/018048 A1, 2006.

HARTMAN L., LAGO R. C. A., Laboratory Practice, 22, 475-476, 1973.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology 39 235–251, 2006.

HICKMAN, K. C. D., High-Vacuum Short-Path Distillation – A Review. Chemical Reviews., 34, 51-106, 1943.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 16, 53–58, 2001.

JANDACEK, R. J.; WHITESIDE, J. A.; HOLCOMBE, B. N.; VOLPENHEIN, R. A.; TAULBEE, J. D. The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position. American Journal of Clinical Nutrition, 45, 940-945, 1987.

KAETHONG, W., H-KITIKUN, A., Glycerolysis of palm olein by immobilized lipase PS in organic solvents, Enzyme and Microbial Technology 35, 218-222, 2004.

KAMIDA, M. H., DURRANT, R. L., MONTEIRO, R. T. R., ARMAS, E. D. Biodegradação de efluentes têxteis por *Pleurotus sajor-caju*. Química Nova, 629 – 632, 2005.

KAWALA, Z., DAKINIEWICZ, P., Influence of Evaporation Space Geometry on Rate of Distillation in High-Vacuum Evaporator, Separation Science & Technology 37, 1877-1895, 2002.

KIM, H. J.; LEE, K. T.; LEE, M. K.; JEON, S. M.; CHOI, M. S. Diacylglycerol-enriched structured lipids containing CLA and capric acid alter body fat mass and lipid metabolism in rats. *Annals of nutrition & metabolism*, 50, 219 – 228, 2006.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Process Optimization using response surface desing and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 53, 7059 – 7066, 2005.^a

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H.; Diacylglycerol Synthesis by Enzymatic Glycerolysis: Screening of Commercial Available Lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82 (5) 329-334, 2005.^b

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 472–477, 2006.

KOGURI, Y.; AZUMA N. Synthesis of triacylglycerol from polyunsaturated fatty acid by immobilized lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1397 – 1403, 2007.

KUNZ, A., ZAMORA-PERALTA, P., MORAES, G. S., DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, 78 – 82, 2002.

KWON, S. J., HAN, J. J., RHEE, J. S. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 700-704, 1995.

KNOTHE G., GORPEN, J.V., KRAHL, J., *Manual do Biodiesel*, Editora Edgard Blucher, 2006.

LASZLO, J.A.; COMPTON, D. L.; VERMILLION, K. Acyl Migration Kinetics of Vegetable Oil 1,2-Diacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 307 – 312, 2008.

LERARIO, D., GIMENO, S. G., FRANCO, L., IUNES, M., FERREIRA, S. Excesso de peso e gordura abdominal para a síndrome metabólica em nipo-brasileiros. *Revista Saúde Pública*, 36, 4-11, 2002.

LI, D., XU T., TAKASE, H., TOKIMITSU, I., ZHANG, P., WANG, Q., YU, X., ZHANG, A. Diacylglycerol-induced improvement of whole-body insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: A long-term randomized, double-blind controlled study. *Clinical Nutrition*, 27, 203-211, 2008.

LINKO, Y. Y.; LÄMSÄ, M.; WU, X.; UOSUKAINEN, E.; SEPPÄLÄ, J.; LINKO, P. Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 66, 41-50, 1998.

LLOYD, N.; FOGLIA, T.; MARMER, W. Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1191 – 1195, 2006.

LUSITAN, J., MICOV, M., CVENGROS, J., The Influence of Entrainment Separator on the Process of Molecular Distillation, *Separation Science & Technology* 33, 83-96, 1998.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C. H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microbial Technology*, 14(6), 426-46, 1992.

MÁRQUEZ-ALVAREZ, C.; SASTRE, E.; PEREZ-PARIENTE, J.; “Catalysts for the Synthesis of Fatty Esters of Glycerol, Polyglycerols and Sorbitol from Renewable Resources”, *Journal Topics in Catalysis*, 27, 105-117, 2004.

MARTINS, P. F., Implantação das Metodologias de Caracterização e Estudo da Remoção de Ácidos Graxos Livres dos Destilados Desodorizados de Óleos Vegetais por Meio da Destilação Molecular. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2005.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; UCHIKAWA, S.; NABETANI, H.; FURUSAKI, S.; SEKI, M. Oil-water interfacial activation of lipase for interesterification of triglyceride and fatty acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 7, 1121 – 1127, 2000.

MAKI, C. K.; DAVIDSON, M.; TSUSHIMA, R.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; UMPOROWICZ, D. N.; DICKLIN, M. R.; FOSTER, G. S.; INGRAM, K. A.; ANDERSON, B. D.; FROST, S. D.; BELL M.; Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 1230–1236, 2002.

McNEILL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 779 – 783, 1990.

MENG, X.; ZOU, D.; SHI, Z.; DUAN, Z.; MAO, Z.; Dietary diacylglycerol prevents high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and abdominal adipose tissue. *Lipids*, 39, 37-41, 2006.

MICOV, M., LUTISAN, J., CVENGROS, J. Balance Equations for Molecular Distillation, *Separation Science & Technology* 32, 3051-3066, 1997.

MIKIO, T.; MASAO, O.; FUJI, T. Lipase hydrolysis of milk fat and its soft fractions. *Research Bulletin of Obihiro University. Natural Science* 22, 89 – 94, 2001.

MINGARRO, I.; ABAD, C.; BRACO, L. Interfacial activation-based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes. *Biochemistry*, 92, 3308 – 3312, 1995.

MORAES, E. B., BATISTELLA, C. B., ALVAREZ, M. E. T., MACIEL FILHO, R., MACIEL, M. R. W., Evaluation of Tocopherol Recovery through Simulation of Molecular Distillation Process, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113, 689-711, 2004.

MOTA, C. J.A; SILVA, C. X.; GONCALVEZ, V. L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 32, 639 – 648, 2009.

MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology* 9, 201 – 210, 1998.

MUKHERJEE, K. D., Lipid Biotechnology. In: Akoh, C. C., Min, D. B. *Food lipids*. New York: Marcel Dekker, 589-639, 1998.

NABESHIMA, E. H., HASHIMOTO, J., M., EL-DASH, A. A., Efeito da adição de emulsificantes em massas alimentícias sem glúten produzidas com extrusora termoplástica, *B.CEPPA* 21, 223 – 238, 2003.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. Determination of melting point of vegetable oils and fats by differential scanning calorimetry (DSC) technique. *Grasas y Aceites*, 50, 16 – 21, 1999.

NOUREDDINI, H; MEDIKONDURU, V. Glycerolysis of Fats and Methyl Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74, 419 – 425, 1997.

NOUREDDINI, H.;HARMEIER, S. E. Enzymatic glycerolysis of soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society 75, 1359 – 1365, 1998.

NOUREDDINI, H; HARKEY, D.W.; GUTSMAN, M. R. A Continuous Process for the Glycerolysis of Soybean Oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81, 203 – 207, 2004.

OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; FACCIO, C.; ROSA, C.D.; BENDER, J. P.; LIPKE, N.; MENONCIN, S.; AMROGINSKI, C.; OLIVEIRA, J. V. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. Applied Biochemistry and Biotechnology. 113 – 116, 2004.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids–Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. 2002—Comprehensive reviews in food science and food safety, 1, 93 – 103, 2002.

OTERO, C., ARCOS, J. A., BERRENDERO, M. A. Emulsifiers from solid and liquid polyols: different strategies for obtaining optimum conversions and selectivities. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11, 883 – 892, 2001.

PALMA, E. J.; CICHELO, M. S. F.; PAVANELLI, A. P., Emulsificantes em Panificação, Artigo Técnico, Oxiteno S/A Indústria e Comércio,1 – 7, 2004.

PAVANELLI, A. P.; CICHELO, M. S.; PALMA, E. J. Emulsificantes como agentes de aeração em bolos. Oxiteno S/A Indústria e Comércio. Artigo técnico, ART AL004, 2000.

PAWONGRAT, R.; XU, X.; H-KITTIKUN, A. Physico-enzymatic production of monoacylglycerols enriched with very-long-chain polyunsaturated fatty acids. Journal of the Science of Food and Agriculture 88, 256–262,2008.

PEREIRA, C.; SILVA, M.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of monolaurin. *Applied biochemistry and biotechnology* 433 – 445, 2004.

PERNETTI, M.; MALSSSEN, K. F.; FLÖTER, E.; BOT, A. Structuring of edible oils by alternatives to crystalline fat. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12, 221–231, 2007.

POUILLOUX, Y.; MÉTAYER, S.; BARRAULT, J. Synthesis of glycerol monoctadecanoate from octadecanoic acid and glycerol. Influence of solvent on the catalytic properties of basic oxides. *Chemistry* 3, 589–594, 2000.

RIGO, T.R.; PERGHER, S. B. C.; PETKOWICZ, D. I.; SANTOS, J. H. Z. Um novo procedimento de síntese da zeólita empregando argilas naturais. *Química Nova*, 32, 21 – 25, 2009.

RHO, K. L., CHUNG, O. K., SEIB, P. A., NOODLES. The Effect of Wheat Flour Lipids, Gluten, and Several Starches and Surfactants on the Quality of Oriental Dry Noodles, *Cereal Chemical* 66, 276-282, 1989.

ROBERTSON, D.; BORNCHUEUR, U. T. Biocatalysis and biotransformation: New technologies, enzymes and challenges. *Current Opinion in Chemical Biology* 9,164–165, 2005.

ROGERS, M. A. Novel structuring strategies for unsaturated fats – Meeting the zero-trans, zero-saturated fat challenge: A review. *Food Research International* 42, 747–753, 2009.

SAITO, S., HERNANDEZ-ONO, A., GINSBERG, H. N. Dietary 1,3-diacylglycerol protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Metabolism Clinical and Experimental* 56, 1566–1575, 2007.

SALUNKHE, M.M.; NAIR, R.; Novel route for the resolution of both enantiomers of dropropizine by using oxime esters and supported lipases of *Pseudomonas cepacia*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 10, 535 – 538, 2000.

SAGALOWICZ, L.; LESE, M. E.; WATZKE, H. J.; MICHEL, M. Monoglyceride self assembly Structures as delivery vehicles. Trends in Food Science & Technology 17, 204–214, 2006.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; OZAKI, S.; NAKANISHI, K. Purification and Characterization of a Monoacylglycerol Lipase from *Pseudomonas sp.* LP7315. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91, 27 – 32, 2001.

SCHOENFELDER, W. Determination of Monoglycerides, Diglycerides, Triglycerides and Glycerol in Fats by Means of Gel Permeation Chromatography. European Journal of Lipid Science and Technology 105, 45-48 2003.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. Journal of the Brazilian Chemical Society 9, 199-210, 1998.

SHANLEY, A. Enzymes usher in a new era. Chemical Engineering 103, 63 – 64, 1998.

SHIMADA, Y.; HIROTA, Y.; BABA, T.; SUGIHARA, A.; MORYIAMA, S.; TOMINAGA, Y.; TERAJ, T. Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids. Journal of the American Oil Chemists' Society 713 – 716, 2007.

SHIMIZU M., MORIWAKI J., NISHIDE T., NAKAJIMA Y. Thermal deterioration of diacylglycerol and triacylglycerol oils during deep-frying, Journal of the American Oil Chemists' Society ,81, 571–576, 2004.

SILVA, F., BORGES, M. F., FERREIRA, M. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22, 94 – 104, 1999.

SILVA, M. M., MEDEIROS, V. C.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. Synthesis of monocaprin catalyzed by lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 757 – 768, 2007.

SILVA, N. L. Outubro de 2009. Comunicação pessoal.

SILVA, N. L., WOLF-MACIEL, M. R.; BATISTELLA, B. C.; MACIEL FILHO, R. Optimization of biodiesel production from castor oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 405 – 414, 2006.

SILVA, R. C.; GIOIELLI, L. A. Lipídios estruturados: alternativa para a produção de sucedâneos da gordura do leite humano. *Química Nova*, 32, 1253 – 1261, 2009.

SISAK, C.; CSANADI, Z.; RONAY, E.; SZAJANI, B. Elimination of glucose in egg white using immobilized glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1002 – 1007, 2006.

SONNTAG, N. O. V., Glycerolysis of Fats and Methyl-Esters – Status, Reviewed and Critique, *Journal of the American Oil Chemists Society* 59, 795-802, 1982.

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making, Review. *Food Chemistry*, 52, 4, 353-360, 1995.

STRAATHOF, A. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 548–556, 2002.

TAGUCHI, H.; NAGAO, T.; WATANABE, H.; ONIZAWA, K.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3-diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol. *Lipids*, 36, 379-82, 2001.

THANIKAIVELAN, P.; RAO, J.; NAIR, B. U.; RAMASANI, T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends in Biotechnology* 22, 181 – 188, 2004.

TRIVEDI, R.; SINGH, R. P. Modifications of oils and fats to produce structured lipids. *Journal of oil science*, 54, 423 – 430, 2005.

THOMPSON, A. C.; DELAQUIS, P. J. ; MAZZA. G. Detection and Measurement of Microbial Lipase Activity: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 165 – 187, 1999.

UIC-GmbH (1998). Production of High Concentrated Monoglyceride. Disponível em http://www.uic-gmbh.de/ger/pfd_global/druckschriften/08%20Monoglyceride-e.pdf. Acesso em 22 de Janeiro de 2009.

XU, X., JACOBSEN, C., NIELSEN, N. S., HEINRICH, M. T., ZHOU, D., Purification and Deodorization of Structured Lipids by Short Path Distillation, *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 745-755, 2002.

YANAGISAWA ,Y., KAWABATA, T., TANAKA, O., KAWAKAMI, M., HASEGAWA, K., KAGAWA, Y., Improvement in blood lipid levels by dietary sn-1,3-diacylglycerol in young women with variants of lipid transporters 54T-FABP2 and -493g-MTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302, 743–750, 2003.

YAMAMOTO, K., TAKESHITA, M., TOKIMITSU, I., WATANABE, H., MIZUNO, T., ASAKAWA, H., TOKUNAGA, K., TATSUMI, T., OKAZAKI, M., YAGI, N.

Diacylglycerol oil ingestion in type 2 diabetic patients with hypertriglyceridemia. *Nutrition* 22, 23–29, 2006.

YANG, T., REBSDORF, M., ENGELRUD, U., XU, X. Enzymatic Production of Monoacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids through an efficient glycerolysis system *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1475 – 1481, 2005.

YASUNAGA, K., GLINSMANN, W.H., SEO, Y., KATSURAGI, Y., KOBAYASHI, S., FLICKINGER, B., KENNEDY, E., YASUKAWA, T., BORZELLECA, J. Safety aspects regarding the consumption of high-dose dietary diacylglycerol oil in men and women in a double-blind controlled trial in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1419–1429, 2004.

WANG, K.; HAWLEY, M. C.; DEATHOS, S. J. Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol via Selective Dehydroxylation, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 42, 2913-2923, 2003.

WANG, L.; DU, W.; LIU, D.; LI, L.; DAI, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29 – 32, 2006.