

UNIOESTE – UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO "STRICTO SENSU" EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL MESTRADO

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA:
EFEITOS DO USO DE ULTRASSOM NA TAXA DA REAÇÃO**

THIAGO OLINEK REINEHR

TOLEDO
NOVEMBRO, 2015

THIAGO OLINEK REINEHR

**ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA:
EFEITOS DO USO DE ULTRASSOM NA TAXA DA REAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Camila da Silva

TOLEDO
NOVEMBRO, 2015

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

R366e Reinehr, Thiago Olinek
Estudo da hidrólise enzimática do óleo de soja : efeitos do uso
de ultrassom na taxa da reação / Thiago Olinek Reinehr. -- Toledo,
PR : [s. n.], 2015.
xiv; 82 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva
Coorientadora: Profª. Dra. Camila da Silva
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade
Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de
Engenharias e Ciências Exatas.

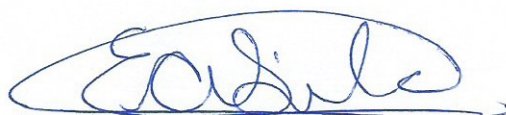
1. Engenharia química - Dissertações 2. Tecnologia industrial -
Óleos e gorduras 3. Hidrólise enzimática 4. Hidrólise - Óleo de soja
5. Ácidos graxos 6. Ultrassom 7. Modelagem matemática I. Silva,
Edson Antônio da, orient. II. Silva, Camila da, coorient. III. T.

CDD 20. ed. 660.634
665.3

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Thiago Olinek Reinehr a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 16 de novembro de 2015

COMISSÃO JULGADORA



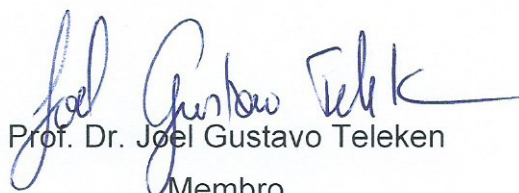
Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Orientador



Dr. Fabiano Bisinella Scheufele

Membro



Prof. Dr. Joel Gustavo Teleken

Membro

Agradecimentos

Gostaria de agradecer profundamente a algumas pessoas que estiveram comigo ao longo da realização deste trabalho...

primeiramente à minha esposa Cynthia, pela compreensão e companheirismo neste período;

ao meu orientador Edson, pela confiança e conhecimento;

a minha coorientadora Camila da Silva, pelas revisões e correções de artigos;

ao meu coorientador de coração e parceiro de laboratório Jamal, pois sem ele este trabalho não existiria;

ao Gallo, por não ter feito nada além do que a obrigação dele;

a toda minha família, que fez parte dos melhores momentos de minha vida;

ao meu melhor amigo Eduardo, que pode não ter entendido, mas estava incluso no agradecimento acima (e pelas incontáveis titulações);

ao clube do bolinha, por serem limdos;

a turma do LPS, por terem feito os momentos de laboratório não parecerem com momentos de laboratório;

aos membros da banca de qualificação, pela leitura cuidadosa e valiosas contribuições;

aos professores de minha vida, que de forma discreta definiram o rumo dela;

a LNF Latino americana, pelas enzimas cedidas;

à CAPES, pelo auxílio financeiro.

"Busquem conhecimento"

– ET Bilú

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Símbolos	xii
1 Introdução	16
2 Objetivos	19
3 Revisão Bibliográfica	20
3.1 Óleos e Gorduras	20
3.2 Ácidos Graxos	21
3.2.1 Produção de Ácidos Graxos Livres (AGL)	24
3.3 Glicerol	24
3.4 Acilgliceróis ou Glicerídeos	25
3.4.1 Triacilglicerol ou Triglicerídeo (TAG)	25
3.4.2 Diacilglicerol ou Diglicerídeo (DAG)	26
3.4.3 Monoacilglicerol ou Monoglicerídeo (MAG)	28
3.5 Reações de Modificação de Óleos e Gorduras	28
3.5.1 Esterificação	29
3.5.2 Glicerólise	30
3.5.3 Hidrólise	30
3.6 Catálise Enzimática	32
3.6.1 Lipases	33
3.7 Reação de Hidrólise Enzimática	35
3.7.1 Limitações da Hidrólise Enzimática	39
3.8 Irradiação por Ultrassom	40
3.8.1 Ultrassom em Reações de Hidrólise Enzimática	42
3.9 Modelagem Matemática	43
3.10 Considerações da Revisão	44
4 Materiais e Métodos	46

4.1	Materiais	46
4.2	Equipamentos	46
4.3	Métodos Experimentais	47
4.3.1	Efeito da Inibição Pelo Substrato	47
4.3.2	Experimentos Cinéticos Para Reações de Hidrólise	48
4.3.3	Efeito da Concentração de Surfactante	48
4.3.4	Efeito do Tempo de Pré-emulsão	49
4.3.5	Efeito da Concentração de Enzima	49
4.3.6	Modelagem Cinética	49
4.3.7	Estimativa dos Parâmetros Cinéticos	53
4.4	Métodos Analíticos	53
4.4.1	Quantificação do Teor Ácidos Graxos Livres (Acidez)	53
4.4.2	Cálculo da Velocidade Inicial Média da Reação de Hidrólise (Taxa Média Inicial)	55
5	 Resultados e Discussões	56
5.1	Inibição pelo Substrato	56
5.2	Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática	56
5.3	Efeitos da Concentração de Surfactante	61
5.4	Efeitos do Tempo de Pré-emulsificação	63
5.5	Efeitos da Concentração de Lipase	64
5.6	Modelagem Matemática	66
6	 Conclusão	71
7	 Sugestões para Trabalhos Futuros	72
	 Referências	73

Lista de Figuras

Figura 3.2.1	Exemplo de ácido graxo com 18 carbonos.	21
Figura 3.2.2	Exemplo de ácido graxos saturado (esquerda) e poli-insaturado (direita).	22
Figura 3.2.3	Exemplo de isomerias <i>trans</i> (esquerda) e <i>cis</i> (direita).	22
Figura 3.2.4	Exemplo de nomenclatura para Ácidos Graxos: “20:3 9c12t15c”.	22
Figura 3.3.1	Molécula de Glicerol.	24
Figura 3.4.1	Exemplo de molécula de Triacilglicerol (TAG)	26
Figura 3.4.2	Exemplo de isômeros de Diacilglicerol (DAG).	27
Figura 3.4.3	Exemplo de isômeros de Monoacilglicerol (MAG).	29
Figura 3.5.1	Exemplo de reação de esterificação.	29
Figura 3.5.2	Exemplo de reação de transesterificação.	29
Figura 3.5.3	Exemplo de reação de glicerólise.	30
Figura 3.5.4	Exemplo de reação de hidrólise de óleos e gorduras.	31
Figura 3.5.5	Exemplo de reação de Hidrólise reversível de Óleos e Gorduras.	31
Figura 3.7.1	Estrutura molecular de uma lipase (Reproduzido de Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999)).	36
Figura 3.7.2	Efeito da inibição pelo substrato demonstrado por Gatt e Bartfai (1977) (Reprodução).	40
Figura 5.1.1	Efeito da inibição pelo substrato - Taxa inicial de hidrólise em função da fração molar de óleo no meio reacional, e modelo Ping-pong Bi-bi para inibição enzimática.	57
Figura 5.2.1	Experimento cinético até 600 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom. Fração mássica de óleo de 7,0%; 2% de carga enzimática; 40 °C.	58
Figura 5.2.2	Experimento cinético até 45 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom	59

Figura 5.2.3	Experimento cinético entre os tempos 100 e 600 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom	60
Figura 5.3.1	Efeito da concentração de surfactante (Goma Arábica) na taxa inicial média da hidrólise enzimática do Óleo de Soja.	62
Figura 5.4.1	Efeito do tempo de pré-emulsificação com e sem utilização de surfactante (Goma Arábica) na taxa inicial média da hidrólise enzimática do Óleo de Soja.	63
Figura 5.5.1	Efeito do aumento da carga enzimática na hidrólise enzimática do óleo de Soja.	65
Figura 5.6.1	Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia controle; Apenas agitação mecânica.	68
Figura 5.6.2	Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com ultrassom de banho; Ultrassom de banho ligado durante todo período reacional com agitação mecânica.	69
Figura 5.6.3	Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com ultrassom de sonda; Ultrassom de sonda ligado durante todo período em reator encamisado.	69
Figura 5.6.4	Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com pré-emulsão no ultrassom de sonda; Pré-emulsão no ultrassom de sonda e agitação mecânica durante a reação. . .	70

Lista de Tabelas

Tabela 3.2.1 Principais ácidos graxos presentes em óleos vegetais.	23
Tabela 3.2.2 Ponto de fusão de alguns ácidos graxos.	23
Tabela 3.4.1 Composição de TAG em alguns óleos comestíveis	26
Tabela 3.6.1 Atividade de lipases provenientes de alguns microrganismos (SCH- MID; VERGER, 1998).	34
Tabela 3.6.2 Algumas indústrias e aplicações de lipases.	34
Tabela 3.7.1 Alguns exemplos de aplicação e condições operacionais da hi- drólise enzimática parcial de óleos e gorduras.	37
Tabela 3.7.2 Alguns exemplos de aplicação e condições operacionais da hi- drólise enzimática total de óleos e gorduras.	38
Tabela 4.4.1 Composição do Óleo de Soja	54
Tabela 5.1.1 Parâmetros e coeficiente de correlação do modelo Ping-pong Bi-bi.	56
Tabela 5.6.1 Resultados obtidos pela otimização dos parâmetros do modelo proposto e da simulação dos resultados.	66

Lista de Símbolos

Nomenclatura

$\%m_i$	Fração mássica do composto i
C_i	Concentração do composto i (mol m^{-3})
k_j	Constante cinética da reação j (min^{-1})
K_i	Constante cinética de inibição enzimática do modelo Ping-pong Bi-bi (mol L^{-1})
Km_j	Constante de Michaelis-Menten para o substrato j do modelo Ping-pong Bi-bi (mol L^{-1})
m_i	massa do composto i (kg)
PM_i	Peso molecular do composto i (kg mol^{-1})
\bar{r}_i	Velocidade média de reação (Taxa média de reação) do componente i ($\text{mmol min}^{-1} \text{m}^{-3}$)
r_{max}	Parâmetro do modelo Ping-pong Bi-bi; velocidade máxima de reação ($\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$)
t	Tempo (min)
V_j	Volume da solução de j (m^3)

Símbolos Gregos

ρ_i	Densidade do composto i (kg m^{-3})
----------	--

Acrônimos

<i>AGL</i>	Ácido(s) Graxo(s) Livre(s)
<i>ENZ</i>	Enzima
<i>GLI</i>	Glicerol
<i>H₂O</i>	Água
<i>OIL</i>	Óleo de Soja
<i>TAG</i>	Triacilglicerol ou Triacilgliceróis
<i>DAG</i>	Diacilglicerol ou Diacilgliceróis
<i>MAG</i>	Monoacilglicerol ou Monoacilgliceróis

Subscritos e Sobrescritos

amostra Representa uma coleta de resultado.

inicial Representa a variável antes da reação.

Resumo

A hidrólise enzimática é um importante processo industrial para modificação de óleos e gorduras. Os produtos obtidos através dessa reação são ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol, que são usados como matérias-primas de uma grande variedade de aplicações industriais. As principais limitações da hidrólise enzimática de óleos e gorduras são a imiscibilidade dos reagentes e o efeito de inibição causado pelo aumento da concentração de substrato. O uso de ultrassom tem se apresentado como um recurso poderoso em processos de substratos imiscíveis. Este trabalho teve objetivo de avaliar diferentes metodologias de aplicação de irradiação ultrassônica na hidrólise enzimática do óleo de soja. Foram realizadas cinéticas utilizando ultrassom de banho, ultrassom de sonda, pré-emulsão com ultrassom de sonda e sem ultrassom. Também foram investigados os efeitos da inibição pelo substrato, concentração de surfactante (goma arábica), da carga enzimática e do tempo de pré-emulsão. Simulações matemáticas do processo também foram realizadas. A inibição pelo substrato foi evidente a partir da fração molar de 2,5% de óleo no meio reacional. A concentração de surfactante que forneceu maiores taxas foi de 10 g L^{-1} . A carga enzimática apresentou uma fração de saturação em 2,0% de massa em relação a massa de água, apenas para a reação livre de ultrassom, indicando o aumento de área interfacial quando os substratos foram expostos ao ultrassom. Até mesmo os menores tempos de pré-emulsão foram significativos na taxa inicial de hidrólise. Os experimentos cinéticos expostos a irradiação ultrassônica por todo período reacional apresentaram evidências de desativação enzimática expressiva. A metodologia que empregou pré-emulsão com ultrassom de sonda apresentou melhores resultados para a taxa de reação sem indícios de desativação enzimática. As simulações matemáticas da hidrólise foram concordantes com as evidências experimentais.

Palavras-chaves: Hidrólise enzimática, ácidos graxos livres, óleo de soja, ultrassom, modelagem matemática.

Abstract

Enzymatic hydrolysis is an important industrial process used to alter oils and fats. Products obtained by this reaction are free fatty acids, monoacylglycerols, diacylglycerols and glycerol, which are used as raw materials for a wide variety of industrial applications. The main limitations of the enzymatic hydrolysis of oils and fats are the immiscibility of the reactants and the inhibition effect caused by increased substrate concentration. The use of ultrasound has emerged as a powerful resource in immiscible substrates processes. The objective of this study was to evaluate different application methods of ultrasonic irradiation on the enzymatic hydrolysis of soybean oil. Kinetics were performed using ultrasound bath, ultrasound probe, and pre-emulsion with and without ultrasound probe ultrasound. The effects of substrate inhibition, surfactant concentration (gum arabic), enzyme load and time pre-emulsion were also investigated. Mathematical simulations of the process were also performed. The substrate inhibition was evident from the mole fraction of 2.5 % oil in the reaction medium. The surfactant concentration that provided higher rates was 10 mg L^{-1} . The enzyme loading showed a fraction of saturation at 2.0 % by mass, relative to the mass of water, only for the ultrasound-free reaction, indicating the increase in interfacial area where the substrates were exposed to ultrasound. Even the smallest pre-emulsion times were significant in the initial rate of hydrolysis. Kinetic experiments exposed to ultrasonic irradiation throughout the reaction period showed evidence of significant enzymatic deactivation. The methodology that uses pre-emulsion with probe ultrasound showed better results for the rate of reaction with no evidence of enzyme deactivation. Hydrolysis mathematical simulations were in agreement with the experimental evidence.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, free fatty acids, soybean oil, ultrasound, mathematical modeling.

1 Introdução

Óleos e gorduras são fundamentais na alimentação humana, pois além de serem fonte energética, agem como solventes de vitaminas lipossolúveis e são fontes de ácidos graxos essenciais. Atualmente inúmeros produtos obtidos através de modificações desses compostos apresentam valor agregado na indústria alimentícia e farmacêutica (CASTRO et al., 2004).

Óleos e gorduras são misturas complexas de vários lipídeos, entretanto, os acilgliceróis e os ácidos graxos livres (AGL) representam a maior fração de sua composição (SANTOS, 2011). Acilgliceróis podem ser divididos em três grandes grupos, que fazem referência a quantidade de esterificações que uma molécula de glicerol sofreu por ácidos graxos: triacilgliceróis ou triglicerídeos (TAG), diacilgliceróis ou diglicerídeos (DAG) e monoacilgliceróis ou monoglicerídeos (MAG) (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002). Dentre esses subgrupos, o maior constituinte dos óleos comestíveis são os triacilgliceróis (TAG), que se apresentam em quantidades maiores que 85% em massa (YANAI et al., 2007). O DAG, além de ser encontrado em baixas quantidades nos óleos vegetais (normalmente abaixo de 5% em massa), também ocorre como um intermediário do metabolismo do TAG no intestino delgado (RUDKOWSKA et al., 2005).

Um crescente interesse no desenvolvimento de tecnologias de modificação de óleos e gorduras tem surgido recentemente. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (CASTRO et al., 2004). Entre as principais reações de modificação de óleos estão a esterificação, a glicerólise e a hidrólise.

A hidrólise é um importante processo industrial para modificação de óleos e gorduras. Os produtos obtidos através dessa reação são ácidos graxos livres (AGL), monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e glicerol, que são usados como matérias primas de uma grande variedade de aplicações industriais. Os AGL's são a base da produção de compostos oleoquímicos como álcoois graxos, amins graxas e ésteres graxos (NOOR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003) e biodiesel (MINAMI; SAKA, 2006; LEVINE; PINNARAT; SAVAGE, 2010). Enquanto que, o MAG e DAG são importantes emulsificantes nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (ROSU et al., 1997; ZHONG et al., 2013). Além disso, o DAG tem se apresentado como um óleo funcional capaz de combater a obesidade (MURASE et al., 2001; NAGAO et al., 2000).

A maior parte dos produtos provenientes da hidrólise são voltados para as indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas; portanto, esses produtos necessitam de um alto grau de pureza, comumente atingida utilizando enzimas como catalisadores da reação. Além disso, as enzimas necessitam de condições reacionais mais brandas se comparadas com catalisadores químicos. No entanto, sua alta especificidade e baixa temperatura de atuação, requerem tempos reacionais mais elevados para atingir o equilíbrio (RATHOD; PANDIT, 2009).

A principal limitação na hidrólise enzimática de óleos e gorduras é a imiscibilidade dos substratos da reação, o que resulta em diminutas taxas de transferência de massa e, conseqüentemente, menores velocidades de reação (ZHONG et al., 2013). O uso de ultrassom tem se apresentado como um recurso poderoso em processos enzimáticos e biológicos, principalmente no caso de substratos imiscíveis e viscosos (LÖNING; HORST; HOFFMANN, 2002).

O sucesso no uso de ultrassom é resultante do colapso cavitacional, que produz condições locais extremas. Quando bolhas de cavitação colapsam próximo de dois fluídos imiscíveis, a onda de choque resultante promove uma agitação/mistura muito eficiente nas fases (BABICZ et al., 2010). Porém, na medida em que o cisalhamento entre as fases oriundo as ondas ultrassônicas aumenta, isso causa um

efeito negativos sobre as lipases no meio reacional, provocando a desativação enzimática e diminuindo a velocidade da reação de hidrólise (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000). Este efeito pode ser evitado se a reação for realizada em duas etapas: uma de pré-emulsão, na qual os substratos serão emulsificados por ultrassom sem a presença de enzimas, sendo que esta etapa pode ser acrescentado surfactantes para estabilizar a emulsão, seguido da etapa de reação, em que a enzima será adicionada com o ultrassom já desligado (AWADALLAK et al., 2013).

Outro problema presente na reação de hidrólise de óleos é a inibição causada pelo substrato quando a razão entre óleo:água é maior que 3:5 ($v_{OIL} : v_{H_2O}$). A baixa miscibilidade das fases resulta em um efeito cinético desviante da teoria de Michaelis-Menten, e vários outros modelos são propostos para tentar explicar o efeito (GATT; BARTFAI, 1977), porém, nenhum deles considera o comportamento da emulsão quando a razão óleo:água está próxima da inversão de fases, ou seja, quando a fase contínua da emulsão muda entre os dois componentes.

Há poucos estudos na literatura avaliando a utilização de ultrassom na hidrólise enzimática de óleos vegetais (LERIN et al., 2014), e a maioria desses estudos relatam o uso de ultrassom de banho (FEITEN et al., 2014; HUANG et al., 2010; LIU et al., 2008; RAMACHANDRAN et al., 2006; RIBEIRO; PASSAROTO; BRENELLI, 2001). Além disso, muitos estudos utilizam enzimas 1,3-específicas na hidrólise de óleos como catalisador (CHEW et al., 2008; FEITEN et al., 2014; WANG et al., 2009; WATANABE et al., 2005). Portanto, é importante conhecer os efeitos do uso de ultrassom neste tipo de enzima. A enzima selecionada para este trabalho foi a lipase comercial 1,3-seletiva Lecitase Ultra.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos de diferentes metodologias de aplicação de ultrassom na taxa de reação da hidrólise enzimática: ultrassom de banho, ultrassom de sonda, pré emulsão com ultrassom de sonda e agitação mecânica convencional. Além disso, outros objetivos específicos foram avaliados:

- Avaliação da inibição pelo substrato na reação de hidrólise enzimática.
- Efeito da concentração de surfactante na taxa da reação de hidrólise enzimática.
- Efeito da carga enzimática na taxa da reação de hidrólise enzimática.
- Efeito do tempo de pré-emulsão na taxa da reação de hidrólise enzimática.
- Realizar a modelagem matemática dos experimentos cinéticos.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Óleos e Gorduras

Lipídeos são substâncias formadas por cadeias carbônicas longas, insolúveis e menos densas que água. São solúveis em solventes orgânicos (GIOIELLI, 1996), e são encontrados em todas as plantas e animais que servem de alimento para os seres humanos (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002). Óleos e gorduras compreendem uma classificação dos lipídeos quanto aos seu estado físico em temperatura ambiente, sendo que o regulamento técnico para óleos vegetais define 25 °C como ponto de fusão de gorduras, ou seja, lipídeos que são líquidos acima dessa temperatura são chamados de Óleos enquanto os sólidos ou pastosos são chamados de Gorduras (ANVISA, 2005). Além disso, óleos e gorduras exercem uma ampla gama de funções no organismo humano, como por exemplo (GIOIELLI, 1996):

- Armazenagem de energia;
- Componentes estruturais em membranas celulares;
- Precursores de hormônios e ácidos biliares;
- Fonte energética (aproximadamente 9 kcal g⁻¹);
- Fonte de ácidos graxos essenciais (que não são produzidos pelo organismo);
- Agem como lubrificantes.

Entre os principais componentes dos óleos vegetais comestíveis estão os acilgliceróis e os ácidos graxos livres (AGL) (SANTOS, 2011). Os acilgliceróis são divididos em três grupos, que fazem referência a quantidade de esterificações que uma molécula de glicerol sofreu por ácidos graxos: triacilgliceróis ou triglicerídeos

(TAG), diacilgliceróis ou diglicerídeos (DAG) e monoacilgliceróis ou monoglicerídeos (MAG) (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002). O maior constituinte dos óleos comestíveis entre estes subgrupos são os triacilgliceróis (TAG), que se apresentam em quantidades maiores que 85% em massa (YANAI et al., 2007).

3.2 Ácidos Graxos

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeias longas. São os principais componentes estruturais dos óleos e gorduras e responsáveis por determinar as propriedades físicas dos mesmos, tais como estabilidade, ponto de fusão e características metabólicas (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002).

Simplificadamente, os ácidos graxos mais comuns podem ser classificados a partir de 3 propriedades de sua estruturas (SCRIMGEOUR, 2005):

- **Quantidades de carbonos** presentes na estrutura da cadeia carbônica: tendo entre 4 e 22 carbonos, sendo os mais comuns com 18 (Figura 3.2.1), e por compartilharem da mesma biossíntese na natureza, as cadeias carbônicas são construídas em unidades de dois carbonos, desta forma, a maioria dessas moléculas possuem quantidades pares de carbono em sua estrutura.

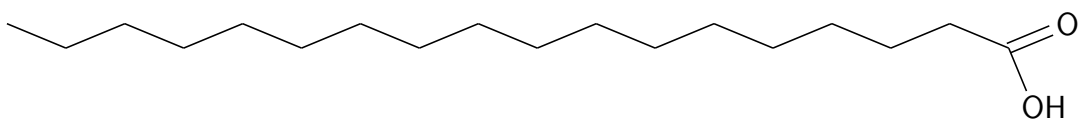


Figura 3.2.1 – Exemplo de ácido graxo com 18 carbonos.

- **Quantidade de duplas ligações** entre os carbonos de sua estrutura: podendo não possuir duplas ligações (saturados), possuir uma dupla ligação (insaturados) ou possuir mais de uma dupla ligação (poli-insaturados). Um exemplo deste tipo de classificação está representado na Figura 3.2.2.

- Pelo tipo de **isomeria de suas duplas ligações**: *cis*, quando os átomos de hidrogênio se encontram no mesmo lado dos carbonos de uma mesma dupla

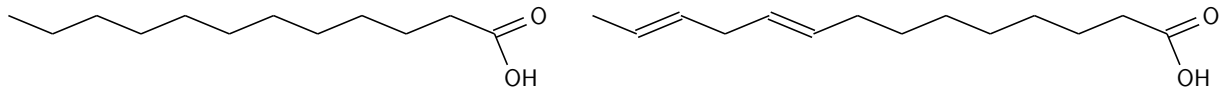


Figura 3.2.2 – Exemplo de ácido graxos saturado (esquerda) e poli-insaturado (direita).

ligação, ou *trans*, quando os átomos de hidrogênio se encontram em lados opostos (Figura 3.2.3).

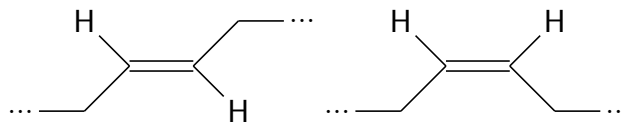


Figura 3.2.3 – Exemplo de isomerias *trans* (esquerda) e *cis* (direita).

Além das normas de nomenclatura da IUPAC, os ácidos graxos podem ser facilmente nomeados de acordo com as três propriedades apresentadas (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002). O primeiro passo da nomenclatura é informar a quantidade de carbonos na cadeia carbônica seguido pelo número de duplas ligações após um “dois pontos”, por exemplo, um ácido graxo com 18 carbonos e 2 duplas ligações pode ser chamado de “18:2”. No entanto, uma nomenclatura mais rigorosa também pode levar em conta a posição que se encontram as duplas ligações e o tipo de isomeria delas. Exemplificando, o ácido graxo apresentado na Figura 3.2.4 possui 20 carbonos e 3 duplas ligações, além disso, contando a partir da carboxila da molécula (função que caracteriza o ácido carboxílico) essas duplas ligações se encontram nos carbonos de posições 9, 12 e 15, sendo a primeira delas (9) uma isomeria *cis*, a segunda uma isomeria *trans* e a terceira uma isomeria *cis* novamente, portando, o ácido graxo apresentado pode ser chamado de “20:3 9c12t15c”.

Vale lembrar que os ácidos graxos mais comuns são conhecidos por seus nomes usuais, que costumam fazer referência a sua fonte mais comum, pois existem sete ácidos graxos que estão presentes em aproximadamente 95% de todos os óleos vegetais, que são os ácidos láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e α -linolénico (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002). A Tabela 3.2.1 apresenta

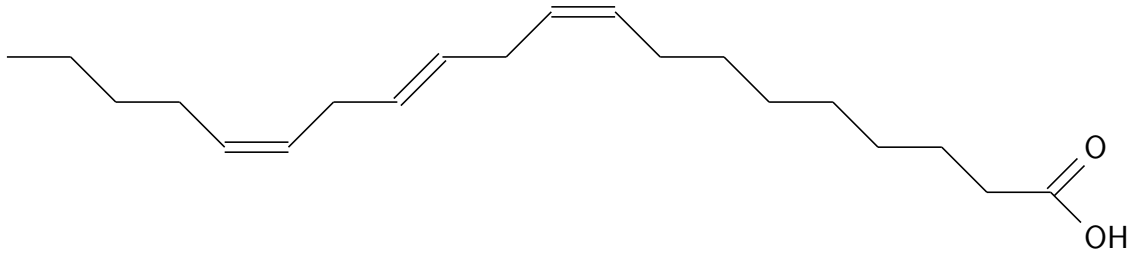


Figura 3.2.4 – Exemplo de nomenclatura para Ácidos Graxos: “20:3 9c12t15c”.

esses principais ácidos graxos e suas principais fontes.

Tabela 3.2.1 – Principais ácidos graxos presentes em óleos vegetais.

Nome Usual	Nomenclatura	Fórmula	Principal Fonte
Láurico	12:0	$C_{12}H_{24}O_2$	Óleo de Coco
Mirístico	14:0	$C_{14}H_{28}O_2$	Noz-Moscada
Palmítico	16:0	$C_{16}H_{32}O_2$	Óleo de Palma
Estearíco	18:0	$C_{18}H_{36}O_2$	Gorduras Animais
Oleico	18:1 9c	$C_{18}H_{34}O_2$	Óleo de Oliva
Linoleico	18:2 9c12c	$C_{18}H_{32}O_2$	Óleo de Canola
α -Linolénico	18:3 9c12c15c	$C_{18}H_{30}O_2$	Semente de Linhaça

Ácidos graxos podem ser encontrados em óleos e gorduras em sua forma livre, chamados de ácidos graxos livres (AGL), e conferem a qualidade de acidez aos óleos (massa de AGL por massa total de óleo), ou encontrados esterificados em moléculas de glicerol, chamados de acilgliceróis.

As propriedades físicas dos ácidos graxos podem ser estimadas em função de suas estruturas, por exemplo, ácidos graxos saturados ou insaturados de isomeria *trans* possuem cadeias carbônicas mais lineares, o que lhes conferem um ponto de fusão maior, além de maior estabilidade termodinâmica, que os ácidos graxos insaturados de isomeria *cis*. Conseqüentemente, as propriedades físicas dos acilgliceróis estão intimamente relacionadas as propriedades dos ácidos graxos que os compõem. A Tabela 3.2.2 apresenta alguns exemplos de ponto de fusão de alguns ácidos graxos (SCRIMGEOUR, 2005).

Tabela 3.2.2 – Ponto de fusão de alguns ácidos graxos.

Nome Usual	Nomenclatura	Ponto de fusão (°C)
Palmítico	16:0	62,9
Estearico	18:0	70,1
Oleico	18:1 9c	16,3
-	18:1 9t	45,0
Linoleico	18:2 9c12c	-5,0
-	18:2 9t12t	29,0

3.2.1 Produção de Ácidos Graxos Livres (AGL)

Industrialmente, a produção de AGL é realizada por meio da hidrólise de óleos vegetais. O processo consiste na conversão de óleos vegetais em AGL e glicerol em temperatura de 250 °C e pressão de 50 bar por 2 h, o que confere conversões entre 96-99%. Sob estas condições, também ocorrem reações de polimerização de AGL e formação de sub-produtos indesejados, o que confere cor escura e baixa pureza ao produto final. Além disso, a reação e os processos de purificação subsequentes necessitam de muita energia, o que encarece o produto (NOOR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003).

3.3 Glicerol

O glicerol, comercialmente conhecido como glicerina, é uma molécula que pertence a família dos álcoois, possuindo 3 hidroxilas (grupo funcional "-OH", veja a Figura 3.3.1), com isso, pode participar de reações de esterificação com ácidos carboxílicos para formação de ésteres e reações de substituição de radical com ésteres, como ocorre na alcoólise (conhecida como glicerólise quando envolve o glicerol) (RUSSELL, 1981).

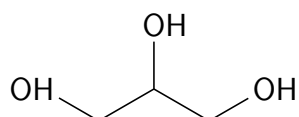


Figura 3.3.1 – Molécula de Glicerol.

A molécula de glicerol é insolúvel em óleos, porém, na natureza é encontrada em abundância nos óleos e gorduras ligado a moléculas de ácidos graxos formando

Acilgliceróis (COLLINS, 1997), por conta disso é um dos principais subprodutos de reações com acilgliceróis, como por exemplo a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (MUNIYAPPA; BRAMMER; NOUREDDINI, 1996).

Recentemente, o governo brasileiro vem estimulando o uso de biodiesel com leis que determinam a sua porcentagem no diesel comum, conseqüentemente, isso têm estimulado sua produção em território nacional (OSAKI; BATALHA, 2011). Uma das rotas de fabricação de biodiesel conhecida como hidroesterificação tem a hidrólise de óleos como reação intermediária, e tem se mostrado muito eficiente pela facilidade de separação e purificação do glicerol que sai do meio reacional junto com a fase aquosa (MACHADO et al., 2015; AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011).

3.4 Acilgliceróis ou Glicerídeos

Acilgliceróis são moléculas formadas pela esterificação entre ácidos graxos e glicerol. Como o glicerol possui 3 hidroxilas, então é possível que ocorra até 3 esterificações por ácidos graxos (chamados de grupos Acil), produzindo Monoacilgliceróis, Diacilgliceróis e Triacilgliceróis, que também são conhecidos como Mono-glicerídeos, Diglicerídeos e Triglicerídeos. Os Acilgliceróis constituem a forma mais comum de lipídeos encontrados em alimentos (SCRIMGEOUR, 2005).

3.4.1 Triacilglicerol ou Triglicerídeo (TAG)

Triacilgliceróis (TAG) são moléculas que possuem as três hidroxilas do glicerol substituídas por grupos Acil (ácido graxos) (SCRIMGEOUR, 2005). Eles representam a forma mais comum de armazenagem de energia por lipídeos na natureza (DAHLQVIST; STÅHL, 2000), e além de serem a principal forma que os ácidos graxos se encontram em organismos vivos (SIKORSKI; KOLAKOWSKA, 2002) são os maiores constituintes dos óleos vegetais, apresentando frações superiores a 85% em massa (YANAI et al., 2007).

Como as moléculas de TAG possuem três substituições acil, pelo fato de existir uma ampla variedade de ácidos graxos na natureza, são muitas as formas que os TAG podem possuir. Uma forma simples de denominar os TAG é a partir das iniciais dos ácidos graxos triviais que o compõem seguindo a ordem das substituições acil (SCRIMGEOUR, 2005). A Tabela 3.4.1 demonstra exemplos dessa nomenclatura para alguns TAG em óleos comestíveis comuns juntamente com a fração mássica da molécula no óleo, e a Figura 3.4.1 apresenta um exemplo de molécula de TAG (OOS - Oleico, Oleico, Saturado).

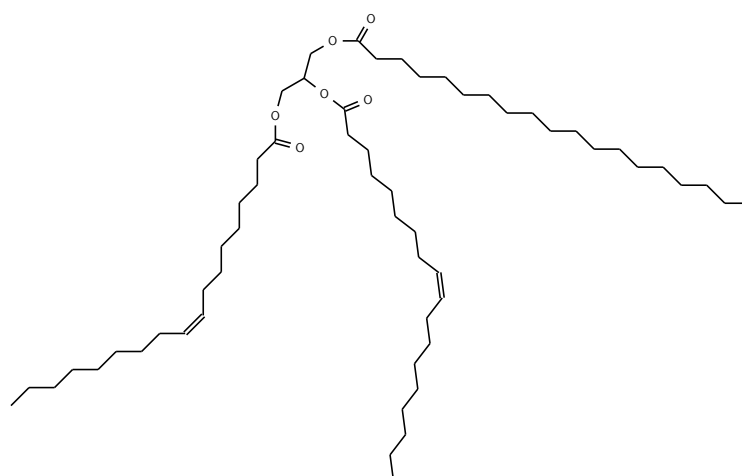


Figura 3.4.1 – Exemplo de molécula de Triacilglicerol (TAG)

Tabela 3.4.1 – Composição de TAG em alguns óleos comestíveis

Manteiga de Cacau		Banha de Porco		Óleo de Oliva		Óleo de Soja	
TAG	%massa	TAG	%massa	TAG	%massa	TAG	%massa
POP	18-23	PPSt	2	OOL	11	LnLL	7
POSt	26-41	StPSt	2	OOO	43	LnLO	5
StOSt	23-31	PPO	8	POP	3	LLL	15
		StOP	13	POL	4	LLO	16
		POO	5	POO	22	LLS	13
		StOO	6	StOO	5	LOO	8
		OPO	18			LOS	12
		StPL	2			OOS	5
		OOO	12				
		OPL	7				

L - Linoleico; Ln - Linolénico; O - Oleico; P - Palmítico; S – Saturado; St – Esteárico.
Adaptado de (SCRIMGEOUR, 2005)

3.4.2 Diacilglicerol ou Diglicerídeo (DAG)

Diacilgliceróis (DAG) são moléculas formadas por duas substituições de hidroxilas em uma molécula de glicerol por ácidos graxos (esterificações). Possui dois isômeros, o 1,3-DAG e o 1,2-DAG (ou 2,3-DAG). A Figura 3.4.2 ilustra exemplos desses isômeros. Assim como os outros acilgliceróis, suas propriedades físicas são intimamente relacionadas ao perfil de ácidos graxos que os compõem (AWADALLAK, 2012).

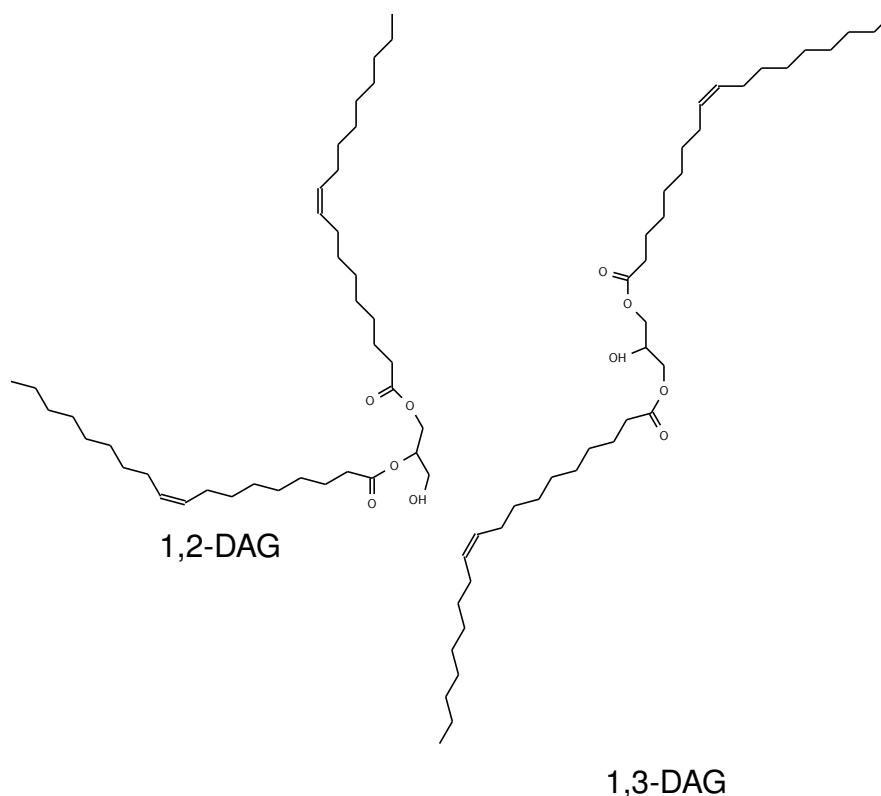


Figura 3.4.2 – Exemplo de isômeros de Diacilglicerol (DAG).

O DAG pode ser encontrado naturalmente em pequenas quantidades em óleos vegetais comuns (normalmente abaixo de 6% em massa), sendo que alguns óleos podem ter até 9,5% de sua composição em DAG, como é o caso do óleo de algodão. O óleo de soja, por sua vez, é composto 97,9% em TAG, e apresenta apenas 1% de DAG em sua composição (YANAI et al., 2007).

O diacilglicerol e o monoacilglicerol, por conta de suas hidroxilas restantes

na molécula de glicerol, possuem características anfífilas¹. Uma vez que suas características de sabor e cheiro são semelhantes ao TAG e que sua fabricação pode ser realizada de forma enzimática, são amplamente utilizados como emulsificantes não iônicos e estabilizantes nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (WATANABE et al., 2005).

Além disso, numa mistura de isômeros de DAG a proporção molar de equilíbrio entre 1,3-DAG e 1,2-DAG é de 7:3, respectivamente. A reação responsável por manter esse equilíbrio é a migração acil (SAMBANTHAMURTHI; SUNDRAM; TAN, 2000). Vários estudos mostram que o 1,3-DAG possui características metabólicas diferentes do TAG, e desta forma, dietas ricas em óleos vegetais ricos em diacilglicerol (80% em massa) possuem vantagens para a saúde em relação a dietas ricas em óleos compostos por TAG (NAGAO et al., 2000; MURASE et al., 2002; MAKI et al., 2002).

3.4.3 Monoacilglicerol ou Monoglicerídeo (MAG)

Monoacilgliceróis são acilgliceróis que possuem apenas uma substituição acil na molécula de glicerol, com isso, considerando o mesmo ácido graxo, essa molécula possui dois isômeros estruturais, 1-MAG e 2-MAG. A Figura 3.4.3 exemplifica dois isômeros desta molécula.

Assim como o TAG e o DAG, as moléculas de MAG também possuem suas características em função dos ácidos graxos que a compõem (WATANABE et al., 2005). Porém, assim como o DAG, o MAG possui uma característica comum independente do tipo de ácido graxo de sua estrutura, ou seja, são moléculas anfífilas por conta de suas hidroxilas em sua molécula, o que o torna um excelente emulsificante e estabilizante de alimentos e remédios que possuem o selo GRAS (i.e., *Geralmente Reconhecido como Seguro*, no português) pelo órgão que regula alimentos e remédios nos EUA (FDA - *Food and Drug Administration*) (JEN-

¹ Moléculas anfífilas, ou anfipáticas, são moléculas que possuem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos). Por conta disso, atuam como surfactantes e tensoativos.

SEN; HEIRD, 2002), ou seja, esse tipo de molécula não apresenta efeitos colaterais quando ingeridas, ao contrário de tensoativos iônicos (MACHADO et al., 2000). Além disso são estáveis tanto em meio ácido quanto em meio básico (BOYLE; GERMAN, 1996). Por esses motivos tanto MAG quanto DAG são moléculas de alto valor agregado, e processos que viabilizem sua produção e purificação devem continuar sendo estudados.



Figura 3.4.3 – Exemplo de isômeros de Monoacilglicerol (MAG).

3.5 Reações de Modificação de Óleos e Gorduras

Nos últimos anos tem surgido um crescente interesse em tecnologias de modificação de óleos e gorduras. Esta tendência pode ser atribuída principalmente ao fato desses materiais serem obtidos de fontes naturais e empregados como importantes matérias-primas para as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias. Mundialmente é estimada uma produção anual de óleos e gorduras de aproximadamente 100 milhões de toneladas (CASTRO et al., 2004).

Entre as principais reações de modificação de óleos estão a esterificação, a glicerólise e a hidrólise.

3.5.1 Esterificação

A esterificação é uma reação química em que um ácido carboxílico reage com um álcool formando éster e água. Uma outra variante desta reação é chamada de transesterificação, na qual um álcool reage com um éster (comumente um acilglicerol) substituindo seu radical formando outro éster e outro álcool. As Figuras 3.5.1 e 3.5.2 exemplificam ambas as reações citadas.



Figura 3.5.1 – Exemplo de reação de esterificação.



Figura 3.5.2 – Exemplo de reação de transesterificação.

A esterificação entre AGL e glicerol é amplamente utilizada na fabricação de MAG e DAG (BORNSCHEUER, 1995; PYO et al., 2012; BERRIOS et al., 2007; MONTEIRO; NASCIMENTO; NINOW, 2003), enquanto que a transesterificação entre o TAG presente em óleo vegetais e um álcool de cadeia curta é a principal rota de produção de biodiesel atualmente (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006).

3.5.2 Glicerólise

A glicerólise é a reação entre moléculas de acilgliceróis com o glicerol, formando novos acilgliceróis. Essa reação é utilizada para produção de MAG e DAG a partir de óleos vegetais (TAG), e tem a vantagem de não gerar água que precisaria ser removida durante o processo para aumentar o rendimento (FIAMETTI et al., 2012). A Figura 3.5.3 demonstra um exemplo de como essa reação ocorre.

3.5.3 Hidrólise

Hidrólise, do grego, *hidro* significa água e *lysis* significa separação, ou seja, consiste numa reação química de quebra molecular por moléculas de água. A

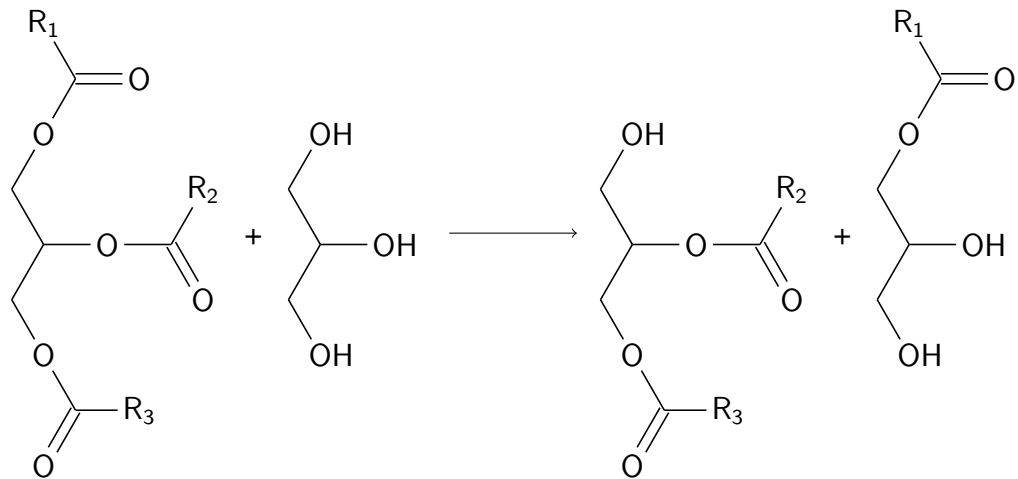


Figura 3.5.3 – Exemplo de reação de glicerólise.

Figura 3.5.4 ilustra um exemplo para um reação de hidrólise de uma molécula de TAG.

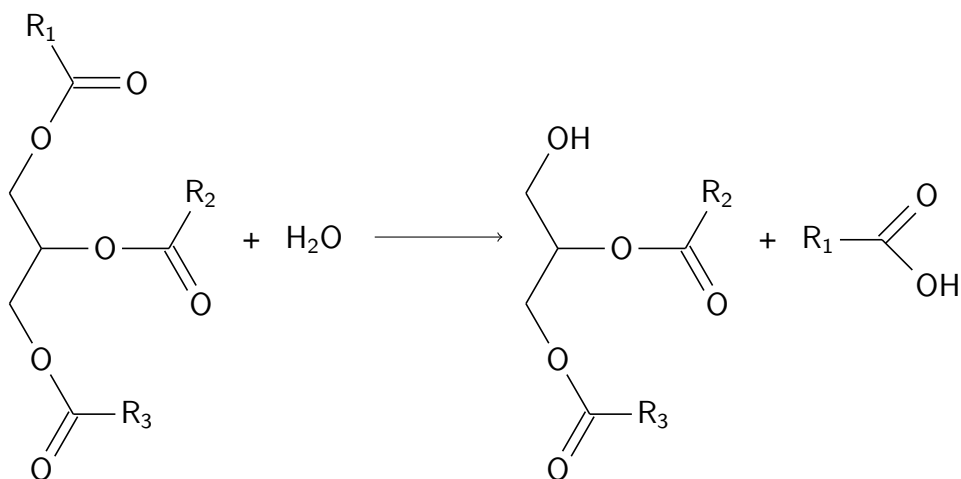


Figura 3.5.4 – Exemplo de reação de hidrólise de óleos e gorduras.

A reação de hidrólise de óleos e gordura é uma operação industrial importante. Essa reação consiste na quebra das ligações éster de acilgliceróis pela água, formando glicerol e ácidos graxos livres (AGL). Esses produtos são matérias-primas básicas para várias aplicações. Os AGL são utilizados como uma matéria-prima para a produção de óleos químicos, tais como os álcoois graxos, aminas graxas e ésteres graxos. Estes óleos químicos são utilizados como lubrificantes, agentes anti-bloqueio, plastificantes, agentes emulsionantes e como reagentes na fabricação de sabões, detergentes, e alimentos para animais (NOOR; HASAN; RAMA-CHANDRAN, 2003).

A hidrólise pode ser feita de duas formas em óleos e gorduras, completa, na qual todas as ligações ésteres do TAG são quebradas para gerar AGL e glicerol, ou parcial, em que a reação é interrompida antes da quebra de todas as ligações ésteres, formando uma mistura de acilgliceróis compostas majoritariamente por compostos intermediários da reação, DAG e MAG. Diversos fatores definem se a reação hidrólise será completa ou parcial, como por exemplo o tempo de reação e a disponibilidade dos reagentes do sistema (AWADALLAK et al., 2013). Vale lembrar também que a reação de hidrólise de ésteres tem como reação inversa a esterificação, portanto, ambas as reações são reversíveis enquanto houver disponibilidade dos reagentes e produtos para que elas ocorram. A Figura 3.5.5 ilustra a hidrólise como uma reação reversível.

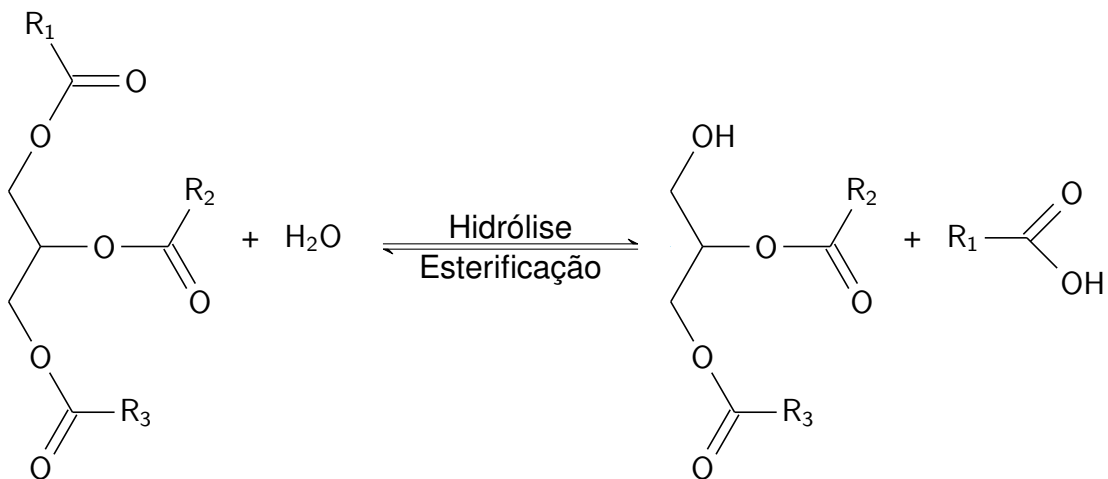


Figura 3.5.5 – Exemplo de reação de Hidrólise reversível de Óleos e Gorduras.

Ambas as reações são de extrema importância no estudo de modificação de óleos e gorduras. A hidrólise parcial é amplamente utilizada como rota de produção de DAG (PHUAH et al., 2012; MATOS; LEAL; SOUZA, 2011; WANG et al., 2010). A hidrólise completa de óleos e gorduras, por sua vez, é utilizada tanto para produção de AGL (TANAKA; HIRANO; FUNADA, 1992; CHU, 2002), quanto como rota intermediária para produção de biodiesel e DAG, seguido de uma posterior esterificação com álcool num processo conhecido como hidroesterificação (MACHADO et al., 2015; AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; WATANABE et al., 2003).

3.6 Catálise Enzimática

As enzimas são moléculas formadas por longas cadeias de aminoácidos (proteínas) que atuam como catalisadores para as reações que ocorrem nos sistemas biológicos. No geral, elas apresentam uma grande eficiência e especificidade. Além disso, as enzimas necessitam de condições brandas de temperatura, pH e pressão para catalisar reações. Poucos catalisadores sintéticos e inorgânicos possuem tais características (NELSON; COX, 2011).

Devido a sua alta especificidade, as enzimas minimizam a formação de produtos indesejados e, conseqüentemente, maximizam a produção dos produtos de interesse, o que torna a utilização de enzimas bastante interessante do ponto de vista industrial, pois os catalisadores inorgânicos como ácidos, bases, óxidos e metais geram uma grande variedade de subprodutos indesejáveis durante a reação (BON et al., 1999). Além disso, o aumento da preocupação com o meio ambiente, processo que apresenta maior economia de energia, menos etapas de separação e que utilizam matérias biodegradáveis tem se tornado cada vez mais atraente, o que tornam os catalisadores enzimáticos bons concorrentes aos catalisadores inorgânicos (AWADALLAK, 2012).

Devido ao fato das enzimas serem produzidas a partir de microrganismos e reações biológicas é difícil garantir um padrão de produção e especificação das mesmas, por conta disso, é comum lotes de enzimas comerciais expressarem sua carga enzimática em função de sua atividade. Segundo a Enzyme Commission: “uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima que catalisa a biotransformação de 1 micromol de substrato por minuto nas estabelecidas condições de ensaio”. A atividade específica de uma enzima comercial é dada em termos da atividade enzimática por miligramas de enzima (U/mg) (BERGMEYER, 1974).

No geral, a nomenclatura das enzimas se dá pela adição do sufixo “ase” ao nome do seu substrato ou a palavra ou frase que descreve sua atividade. Por

exemplo, a enzima DNA polimerase catalisa a polimerização dos nucleotídeos para formar o DNA e uma lipase é uma enzima que atua sobre moléculas de óleos e gorduras (NELSON; COX, 2011).

3.6.1 Lipases

O Comitê de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 2014) classifica as lipases como éster hidrolases (número de catálogo E.C. 3.1.1), que são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise de grupos ésteres em diversos compostos (BABICZ, 2009).

As lipases são encontradas na natureza em diversos organismos, e podem ser obtidas industrialmente a partir de microrganismos naturais ou geneticamente modificados e também a partir de fontes animais e vegetais (BABICZ, 2009). A principal forma de produção de lipases se dá através de culturas de microrganismos, pois é o processo que apresenta maior facilidade de controle e maior capacidade produtiva (ROSADO; MONTEIRO, 2001; YASUKAWA; KATSURAGI, 2004).

Na Tabela 3.6.1 são apresentados alguns microrganismos capazes de produzir lipases e as respectivas atividades médias possíveis de serem obtidas por meio de sua utilização. Todos os dados foram obtidos na temperatura de 37 °C e pH de 7,5.

Tabela 3.6.1 – Atividade de lipases provenientes de alguns microrganismos (SCHMID; VERGER, 1998).

Microrganismo fonte da lipase	Atividade enzimática (U mg⁻¹)
Rhizomucor miehei	16
Rhizopus spec.	32
Humicola lanuginosa	10
Candida rugosa I	11
Candida rugosa II	14
Geotrichum candidum	8
Pseudomonas fluorescens	30
Chromobacterium viscosum I	45
Chromobacterium viscosum II	154

Estereases e lipases tem a capacidade de ativar as ligações éster em óleos e

gorduras, porém, as lipases só catalisam reações se estiverem adsorvidas em uma interface água/óleo (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), pois elas possuem um elemento em sua estrutura chamado de “lid” que cobrem seus sítios ativos impedindo o contato com os substratos. Quando a enzima se encontra na interface água/óleo, esta estrutura se abre, expondo sua parte hidrofóbica e conferindo sua funcionalidade (BASTIDA et al., 1998).

As lipases atuam na ligação simples entre carbono e oxigênio presentes no ésteres, diminuindo sua energia de ligação e, conseqüentemente, tornando essa ligação reativa em condições operacionais amenas (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995). Com isso, reações de hidrólise e esterificação podem ocorrer em meio aquoso, e reações de transesterificação em meio alcoólico (REETZ, 2002).

Por conta disso, inúmeras indústrias vem procurando cada vez mais usos para lipases em seus processos. A Tabela 3.6.2 apresenta algumas aplicações industriais em que lipases vem adquirindo destaque nos últimos anos.

Tabela 3.6.2 – Algumas indústrias e aplicações de lipases.

Indústria	Aplicações
Farmacêutica	Síntese de intermediários de fármacos (ex.: ibuprofeno e naproxeno, fármacos com atividade anti-inflamatória); Resolução de misturas racêmicas (ex.: síntese de atenolol, fármaco anti-hipertensivo)
Alimentícia	Síntese de aromas (ex.: maturação de queijos); Síntese de edulcorantes (ex.: aspartame)
Produtos de limpeza	Remoção de manchas de gorduras dos tecidos
Agroquímica	Síntese de inseticidas e pesticidas
Tratamento de efluentes	Redução do teor de gorduras em efluentes da indústria de laticínios
Oleoquímica	Hidrólise e interesterificação de óleos e gorduras

Fonte: (KASAMATSU et al., 2005; CHENGELIS et al., 2006; BALCAO; PAIVA; MALCATA, 1996)

3.7 Reação de Hidrólise Enzimática

O uso de enzimas para reação de hidrólise de óleos e gorduras não desencadeia reações paralelas, sendo assim, não altera as funções orgânicas presentes nos ácidos graxos do óleo utilizado como substrato. As reações ocorrem na presença ambiente em temperaturas entre 35 e 70 °C. Porém apresentam taxas de re-

ação menores e alto custo comparadas aos catalisadores inorgânicos, e por conta disso se tornam importantes os estudos para viabilizar o uso desses catalisadores naturais (AWADALLAK, 2012). Além disso, enzimas necessitam de condições operacionais constantes, pois como pode ser visto na Figura 3.7.1, enzimas possuem estruturas muito complexas e grandes, desta forma, uma pequena variação nas condições operacionais pode promover uma variação indesejável em sua estrutura, causando sua desativação momentânea ou permanente.

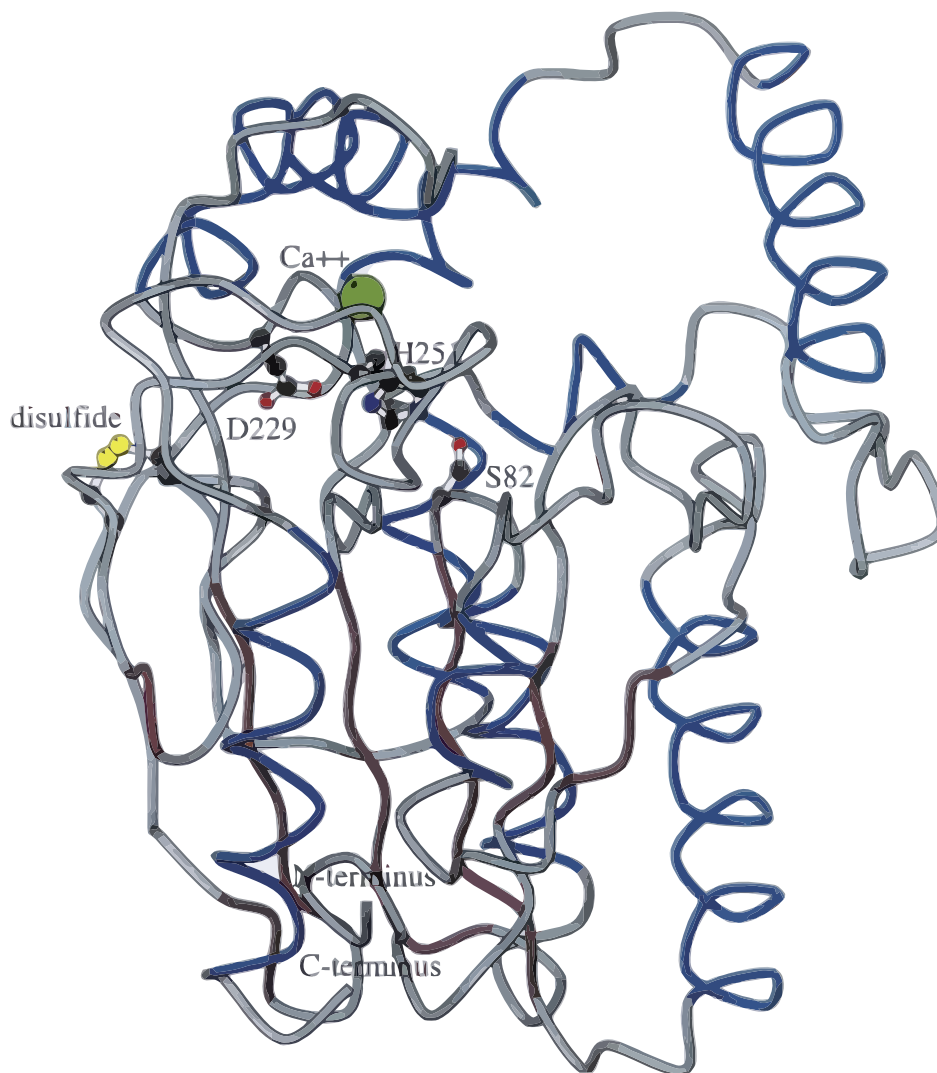


Figura 3.7.1 – Estrutura molecular de uma lipase (Reproduzido de Jaeger, Dijkstra e Reetz (1999)).

A Tabela 3.7.1 apresenta alguns exemplos de aplicações da hidrólise enzimática parcial de óleos e gorduras para produção de MAG e DAG. Como pode ser visto, apesar da hidrólise parcial se mostrar vantajosa por não necessitar de duas

etapas como a hidroesterificação, seus resultados não conferem características de óleos ricos em DAG (80% m/m) (MATSUO, 2004). O melhor resultado apresentado foi obtido por Cheong et al. (2007) após um processo de destilação molecular com um óleo de apenas 60% (m/m) composto por DAG. Enquanto a hidrólise enzimática total utilizada como etapa anterior da esterificação no processo de hidroesterificação apresenta ótimos rendimentos, pois não depende da reação ser interrompida para obter os produtos. A Tabela 3.7.2 apresenta algumas aplicações da hidrólise total juntamente com as condições operacionais e aplicações. Como pode ser visto, a hidrólise na hidroesterificação deve ser completa no menor tempo possível para garantir continuidade no processo.

Tabela 3.7.1 – Alguns exemplos de aplicação e condições operacionais da hidrólise enzimática parcial de óleos e gorduras.

Estudo	Resultados alcançados	Condições Operacionais
(CHEONG et al., 2007)	Óleo enriquecido com 32% em massa de DAG Concentração aumentada para 60% com destilação molecular	Lipoenzima Imobilizada RM IM 12 h de reação 65 °C 10% (m/m) carga enzimática 50% (m/m) Fração de água
(WANG et al., 2011)	Óleo com 26,5% de DAG Proporção de 2:3 em relação 1,3-DAG para 1,2-DAG	0,1 ml de Lecitase Ultra 150 rpm 40% água (m/m) 8 h de reação, pH 6,8 e 40 °C
(VOLL, 2011)	Óleo com 35,9% (m/m) em DAG Simulações de equilíbrio indicaram a possibilidade de alcançar concentrações de 87,6% de DAG	Lipozyme RM IM 55 °C, 400 rpm 2,1% (m/m) água 2,87% (m/m) de enzima
(AWADALLAK et al., 2013)	36,4% (m/m) de DAG no óleo	Lipozyme RM IM 1,2 min de Pré emulsão com Ultrassom 11,2% (m/m) de água 55 °C 1,36% (m/m) Enzima
(PHUAH et al., 2012)	Taxa inicial média de reação de 7,04mmol/L/min (10min) 31% (m/m) de DAG com 6h	Lipozyme RM IM 10% (m/m) carga enzimática 5% (m/m) Fração de água 55 °C, 500rpm
(BABICZ et al., 2010)	41% (m/m) de DAG para a Lipozyme RM IM 32% (m/m) de DAG para a Novozyme 435	1% (m/m) carga enzimática Irradiação de Ultrassom 55 °C, 700 rpm Fração de água omissa

Tabela 3.7.2 – Alguns exemplos de aplicação e condições operacionais da hidrólise enzimática total de óleos e gorduras.

Estudo	Aplicação	Resultados alcançados	Condições Operacionais
(WATANABE et al., 2003)	Produção de DAG	92,8% (m/m) de AGL na Hidrólise 92% de DAG (m/m) na Esterificação	Hidrólise Hidrólise com Vapor 250 °C, 50 mmHg Não-enzimática
			Esterificação Razão molar AGL/Glicerol de 2:1 50 °C, 4 h de Reação Lipozyme RM IM 3 mmHg de vácuo
(CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011)	Produção de Biodiesel	89% (m/m de AGL na Hidrólise 92% (m/m) De Biodiesel na Esterificação	50% (v/v) Óleo de soja 2,3% (v/v) enzima TL 100L 60 °C, 48h de Reação
			Razão AGL:Metanol 1:3 20% (m/m) Catalisador 200 °C, 1h de Reação
(TALUKDER; WU; CHUA, 2010)	Produção de Biodiesel	100% de conversão na Hidrólise 99% de conversão na esterificação	5g/L de Lipase Candida Rugosa, 10 h de reação Óleo de resíduo de Fritura Razão água:óleo de 1:1 (v:v)
			Catalisador Amberlyst 15 60 °C, 2 h de reação Razão AGL:Metanol 1:4
(SOUSA et al., 2010)	Produção de Biodiesel	97% de AGL obtidos na hidrólise 97,1% de Biodiesel na Esterificação	lipase: sementes geminadas de pinhão manso 10% (m/m) sementes geminadas 450 RPM, 2 h de reação 50% (m/v) óleo de pinhão manso
			500 psi, 200 °C, 2 h de reação Razão AGL:Metanol 1:3 Ácido de níbio
(AGUIEIRAS et al., 2014)	Produção de Biodiesel	99,6% de AGL na Hidrólise 91% de conversão na esterificação	30 °C, pH 4,0, 6 h de reação 50% (v/v) Óleo de macauba Lipase de Rhizomucor miehei 2,5% (m/v) de Lipase
			Razão AGL:Etanol 1:2 40 °C, 8 h de reação Lipase de Babaçu Fermentado
(BREISSANI et al., 2014)	Produção de Éster Alquilico	100% de conversão na Hidrólise 92,4% de conversão na Esterificação	35% (w/w) de óleo de Macauba 35 °C, 1000 RPM, 10 min de reação 6% (m/m) lipase TLL
			Razão equimolar 15 min de reação 32,5 °C, 200 RPM

3.7.1 Limitações da Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática de óleos possui duas principais limitações: a primeira dela diz respeito a natureza imiscível dos reagentes (água e óleo) (AWADALLAK et al., 2013), a segunda diz respeito a natureza da reação enzimática e uma possível inibição pelo substrato (GATT; BARTFAI, 1977).

Para que uma reação química ocorra é necessário que haja contato entre os reagentes, e quando os reagentes de uma reação se encontram em fases distintas, este contato se encontra limitado ao contato interfacial e a transferência de massa entre as fases. A reação de hidrólise de óleos é um exemplo deste tipo de reação. Alguns recursos podem ser usados para reduzir essa limitação, como por exemplo o emprego de solventes que permitam tornar o sistema monofásico ou de agitadores mecânicos e ultra-sônicos para aumentar a área superficial entre as fases. Neste aspecto, o uso de agitadores possuem a vantagem de não necessitar de novas etapas de separação (VOLL et al., 2012).

Quanto ao segundo aspecto, Gatt e Bartfai (1977) demonstraram que o aumento da concentração substrato na reação de hidrólise enzimática se diferencia do modelo padrão de taxa enzimática proposto por Michaelis e Menten (1913), o qual apresenta um perfil assintótico para a curva de velocidade versus concentração de substrato e linear para a curva de velocidade versus concentração de enzima. Pela análise dos resultados obtidos por Gatt e Bartfai (1977) apresentados na Figura 3.7.2 percebe-se que o aumento da concentração do substrato promove uma diminuição da velocidade da reação. Isso pode ser explicado pela estrutura das moléculas de acilgliceróis, que por possuírem 3 grupos éster, com o aumento da disponibilidade de acilgliceróis no meio, duas moléculas podem ocupar o espaço de uma em um sítio enzimático, e dessa forma não ativar as ligações químicas para promover a reação.

Segundo Noor, Hasan e Ramachandran (2003), a inibição pelo substrato passa a ocorrer quando a fração mássica de óleo no sistema chega a aproximada-

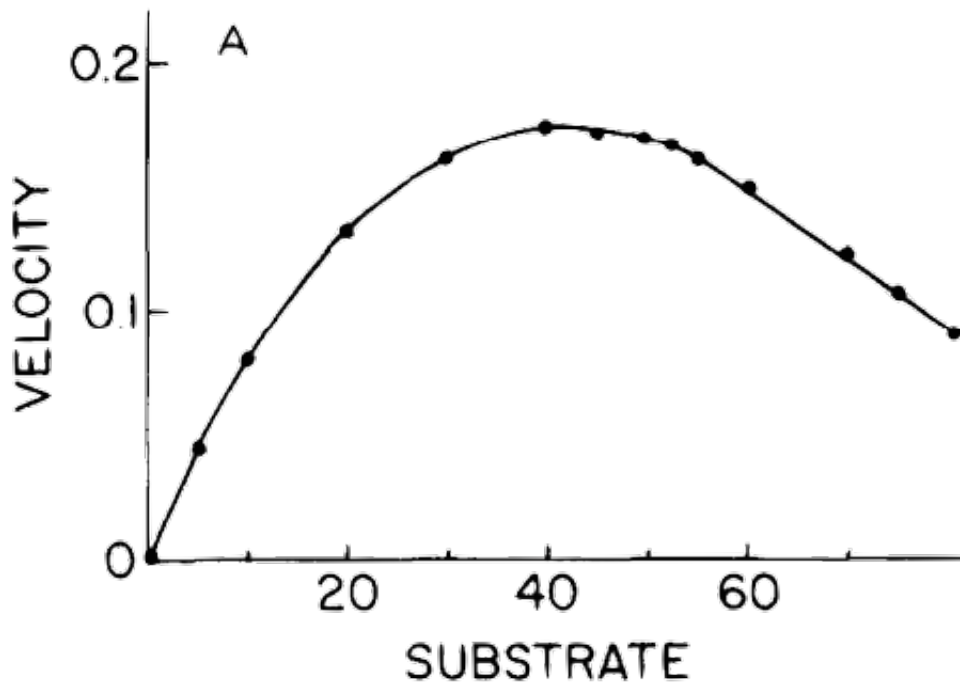


Figura 3.7.2 – Efeito da inibição pelo substrato demonstrado por Gatt e Bartfai (1977) (Reprodução).

mente 38%, porém, este efeito pode ser amenizado ao mudar a forma de agitação. Outros autores relatam diferentes possibilidades de inibição ocorrendo na hidrólise enzimática de óleos: Phuah et al. (2012) observaram a inibição pelo substrato ocorrendo para a água; Rathod e Pandit (2009) concluem que a inibição ocorre pela formação do produto (AGL); Bressani et al. (2014) e Liu et al. (2008) concordam que a inibição ocorre pelo substrato óleo.

3.8 Irradiação por Ultrassom

Vibrações em um meio material promovem um efeito de diferença de pressão que se propaga, e que pode ser captado pelos ouvidos humanos quando a frequência de vibração esta entre 20 e 20.000 vibrações por segundo (Hz), e ondas nessa faixa de frequências são chamadas de ondas sonoras. Quando a frequência de vibração é superior a 20.000 Hz, os ouvidos não são capazes de captar, mas o meio material em que ela se propagada continua sentindo as vibrações, e as ondas

desse tipo são chamadas de ultrassônicas (BRUNEAU, 2010).

Ondas ultrassônicas podem ser utilizadas para diminuir os tamanhos de partículas em dispersões e emulsões (KULDILOKE, 2002), e o ramo da química que estuda a influência de ondas ultrassônicas sobre os sistemas químicos e suas consequências é conhecida como sonoquímica (MASON; PETERS, 2002).

Quando um sistema em fase líquida está sob a presença de ondas ultrassônicas de alta intensidade ele sofre um efeito conhecido como cavitação, ou seja, durante um intervalo de baixa pressão, pequenas bolhas de vácuo são criadas no líquido, e na medida que essas bolhas atingem um volume que não conseguem mais absorver energia, elas colapsam violentamente (HIELSCHER, 2007). Este efeito promove condições extremas microscopicamente, com elevadas temperaturas e pressões (até 5000 K e 100 MPa) (SUSLICK; SKRABALAK, 2008), além disso, a falta de simetria no colapso das bolhas de cavitação pode originar jatos de até 100 m s^{-1} (SINISTERRA, 1992).

Os aparelhos utilizados para geração de cavitação através de ondas ultrassônicas são compostos por um gerador de frequência, que transforma a frequência da rede elétrica (50 - 60 Hz) na frequência desejada para o aparelho, sendo que ondas ultrassônicas possuem frequências acima de 20 kHz, um transdutor piezoelétrico que transforma a energia elétrica em energia mecânica e um meio de propagação (BABICZ et al., 2010). Existem duas formas mais comuns de propagar as ondas ultrassônicas, por meio de chapas metálicas utilizadas em banhos ultrassônicos e sonotrodos (sondas) para sondas ultrassônicas. No geral, ultrassom de sonda tem potencial de fornecer muito mais em um pequeno volume de líquido, enquanto que o ultrassom de banho dissipa muita energia em um grande volume de água para funcionar por meio de imersão.

Essa energia dissipada pelo efeito de cavitação é convertida em fricção e turbulência ao meio, e este processo é muito eficaz para micro agitação (HIELSCHER, 2007), e pode ser aproveitado para limpeza de peças quando utilizado em

ultrassom do tipo de banho ou para promover emulsões entre líquidos imiscíveis em ultrassom de sonda (KULDILOKE, 2002).

Quando as bolhas de cavitação ocorrem na interface de dois líquidos imiscíveis, a micro agitação intensa reduz drasticamente o tamanho das bolhas dos líquidos presentes, promovendo a emulsificação entre esses líquidos de forma muito eficiente (LIU et al., 2008). Essa cavitação e o efeito de emulsificação podem ser afetadas pela presença de gases dissolvidos, pela frequência das ondas, temperatura, viscosidade, tensão superficial entre as fases, pressão externa, e presença de material particulado (RASO et al., 1999).

3.8.1 Ultrassom em Reações de Hidrólise Enzimática

Lipases têm sido empregadas com sucesso para reações de fases imiscíveis adicionando solventes ao meio para reduzir as limitações de transferência de massa (KLIBANOV, 2001; PERSSON et al., 2002; WU; ZHANG; HE, 2001). Porém, a utilização de solventes traz desvantagens ao processo, como elevado custo dos solventes, toxicidade e inflamabilidade (LIU et al., 2008). Com isso, o uso de ultrassom para produzir emulsões em reações com lipases pode apresentar os benefícios da utilização de solventes sem as desvantagens apresentadas, além de eliminar a necessidade de posterior purificação (DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002; YACHMENEV; BLANCHARD; LAMBERT, 2004). O uso de ultrassom em reações de hidrólise, além de contribuir para reduzir as limitações de transferência de massa, aumenta a área interfacial entre os substratos, e como se é conhecido, a catálise enzimática necessita desta interface para obter atividade (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

O ultrassom pode ser utilizado de duas formas na reação de hidrólise. Uma delas seria com uso de ultrassom em uma etapa anterior a adição da enzima no meio reacional, para formação de uma pré emulsão de tal forma que o aumento da área interfacial promova um aumento na atividade enzimática (AWADALLAK et al., 2013). A outra abordagem envolve a utilização do ultrassom ao longo de todo pe-

ríodo reacional, neste caso, a energia de cavitação também é utilizada para acelerar a velocidade de reação, mas o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está bem estabelecido na literatura (BASHARI et al., 2013). No entanto, o aumento da temperatura promovido pela implosão das bolhas de cavitação, bem como altas tensões cisalhantes na interface contribuem para a desativação de enzimas (KULDILOKE, 2002; SUSLICK; SKRABALAK, 2008).

3.9 Modelagem Matemática

Simulações de modelos matemáticos são capazes de reproduzir o comportamento e desempenho de processos químicos. Desta forma, a modelagem matemática se apresenta como uma ferramenta que fornece base para estratégias de controle e diagnósticos de processos (VOLESKY, 2001).

Para simplificar a reação de hidrólise é comum considerar que os substratos imiscíveis estão dissolvidos em uma fase homogênea, desconsiderando o mecanismo de atuação enzimática, o qual consiste que as lipases catalisam reações apenas na interface entre os substratos (FACCIO, 2004).

Por conta da imiscibilidade entre as fases, alguns autores relatam um "período de indução" presente na reação de hidrólise, aonde as taxas são diminutas até que haja formação de MAG e DAG suficiente para atuarem como surfactante ao meio reacional. Depois deste efeito, a reação passa a ocorrer como se fosse em uma fase homogênea (MOQUIN; TEMELLI, 2008; VOLL et al., 2012).

Voll et al. (2012) considerou em seu modelo que nem toda água presente no meio reacional está disponível para a atuação da enzima, desta forma é necessário que a água se torne solúvel ao óleo para poder reagir, e assim o período de indução foi representado.

O tamanho e a complexidade das moléculas de enzimas lhes confere a característica de serem facilmente desativadas pelas condições operacionais do meio, o que é uma limitação do processo (NAIDU; PANDA, 2003). A desativação enzimá-

tica pode ocorrer pela influência de fatores como temperatura, pH, forças hidrodinâmicas, ausência de substrato, entre outras (SCHÜGERL, 2000). Desta forma, a modelagem matemática da hidrólise enzimática de óleos deve levar em consideração este efeito de desativação (VOLL et al., 2012).

3.10 Considerações da Revisão

A hidrólise é um importante processo industrial utilizado na modificação de óleos e gorduras. A reação consiste na quebra de acilglicerróis por moléculas de água, e os produtos formados são acilglicerróis, glicerol e ácidos graxos livres. Os acilglicerróis produzidos (MAG e DAG) atuam como excelentes emulsificantes, enquanto que os ácidos graxos livres são reagentes para produção de inúmeros produtos de valor comercial (aminas graxas, polímeros, esteróides, entre outros).

A hidrólise enzimática, por sua vez, tem ganho significativa importância na comunidade científica, visto que os produtos dessa reação possuem pureza para serem utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica. Além disso, enzimas apresentam características recomendáveis em termos de seletividade e condições amenas de reação. Porém, seu custo e reuso são fatores impeditivos para algumas aplicações industriais.

Pesquisas básicas demonstram que a reação de hidrólise enzimática apresentam duas limitações básicas: o problema de imiscibilidade entre as fases dos substratos envolvidos (água e óleo) e a inibição pelo substrato. A inibição pelo substrato é o efeito que impede que a enzima continue atuando de forma satisfatória quando a concentração de óleo é aumentada. Porém, como essa reação possui dois substratos (água e óleo), alguns autores discordam quando ao substrato que promove a inibição.

Para contornar o efeito de inibição, é necessário encontrar formas de obter taxas de reação elevadas em baixas concentrações de substrato. Quanto a imiscibilidade, o uso de ultrassom é uma excelente alternativa para aumentar a área de

contato entre as fases, reduzindo as limitações de transferência de massa. Porém, é necessário ter conhecimento de como as enzimas se comportam na presença de irradiação ultrassônica.

Portanto, o uso de ultrassom na hidrólise enzimática ainda é um campo promissor de pesquisa, e este trabalho visa aumentar o conhecimento científico frente este panorama.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Os solventes utilizados (Álcool etílico e éter dietílico), o hidróxido de sódio e a goma arábica foram de pureza analítica produzidos pela Sigma-Aldrich. O óleo de soja comercial utilizado no estudo foi, da marca Suavit, foi produzido pela empresa Cocamar Cooperativa Agroindustrial. A lipo-enzima líquida Lecitase Ultra (Phospholipase A1) foi empregada como catalisadora das reações de hidrólise. Esta Lipase 1,3-específica é produzida e vendida comercialmente pela Novozymes, e foi gentilmente cedida pela LNF Latino Americana.

A carga de enzima utilizada nas reações foi expressa em termos de fração mássica em relação a massa de água dos experimentos, pois esta enzima é solúvel apenas na fase aquosa. Além disso, a enzima possui 42% de água em sua composição, sendo que esta foi contabilizada na massa de água dos experimentos.

A fração mássica de óleo utilizado nos experimentos foi de 7,0% para garantir que o sistema estivesse livre dos efeitos da inibição pelo substrato. Como exceção dos experimentos para avaliar a inibição, em que a fração de óleo foi variável.

4.2 Equipamentos

Foram utilizados dois equipamentos de ultrassom diferentes, para os experimentos realizados no ultrassom de banho, foi utilizado um banho ultrassônico modelo q5.937A, da Ultronique, de potência nominal de 154 W e frequência de ondas ultrassônicas de 37 kHz. Este ultrassom possui controle de temperatura por resistência elétrica e termostato até 60 °C. Para todos os experimentos foi utilizada a temperatura de 40 °C durante as reações, pois alguns autores relatam esta tempe-

ratura como a temperatura ótima de operação para a Phospholipase A1 (WANG et al., 2010; CLAUSEN, 2001). Além disso, para melhorar a estabilidade do controle de temperatura por termostato, foi adicionado ao sistema um béquer de 5 L de água destilada e uma bomba de aquário para recirculação de água.

Nos os experimentos sem ultrassom o sistema utilizado foi o mesmo que o utilizado nos experimentos com ultrassom de banho, porém, com as ondas ultrassônicas desligadas.

Para os experimentos utilizando ultrassom de sonda, foi utilizando um ultrassom modelo Desruptor, da Ultronique, de potência nominal de 500 W e frequência de ondas ultrassônicas de 20 kHz. Para fazer o controle de temperatura foi utilizado um reator encamizado acoplado em um sistema termostático de circulação (Marconi MA-184).

4.3 Métodos Experimentais

4.3.1 Efeito da Inibição Pelo Substrato

A fim de avaliar os efeitos inibitórios pelo aumento da concentração de óleo no meio reacional, a taxa média inicial de hidrólise foi aferida em diferentes concentrações mássicas de óleo no meio reacional. O meio reacional consistiu em frascos elermeyer de 125 ml com agitação mecânica a 400 rpm. O volume total de substrato foi de 100 ml, sendo que a fração mássica de óleo foi variada de 5% a 95% em relação a massa total. A fração mássica de enzima utilizada foi de 2% em relação a massa de água.

Foi utilizado o modelo de inibição enzimática Ping-pong Bi-bi (PHUAH et al., 2012) para descrever o comportamento do sistema. O modelo consiste na Equação 4.1.

$$\bar{r}_{AGL}^{Inicial} = \frac{r_{max} C_{H_2O} C_{OIL}}{K m_{H_2O} C_{OIL} \left(1 + \frac{C_{OIL}}{K_i}\right) + K m_{OIL} C_{H_2O} + C_{H_2O} C_{OIL}} \quad (4.1)$$

A soma das diferenças entre os valores experimentais e os calculados ao quadrado foi minimizada para estimar os parâmetros do modelo ($r_{max}, Km_{H_2O}, Ki, Km_{OIL}$). Para isso foi utilizado a ferramenta Solver contida no pacote office.

4.3.2 Experimentos Cinéticos Para Reações de Hidrólise

Para avaliar os efeitos do uso de irradiação ultrassônica na reação de hidrólise enzimática foram adotadas quatro diferentes metodologias na cinética da reação:

Controle) Agitação mecânica livre de ultrassom;

Banho) Agitação mecânica imerso no banho ultrassônico;

Sonda) Ultrassom de sonda em baixa potência, livre de agitação mecânica;

Pré-sonda) Pré-emulsão dos substratos pelo ultrassom de sonda em alta potência, seguido pela agitação mecânica ao longo da reação sem ultrassom.

As cinéticas de reações de hidrólise enzimática foram realizadas em erlenmeyers de 250 mL. A mistura reacional de água e óleo consistiu em 200 mL, sendo 7,0% da massa total constituída de óleo. Optou-se utilizar baixa concentração de óleo para que os efeitos da inibição pelo substrato fossem suprimidos ao máximo. A concentração de goma arábica foi de 10 g L⁻¹. Em todas as metodologias os reagentes foram mantidos sob agitação por 5 min antes da porção de água (25% da água total) com enzima fosse adicionada para dar início a reação a fim de garantir equilíbrio térmico na temperatura de reação.

4.3.3 Efeito da Concentração de Surfactante

Foi avaliado o efeito da concentração de surfactante (Goma Arábica) na taxa inicial de hidrólise. As reações foram realizadas em frascos elermeyer de 125 mL com agitação mecânica a 400 rpm. A concentração de óleo utilizada foi de 7,0% em relação a massa total, e a carga enzimática de 2,0% em relação a massa de água. As massas de óleo, água e enzima foram calculadas para um volume reacional total

de 60 ml. A concentração de surfactante foi variada de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ a 50 g L^{-1} . Foi utilizada pré-emulsão com ultrassom de sonda por 5 min, sendo que 75% da massa de água foi utilizada para formar a emulsão e 25% para solubilizar a enzima. Após a pré-emulsão, os reagentes foram mantidos sob agitação por 5 min antes da porção de água com enzima fosse adicionada para dar início a reação a fim de garantir equilíbrio térmico na temperatura de reação.

4.3.4 Efeito do Tempo de Pré-emulsão

Outra variável avaliada foi o tempo de pré-emulsão dos substratos (água e óleo) utilizando o ultrassom de sonda. A metodologia empregada foi a mesma utilizada para avaliar o efeito de concentração de surfactante, com exceção que o tempo de pré-emulsão foi variado entre 1 s e 5 min. O efeito do tempo de pré-emulsão foi investigado utilizando-se 10 g L^{-1} de surfactante e sem a presença do mesmo.

4.3.5 Efeito da Concentração de Enzima

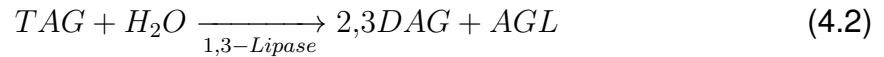
Para avaliar o efeito da concentração de enzima foi empregada mesma metodologia que o efeito da concentração de surfactante com uma concentração de surfactante fixa em 10 g L^{-1} . Porém, a carga enzimática foi variada de 1% a 10% em relação a massa de água. Além disso, foi avaliada o efeito de carga enzimática com e sem a etapa de pré-emulsão dos substratos por ultrassom de sonda.

4.3.6 Modelagem Cinética

Em baixas concentrações de óleo, a inibição pelo substrato não é expressiva. Watanabe et al. (2003), Noor, Hasan e Ramachandran (2003) descrevem a cinética da hidrólise enzimática livre de solventes como uma série de reações de hidrólise para diferentes acilgliceróis. Deve-se ressaltar que enzimas 1,3-específica ativam apenas as ligações 1 e 3 dos acilgliceróis, portanto a ligação central só consegue reagir se ocorrer outra reação, a migração acil (Freeman, 1966), que só é

considerada para o 2MAG, pois para o 2,3DAG a hidrólise é muito mais rápida e pode ser desconsiderada. Como a água encontra-se em excesso em relação a quantidade molar de óleo, sua concentração foi assumida como constante e as reações foram consideradas irreversíveis. Com isso, o modelo proposto é expresso pelas Equações 4.2 a 4.6.

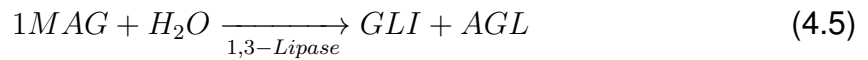
Hidrólise:



Migração Acil:



Hidrólise:



A fim de verificar o efeito do uso do ultrassom sobre a enzima, foi adicionado ao modelo uma reação para desativação enzimática:



Além disso, para avaliar o efeito do ultrassom sobre a enzima, foi adicionado a concentração (em $g L^{-1}$) de enzima nas equações de taxa para as reações que são catalisadas pela enzima. Com isso, as taxas de reações foram expressas de acordo com as Equações 4.7 a 4.11:

$$r_1 = k_1 C_{TAG} C_{ENZ} \quad (4.7)$$

$$r_2 = k_2 C_{2,3DAG} C_{ENZ} \quad (4.8)$$

$$r_3 = k_3 C_{2MAG} \quad (4.9)$$

$$r_4 = k_4 C_{1MAG} C_{ENZ} \quad (4.10)$$

$$r_5 = k_5 C_{ENZ} \quad (4.11)$$

Visto isso, as taxas de geração e consumo de cada composto são representadas pelas Equações 4.12 a 4.18:

$$\frac{d}{dt} C_{TAG}(t) = -r_1 \quad (4.12)$$

$$\frac{d}{dt} C_{2,3DAG}(t) = r_1 - r_2 \quad (4.13)$$

$$\frac{d}{dt} C_{2MAG}(t) = r_2 - r_3 \quad (4.14)$$

$$\frac{d}{dt} C_{1MAG}(t) = r_3 - r_4 \quad (4.15)$$

$$\frac{d}{dt} C_{AGL}(t) = r_1 + r_2 + r_4 \quad (4.16)$$

$$\frac{d}{dt} C_{GLI}(t) = r_4 \quad (4.17)$$

$$\frac{d}{dt} C_{ENZ}(t) = -r_5 \quad (4.18)$$

Substituindo as equações de taxa, obtemos as Equações que compõem o modelo matemático (Equações 4.19 a 4.25).

$$\frac{d}{dt}C_{TAG}(t) = -(k_1C_{TAG}C_{ENZ}) \quad (4.19)$$

$$\frac{d}{dt}C_{2,3DAG}(t) = k_1C_{TAG}C_{ENZ} - (k_2C_{2,3DAG}C_{ENZ}) \quad (4.20)$$

$$\frac{d}{dt}C_{2MAG}(t) = k_2C_{2,3DAG}C_{ENZ} - (k_3C_{2MAG}) \quad (4.21)$$

$$\frac{d}{dt}C_{1MAG}(t) = k_3C_{2MAG} - (k_4C_{1MAG}C_{ENZ}) \quad (4.22)$$

$$\frac{d}{dt}C_{AGL}(t) = k_1C_{TAG}C_{ENZ} + k_2C_{2,3DAG}C_{ENZ} + k_4C_{1MAG}C_{ENZ} \quad (4.23)$$

$$\frac{d}{dt}C_{GLI}(t) = k_4C_{1MAG}C_{ENZ} \quad (4.24)$$

$$\frac{d}{dt}C_{ENZ}(t) = -k_5C_{ENZ} \quad (4.25)$$

Para resolver o sistema de equações diferenciais compostos pelas Equações 4.19 a 4.25 são necessárias condições iniciais, sendo estas calculadas pela Equação 4.26 para cada um dos componentes iniciais da reação, TAG, DAG e MAG:

$$C_i(0) = \frac{(m_{OIL}^{inicial} m\%_i)PM_i}{(m_{OIL}^{inicial} \frac{1}{\rho_{OIL}} + m_{H_2O}^{inicial} \frac{1}{\rho_{H_2O}})} \quad (4.26)$$

Sendo que a composição de Acilgliceróis considerada foi de 97,9% TAG, 1,0% DAG e 1,1% MAG¹ (YANAI et al., 2007). A composição inicial de AGL foi considerada zero, após serem realizadas titulações no óleo utilizado nos experimentos.

¹ Calculado pela diferença e considerado 50% 1-MAG e 50% 2-MAG.

A massa molecular média para os acilgliceróis foi calculado com base na massa molecular média dos ácidos graxos que compõem o óleo de soja. Considerando a definição dos acilgliceróis, que são compostos resultantes da esterificação do glicerol por AGL, e que cada esterificação libera uma molécula de água. Sendo assim, as massas moleculares médias para o TAG, DAG e MAG são calculados pelas equação abaixo:

$$PM_{TAG} = PM_{GLI} + 3 PM_{AGL} - 3 PM_{H_2O} \quad (4.27)$$

$$PM_{DAG} = PM_{GLI} + 2 PM_{AGL} - 2 PM_{H_2O} \quad (4.28)$$

$$PM_{MAG} = PM_{GLI} + PM_{AGL} - PM_{H_2O} \quad (4.29)$$

4.3.7 Estimativa dos Parâmetros Cinéticos

Para cada ponto experimental foi resolvido o modelo supracitado composto pelas Equações 4.19 a 4.25. As constantes cinéticas das reações (k_j) foram estimadas pela minimização da função objetivo, de tal forma que a diferença dos valores experimentais e calculados ao quadrado fosse a menor possível, como pode ser observado na Equação 4.30. Para isso, foi escrito um código computacional em linguagem Python e utilizada as bibliotecas *open source* Numpy (WALT; COLBERT; VAROQUAUX, 2011) e Scipy (JONES et al., 2001). Para resolver as equações diferenciais e minimizar a função 4.30 foram utilizadas as rotinas padrões da biblioteca Scipy, ou seja, o método Simplex Nelder-Mead (NELDER; MEAD, 1965).

$$F_{objetivo} = \sum_{i=1}^{n_{dad}} (C_{AGLi}^{exp} - C_{AGL}(t))^{2} \quad (4.30)$$

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Quantificação do Teor Ácidos Graxos Livres (Acidez)

Para calcular o teor de ácidos graxos livres das amostras, aproximadamente 3 g do produto das reações foi diluída em 20 ml de solução isovolumétrica de álcool e éter com três gotas de solução de fenolftaleína 1 %(m/v), e em seguida, titulada com solução de NaOH 0,05 M sob forte agitação até a mudança de coloração. A partir do volume de solução consumido na titulação para ocorrer a mudança de cor a fração de AGL foi calculada por meio da Equação 4.31.

$$m\%_{AGL} = \left(\frac{0,05 V_{NaOH} PM_{AGL}}{m_{amostra} \%m_{OIL}^{inicial}} \right) \quad (4.31)$$

Para o cálculo da concentração experimental de AGL foi utilizada a Equação 4.32, considerando-se que o volume reacional permaneceu constante ao longo da reação.

$$C_{AGL}^{exp} = \left(\frac{0,05 V_{NaOH}}{m_{OIL}^{inicial} \rho_{OIL} + m_{H_2O}^{inicial} \rho_{H_2O}} \right) \quad (4.32)$$

A massa molecular utilizada para o AGL foi a massa molecular média dos ácidos graxos livres contidos no óleo de soja, essa composição está apresentada na Tabela 4.4.1, e foi calculado em $278,12 \pm 0,55 \text{ g mol}^{-1}$.

4.4.2 Cálculo da Velocidade Inicial Média da Reação de Hidrólise (Taxa Média Inicial)

Para o cálculo da velocidade inicial média foram coletadas amostras em 5 min de reação. A taxa média inicial da reação informa a quantidade média de mols de AGL gerados por min e por volume reacional. A taxa média inicial da reação foi

Tabela 4.4.1 – Composição do Óleo de Soja

Ácidos Graxos	Estrutura	Fração mássica dos componentes (%)						
		a	b	c	d	e	f	g
-	C<14	<0,1	0,5	-	-	-	-	0,1
Mirístico	C14:0	<0,5	0,1	-	-	-	-	0,1
Palmítico	C16:0	7,0-14,0	11,4	12,3	10,6	10,7	11,8	10,2
Palmitoleico	C16:1	<0,5	-	-	-	-	-	-
Estearico	C18:0	1,4-5,5	3,2	5,8	4,8	4,3	3,2	3,7
Oleico (Ômega 9)	C18:1	19,0-30,0	21,8	26,5	22,5	24,9	23,3	22,8
Linoleico (Ômega 6)	C18:2	44,0-62,0	54,9	49,0	52,3	51,6	55,5	53,7
Linolênico (Ômega 3)	C18:3	4,0-11,0	8,3	5,9	8,19	7,3	6,3	8,6
Araquídico	C20:0	<1,0	0,2	-	0,4	-	-	-
Eicosenoico	C20:1	<1,0	-	-	-	0,2	-	-
Behênico	C22:0	<0,5	-	-	-	-	-	-

Fonte: a) (ANVISA, 1999); b) (ALCANTARA et al., 2000); c) (XIE; LI, 2006); d) (CANAKCI; GERPEN, 2003); e) (THOMPSON; HE, 2012); f) (GOERING; FRY, 1984); g) (KINCS, 1985)

calculada seguindo a Equação 4.33, considerando o volume reacional constante.

$$\bar{r}_{AGL}^{Inicial} = 1000 \frac{\%m_{AGL} m_{OIL}^{inicial} PM_{AGL}}{(m_{OIL}^{inicial} \rho_{OIL} + m_{H_2O}^{inicial} \rho_{H_2O}) t} \quad (4.33)$$

5 Resultados e Discussões

5.1 Inibição pelo Substrato

Para verificar se o sistema estudado apresenta inibição pelo substrato, uma metodologia de agitação mecânica foi empregada para avaliar a taxa inicial média de hidrólise em diferentes frações mássicas de óleo. Também foi estimado os parâmetros para o modelo de taxa inicial Ping-Pong Bi-Bi para inibição pelo substrato.

A Tabela 5.1.1 apresenta os resultados encontrados para os parâmetros do modelo Ping-pong Bi-bi, enquanto a Figura 5.1.1 apresenta os resultados da simulação obtidos para a taxa média inicial de hidrólise em função da fração molar de óleo presente no sistema. O modelo representou de forma satisfatória os resultados experimentais, demonstrando assim a presença da inibição pelo substrato quando a fração molar de óleo é superior a 2,5% (ou 55% em fração mássica). Portanto, para garantir uma reação livre dessa inibição, os experimentos sugerem utilizar uma fração mássica de óleo abaixo de 55% de óleo.

Tabela 5.1.1 – Parâmetros e coeficiente de correlação do modelo Ping-pong Bi-bi.

V_{\max} mol min ⁻¹ L ⁻¹	K_{mOIL} mol L ⁻¹	K_{mH_2O} mol L ⁻¹	K_{iOIL} mol L ⁻¹	R^2 -
190,14	1734,3	3852,5	0,0845	0,9440

5.2 Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática

Para avaliar o efeito do uso de ultrassom na cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja utilizando lipase 1,3-seletiva foram empregadas quatro metodologias diferentes: controle, banho, sonda e pré-sonda.

As Figuras 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3 mostram os resultados da conversão de AGL

5.2. Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática

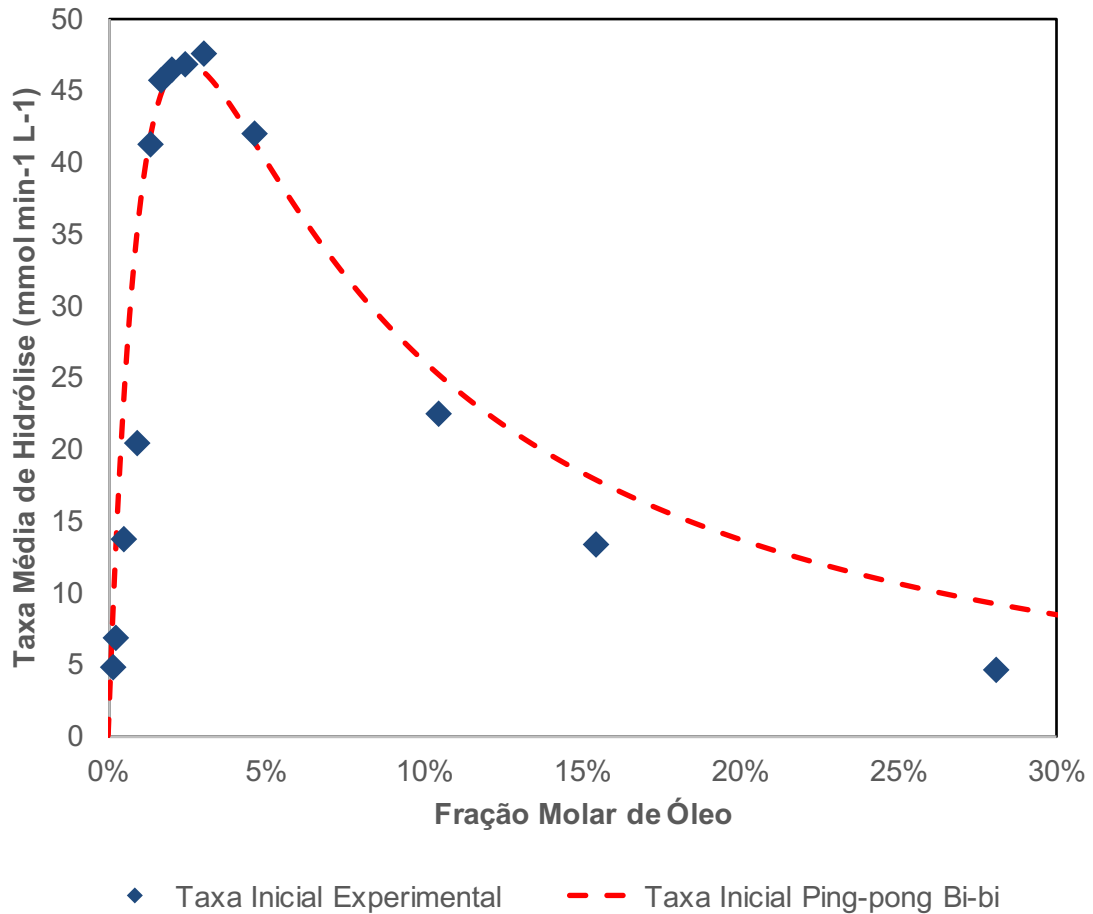


Figura 5.1.1 – Efeito da inibição pelo substrato - Taxa inicial de hidrólise em função da fração molar de óleo no meio reacional, e modelo Ping-pong Bi-bi para inibição enzimática.

em função do tempo, sendo que na Figura 5.2.2 são apresentados os resultados nos primeiros instantes (até 45 min), enquanto a Figura 5.2.3 mostra os resultados nos instantes finais da reação para melhor avaliação dos efeitos nesses períodos. A conversão de AGL foi calculada com base na máxima concentração possível de AGL caso todo o óleo fosse convertido em AGL e glicerol. A concentração de AGL foi calculada seguindo a Equação 4.31.

As metodologias que empregaram o uso do ultrassom apresentaram taxas de reação maiores do que a reação de controle (apenas com agitação). Entretanto, as metodologias que foram submetidas ao ultrassom durante toda a reação (banho e sonda), apresentaram uma diminuição na taxa a partir dos primeiros 15 min de reação enquanto que nos outros métodos esse efeito aparece apenas posterior-

5.2. Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática

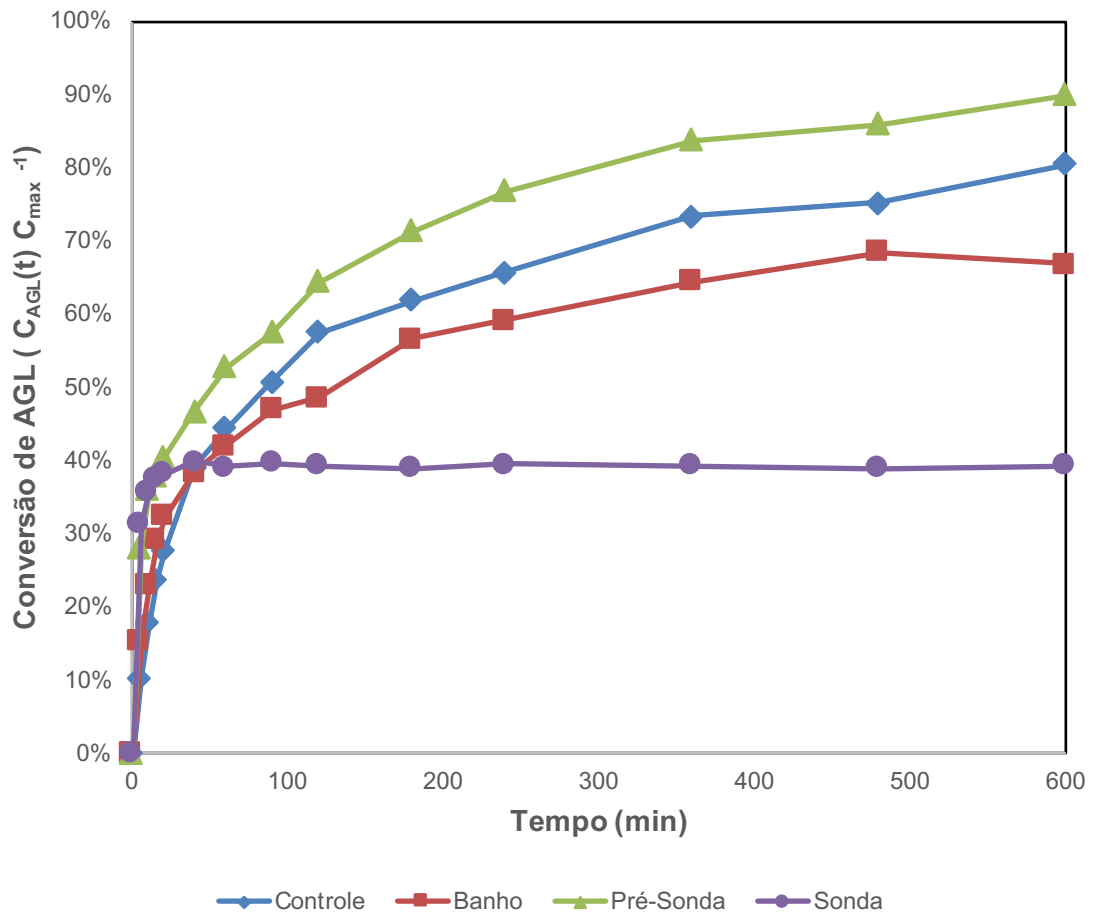


Figura 5.2.1 – Experimento cinético até 600 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom. Fração mássica de óleo de 7,0%; 2% de carga enzimática; 40 °C.

mente. Isso ocorre devido as tensões cisalhantes oriundas das ondas ultrassônicas que promovem a desativação enzimática, sendo que na metodologia de sonda, essa desativação ocorre rapidamente (em torno de 15 min), desativando todas as enzimas presentes no meio devido a alta potência que o ultrassom de sonda apresenta. Os efeitos do uso de ondas ultrassônicas em reações enzimáticas são controversos e dependem, principalmente, da natureza das enzimas e da forma que as ondas ultrassônicas são aplicadas (BASTO et al., 2007; FIAMETTI et al., 2012; ÖZBEK; ÜLGEN, 2000).

A exposição direta de enzimas a ondas ultrassônicas de alta potência por períodos prolongados resulta, em geral, na desativação enzimática parcial ou total (ÖZBEK; ÜLGEN, 2000), e isso pode ser claramente observado na metodologia que

5.2. Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática

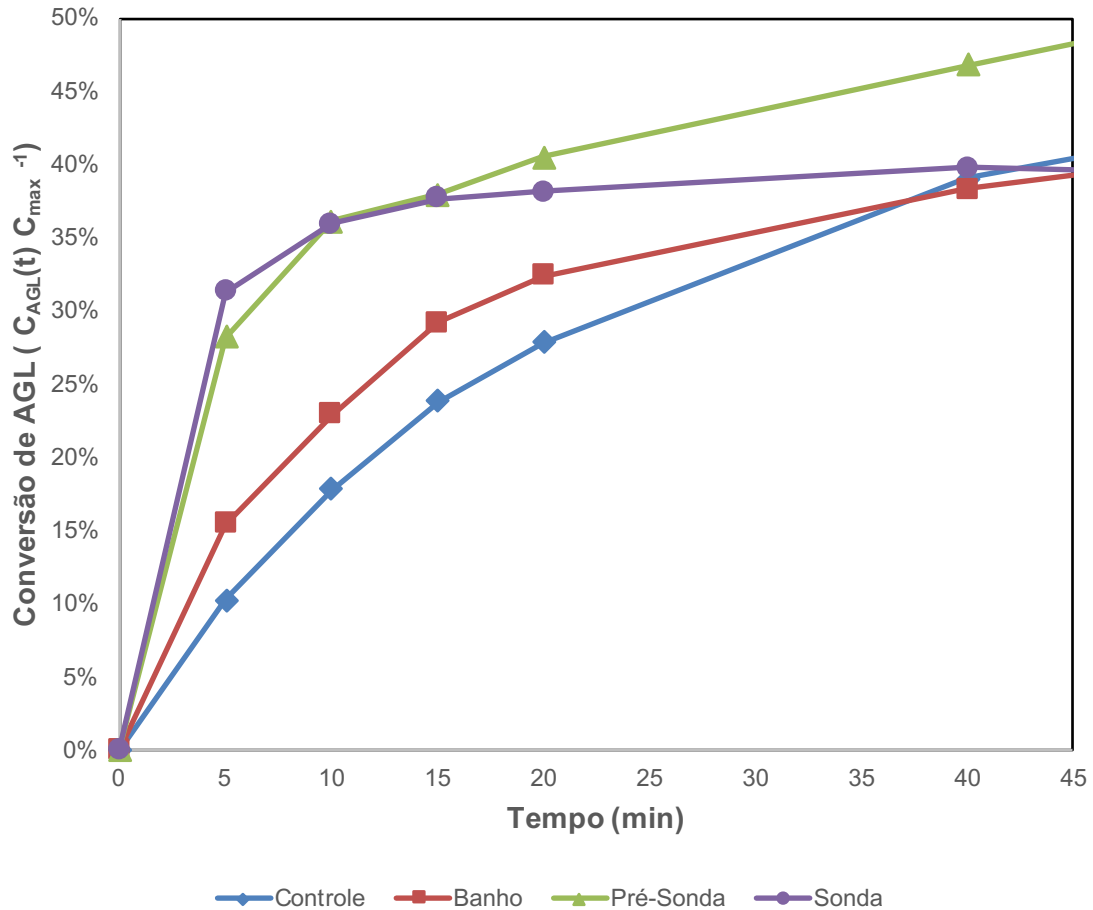


Figura 5.2.2 – Experimento cinético até 45 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom

empregou ultrassom de sonda durante toda a etapa de reação, verificou-se que a partir de 20 min a reação cessou, indicando que as enzimas foram completamente desativadas devido a alta potência que o ultrassom de sonda é capaz de dissipar.

Para todas as metodologias empregadas, com exceção da que empregou ultrassom de sonda, foi possível identificar dois períodos de reação distintos: um período inicial com taxas de reação elevadas e clara distinção entre as metodologias, como pode ser visto na Figura 5.2.2, e um segundo momento em tempos maiores aonde a taxa de reação é aproximadamente igual para todas as metodologias empregadas, indicando que a partir de 100 min aproximadamente, como pode ser visto na Figura 5.2.3, o ultrassom passa a perder o efeito sobre a taxa da reação até mesmo na metodologia com ultrassom de banho, em que o ultrassom é mantido ligado por toda a reação.

5.2. Diferentes Metodologias de Aplicação do Ultrassom na Reação de Hidrólise Enzimática

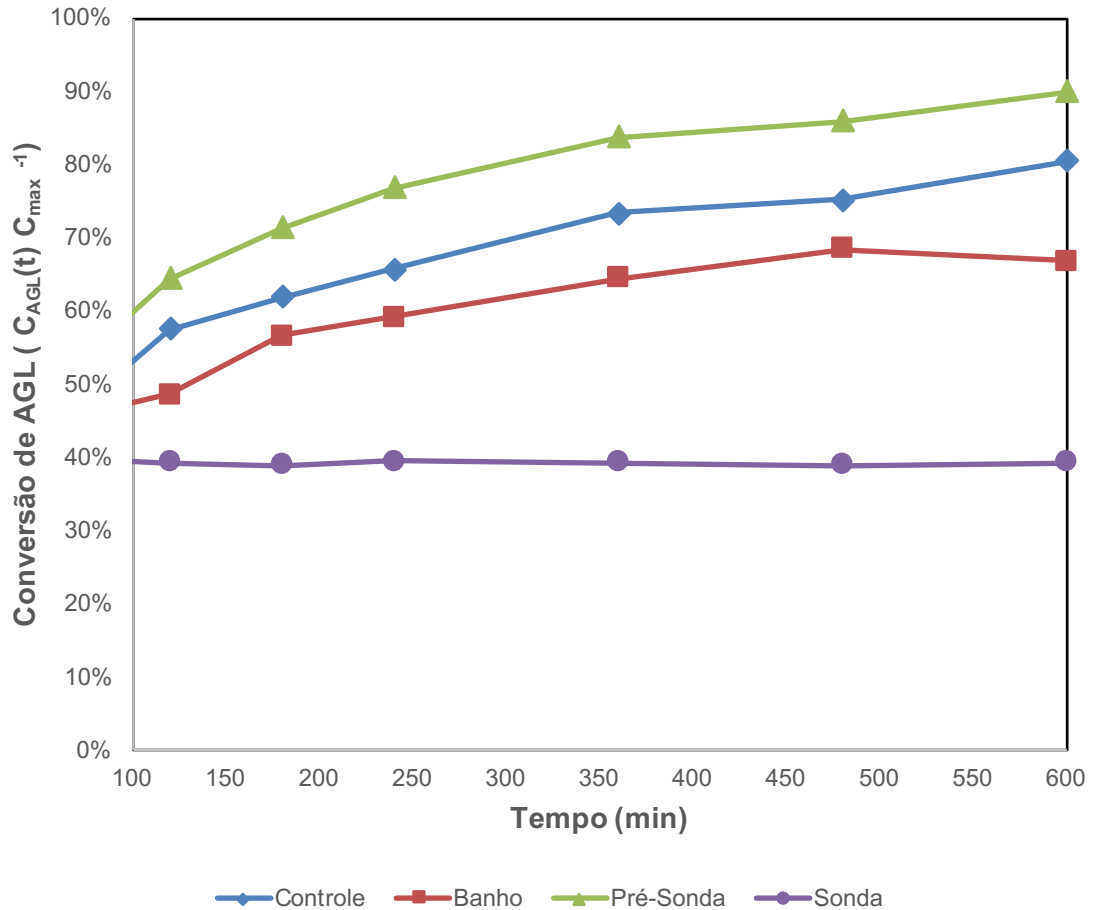


Figura 5.2.3 – Experimento cinético entre os tempos 100 e 600 min para diferentes metodologias para aplicação de ultrassom

Para o óleo de soja, a máxima conversão teórica que pode ser obtida exclusivamente na reação de hidrólise é de aproximadamente 67%, considerando que a enzima atua unicamente nas posições sn-1 e sn-3 de acilgliceróis, restando apenas AGL e 2-MAG no meio reacional. A partir disso, a hidrólise só deve ocorrer quando a molécula de 2-MAG sofre outra reação, a migração acil, que ocorre naturalmente quando um ácido graxo ligado na posição sn-2 do glicerol passa para a posição sn-1 ou sn-3. A migração acil é uma reação espontânea de equilíbrio entre o 1(3),2-DAG e o 1,2-DAG, ou entre o 1(3)-MAG e o 2-MAG, que em altas temperaturas leva horas para ser completa (KODALI et al., 1990) e em baixas temperaturas, como a temperatura utilizada neste trabalho (40 °C) pode levar dias (COMPTON; VERMILLION; LASZLO, 2007). Para todas as metodologias (com exceção a metodologia de Sonda) foi necessário pouco tempo para as taxas se tornarem aproximadamente

iguais ao longo do tempo, pois quando a conversão de AGL se aproxima de 67% (m_{AGL}/m_{OIL}) a maioria das posições sn-1 e sn-3 das moléculas de TAG já foram hidrolisadas, portanto, a limitação da reação a partir deste momento é exclusiva da migração acil. Para avaliar melhor este efeito, uma modelagem matemática foi proposta, e simulações do processo foram realizadas; esses resultados são apresentados na Seção 5.6.

Os melhores resultados apareceram na reação realizada em duas etapas (com pré-emulsão). Por conta disso, essa foi escolhida como a metodologia padrão para avaliar os efeitos das demais variáveis. Além disso, como os efeitos do uso do ultrassom se mostraram exclusivos ao início da reação, enquanto a reação de hidrólise é limitante, os demais experimentos foram avaliados em termos da taxa inicial média de hidrólise.

5.3 Efeitos da Concentração de Surfactante

O uso de surfactantes em conjunto com o ultrassom para formar emulsões de sistemas água/óleo aumentam a estabilidade e diminuem o diâmetro médio da fase dispersa (LEONG et al., 2009). A Figura 5.3.1 apresenta o efeito da variação da massa de surfactante na taxa inicial média de hidrólise. As reações foram conduzidas seguindo a metodologia com pré-emulsão no ultrassom de sonda, concentração de 7,0% em massa, fração de enzima fixa em 2% (m_{ENZ}/m_{H_2O}) e fração de goma arábica variando de 0,5 a 50,0 g L⁻¹.

O uso de surfactante aumenta significativamente a taxa média inicial da hidrólise em relação a reação sem surfactante. Contudo, esse efeito é mais ameno em altas concentrações. A concentração de goma arábica que apresentou a maior taxa inicial de hidrólise entre os níveis estudados foi de 10 g L⁻¹. Noor, Hasan e Ramachandran (2003) obtiveram resultados semelhantes em baixas concentrações de óleo (2,5% em massa). A reação de hidrólise catalisada por lipases é intensamente afetada pela baixa miscibilidade entre óleo e água e, conseqüentemente,

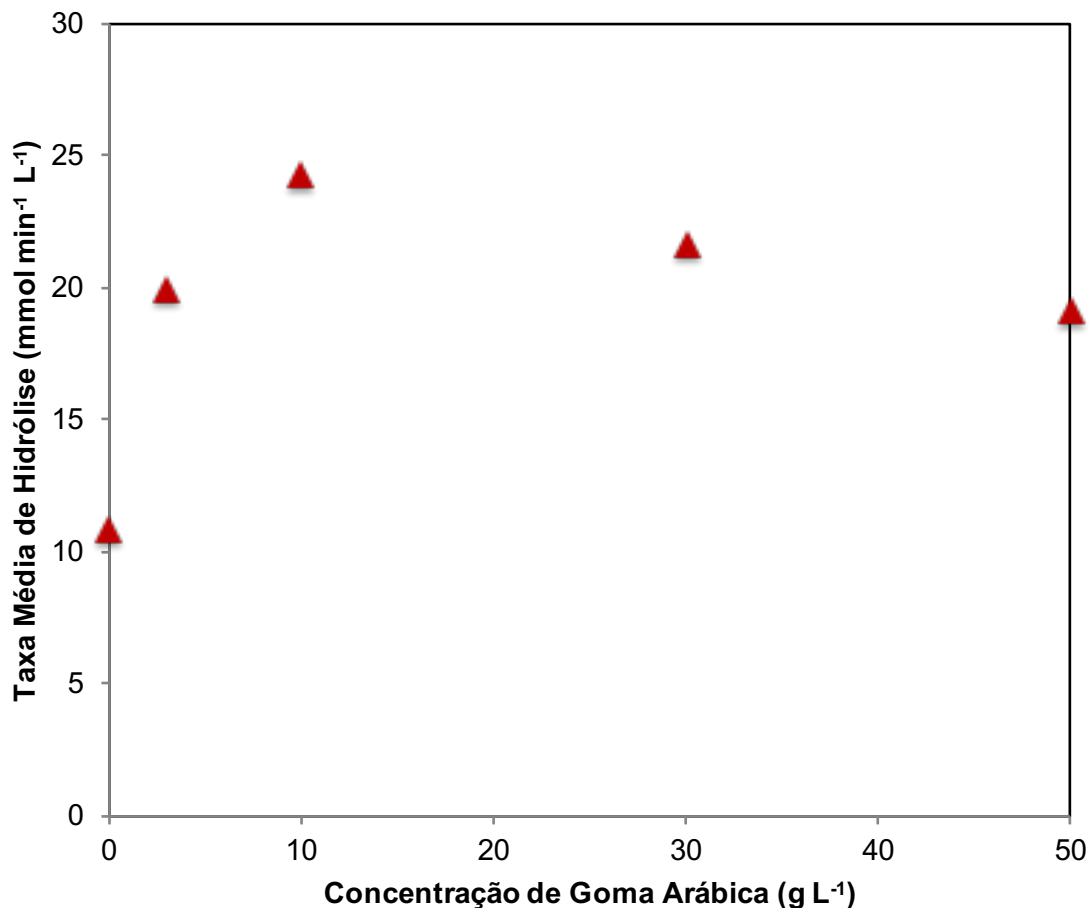


Figura 5.3.1 – Efeito da concentração de surfactante (Goma Arábica) na taxa inicial média da hidrólise enzimática do Óleo de Soja.

pela pequena área superficial entre os substratos (FEITEN et al., 2014). A adição de surfactantes na emulsificação com ultrassom ameniza essas características (ABISMAÏL et al., 1999), e aumenta significativamente as taxas com que a hidrólise ocorre.

A adição de surfactantes no meio reacional requer novas etapas de separação para purificação dos produtos desejados (DOSSAT; COMBES; MARTY, 2002), porém, para avaliar a produção de emulsões utilizando irradiação de ondas ultrassônicas foi optado por utilizar goma arábica para evitar instabilidades da emulsão. Uma possível solução para o problema de separação seria a utilização de uma etapa de pré-hidrólise com uma quantidade mínima de enzima, de tal forma que durante a formação da emulsão utilizando o ultrassom a presença de MAG e DAG do óleo pré-hidrolisado atuem como surfactantes e aumente a estabilidade da emul-

são sem adição de surfactantes externos.

5.4 Efeitos do Tempo de Pré-emulsificação

O tempo de exposição as ondas ultrassônicas também é um fator relevante na estabilidade de emulsões e do tamanho das partículas suspensas (ABISMAÏL et al., 1999; LEONG et al., 2009). A Figura 5.4.1 exibe a dependência da taxa inicial de hidrólise em função do tempo de pré-emulsificação para a reação com e sem o uso de surfactante. As reações foram executadas de acordo com a metodologia de pré-emulsão, e o tempo de emulsificação foi variado entre 1 s a 5 min. A reação foi conduzida com fração de 7,5% de óleo (m_{OIL}/m_{H_2O}), 2% de enzima (m_{ENZ}/m_{H_2O}) e 40 °C.

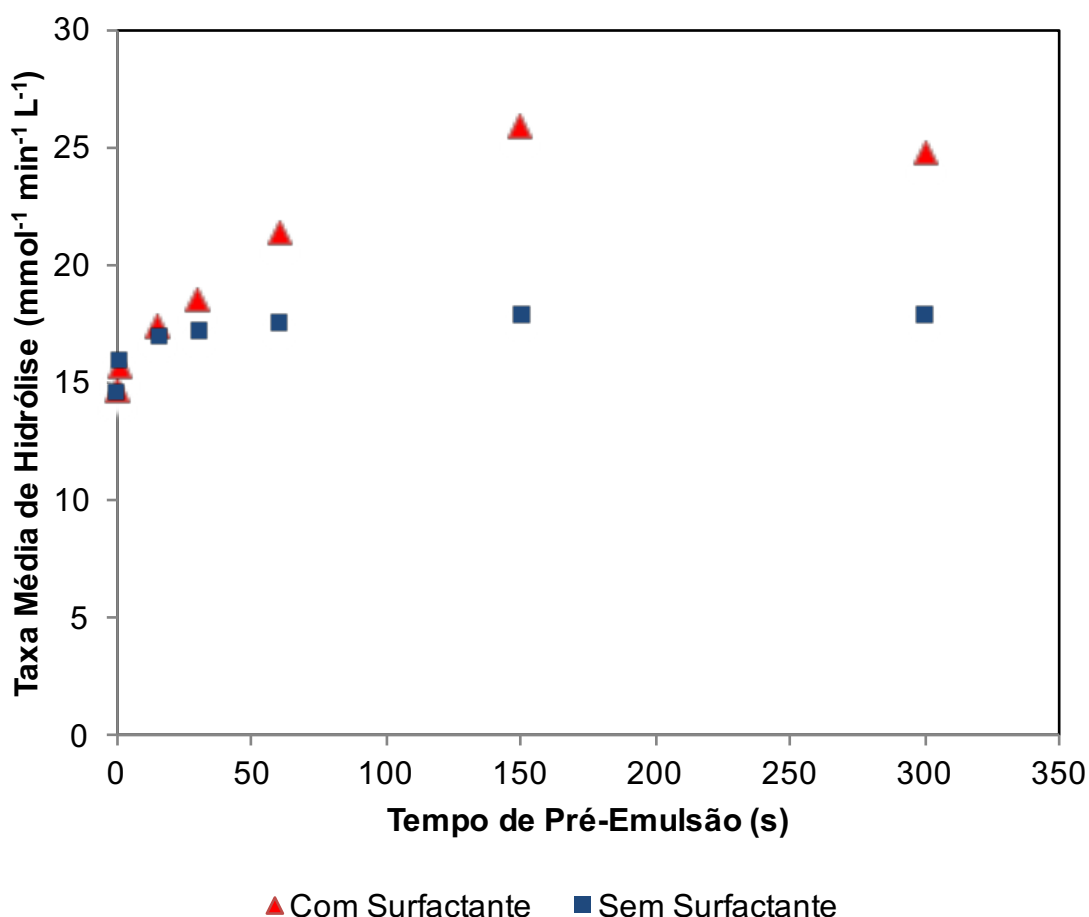


Figura 5.4.1 – Efeito do tempo de pré-emulsificação com e sem utilização de surfactante (Goma Arábica) na taxa inicial média da hidrólise enzimática do Óleo de Soja.

A pré-emulsificação aumentou as taxas iniciais médias mesmo no menor tempo avaliado (1 s). Para a pré-emulsificação sem o uso de surfactante, o efeito do uso do ultrassom foi menos significativo e não variou significativamente após 30 s de exposição. Para a pré-emulsificação associada ao uso de surfactante (goma arábica) a taxa inicial média de reação aumentou até o tempo de 150 s e depois se manteve. O uso de surfactantes possui duas principais funções: diminuir a tensão superficial dos fluidos em questão e facilitar a formação de gotículas da fase suspensas para reduzir a recalescência (BORWANKAR; LOBO; WASAN, 1992). Enquanto o ultrassom pode ser considerado muito eficiente para formação de gotículas de pequena dimensão em emulsões, a alta tensão superficial entre os substratos quebra a estabilidade da emulsão, e isso pode ser contornado adicionando surfactantes durante o processo de emulsificação.

5.5 Efeitos da Concentração de Lipase

De acordo com Noor, Hasan e Ramachandran (2003), os efeitos causados pelo aumento da concentração de lipase são limitados pela área interfacial entre as fases dos substratos. A partir de uma certa concentração, fica saturada de enzimas, e o aumento da carga enzimática não exibe efeito significativo nas taxas de hidrólise.

As metodologias sem ultrassom (controle) e com pré-emulsificação foram empregadas para avaliar o efeito do ultrassom sobre a carga enzimática na taxa média inicial da hidrólise enzimática do óleo de soja. A Figura 5.5.1 mostra os efeitos da carga enzimática sobre ambas as metodologias. A pré-emulsificação foi realizada com um ultrassom de sonda de 400 W por 5 min, a concentração inicial de óleo foi de 7.5% (m_{OIL}/m_{H_2O}) e a concentração de surfactante (Goma Arábica) foi de 10 g l⁻¹. As reações foram conduzidas com agitação mecânica a 300 RPM e 40 °C. A concentração de enzima foi variada de 1 a 5% em relação a massa de água (m_{ENZ}/m_{H_2O}), pois como a enzima não é solúvel na fase oleosa, apenas essa fase é responsável para definir sua concentração.

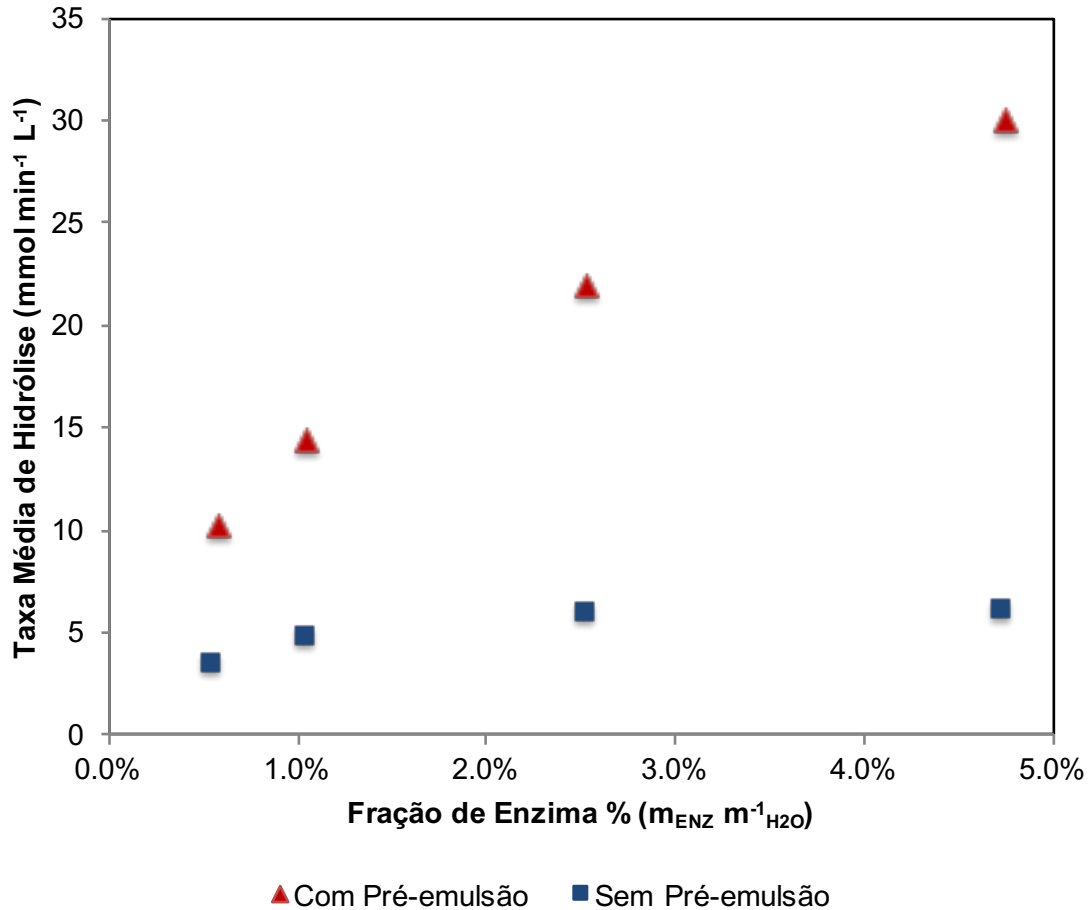


Figura 5.5.1 – Efeito do aumento da carga enzimática na hidrólise enzimática do óleo de Soja.

O aumento da carga enzimática no emprego da metodologia controle, sem o uso de pré-emulsificação, apresentou um aumento insignificante na taxa inicial média da hidrólise, limitada à área interfacial entre os reagentes e apresentando um valor máximo de concentração correspondente a saturação da interface por enzima, resultado semelhante ao encontrado por Noor, Hasan e Ramachandran (2003). O valor máximo encontrado correspondente a saturação da interface por enzima sem o emprego do ultrassom foi de 2% (m_{ENZ}/m_{H_2O}). Porém, o mesmo resultado não se mostrou presente na metodologia com emprego do uso de ultrassom para pré-emulsificação. Nesta metodologia o aumento da carga enzimática provocou um aumento na taxa inicial média de hidrólise em uma faixa muito mais ampla, sugerindo um grande aumento na área interfacial dos substratos quando comparada com a metodologia sem emprego do ultrassom. Portanto, para atingir a saturação

enzimática sugerida por Noor, Hasan e Ramachandran (2003), é necessário uma quantidade maior de enzima para atingir a saturação interfacial.

Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores que empregaram irradiação de ultrassom na catálise enzimática por lipases. Gumel et al. (2012) empregaram a enzima suportada 435 para uma reação de polimerização e encontraram resultado semelhante, porém, a justificativa dos autores para este efeito foi relacionado com a dificuldade de agitação provocada pelo aumento de carga de uma enzima suportada, diminuindo assim a transferência de massa. A mesma justificativa foi utilizada por Liu et al. (2008), que também utilizaram lipase suportada, porém, no caso deles houve evidente redução na taxa da hidrólise ao invés de uma saturação na carga enzimática.

5.6 Modelagem Matemática

O modelo matemático proposto foi resolvido para cada uma das metodologias empregadas na cinética da hidrólise enzimática. A Tabela 5.6.1 apresenta os resultados dos parâmetros do modelo, os coeficientes de correlação (R^2) e os valores da função objetivo (Equação 4.30). Como pode ser visto, todas as simulações apresentaram boas correlações com os dados experimentais, até mesmo a menor das correlações (0,9979) para a metodologia utilizando o ultrassom de sonda foi satisfatória.

As Figuras 5.6.1, 5.6.2, 5.6.3 e 5.6.4 apresentam as simulações realizadas com os parâmetros encontrados para para uma das metodologias de cinética. Inicialmente, pode-se observar que os resultados obtidos pelas simulações para desativação enzimática são coerentes com os resultados experimentais, no qual a reação realizada integralmente assistida pelo ultrassom de sonda cessa rapidamente nos primeiros instantes da reação, apesar de apresentar grandes taxas de reação. Situação semelhante pode ser observada para a metodologia que empregou o ultrassom de banho durante a reação, porém, com uma taxa de desativação enzimática

Tabela 5.6.1 – Resultados obtidos pela otimização dos parâmetros do modelo proposto e da simulação dos resultados.

Constantes de reação	Metodologias de Cinética Empregadas			
	Controle	Banho	Sonda	Pré-Sonda
Hidrólise do TAG k_1 ($l\ g_{ENZ}^{-1}\ min^{-1}$)	$4,033.10^{-03}$	$6,630.10^{-03}$	$2,952.10^{-02}$	$1,958.10^{-02}$
Hidrólise do DAG k_2 ($l\ g_{ENZ}^{-1}\ min^{-1}$)	$5,310.10^{-04}$	$1,855.10^{-04}$	$6,072.10^{-04}$	$7,694.10^{-04}$
Migração Acil k_3 (min^{-1})	$1,093.10^{-03}$	$9,098.10^{-02}$	$6,321.10^{+00}$	$2,432.10^{-03}$
Hidrólise do MAG k_4 ($l\ g_{ENZ}^{-1}\ min^{-1}$)	$1,494.10^{+00}$	$4,062.10^{-01}$	$2,375.10^{+01}$	$2,203.10^{+00}$
Desativação Enzimática k_5 (min^{-1})	$1,420.10^{-09}$	$4,055.10^{-03}$	$1,002.10^{-01}$	$2,393.10^{-11}$
R^2	0,9989	0,9982	0,9979	0,9992
$F_{objetivo}$	$5,053.10^{-05}$	$5,587.10^{-05}$	$1,643.10^{-05}$	$4,063.10^{-05}$

inferior. Percebe-se também que as metodologias de controle e de pré-emulsão apresentaram constantes cinéticas de desativação enzimática (k_5) de magnitude muito pequenas, necessitando de milhares de horas de reação para atingir 1% de desativação enzimática (4500 horas para a metodologia controle).

Percebe-se também que as constantes para a metodologia que empregou ultrassom de sonda durante todo o período reacional foram superiores a todas as outras metodologias. Isso pode ser explicado pelo efeito de microcavitação no qual os fluídos são submetidos quando expostas a ondas ultrassônicas de alta intensidade (SUSLICK; SKRABALAK, 2008). Isso ocorre de forma muito evidente para a constante da migração acil (k_3), que em condições normal ocorre de forma muito lenta, como pode ser visto para as outras metodologias.

Apesar dos resultados obtidos pelas simulações do modelo representaram de forma satisfatória os resultados obtidos experimentalmente, os modelos não são fenomenologicamente consistentes, pois o modelo considera apenas as reações química envolvidas no processo. Como pode ser visto na Tabela 5.6.1, houve significativa variação nas constantes cinéticas das reações química, sendo que segundo a Equação de Arrhenius, as constantes cinéticas deveriam ser função apenas da temperatura para uma mesma reação química (e neste caso a temperatura foi a

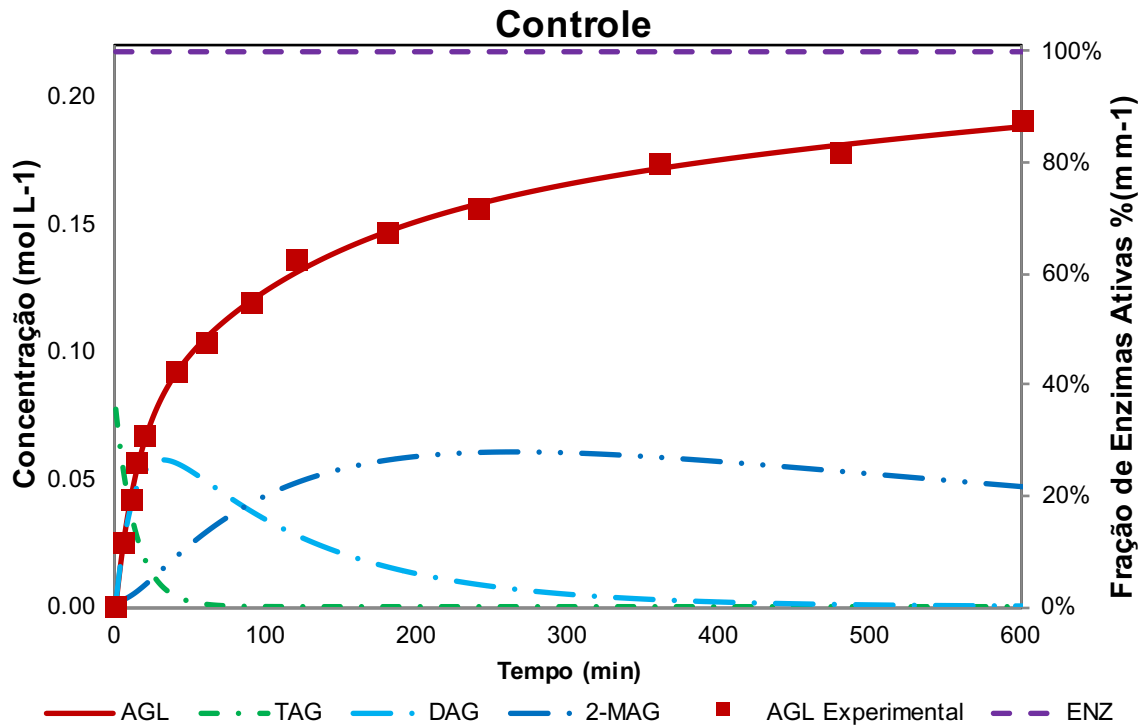


Figura 5.6.1 – Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia controle; Apenas agitação mecânica.

mesma em todas as metodologias).

Ao comparar as constantes cinéticas para as reações controle e com pré-emulsão, percebe uma significativa diferença, mesmo ambas as reações apresentarem praticamente nenhuma desativação enzimática. Isso sugere a necessidade de uma equação no modelo que relacione a qualidade da emulsão para a taxa de transferência de massa do sistema.

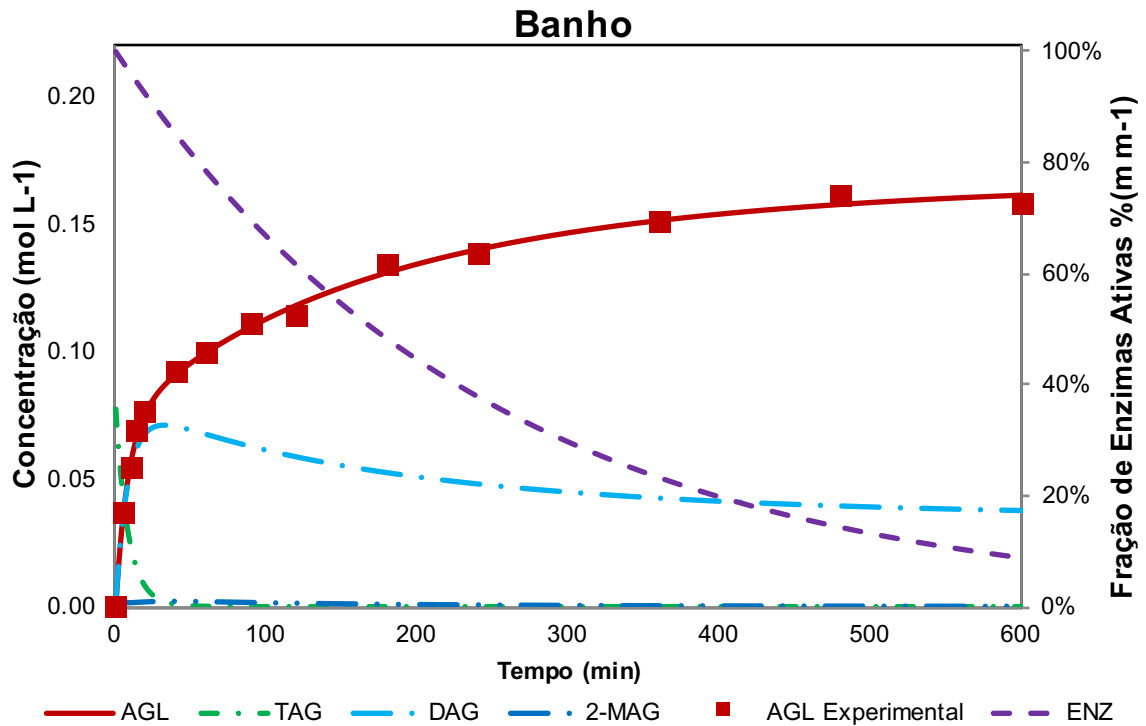


Figura 5.6.2 – Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com ultrassom de banho; Ultrassom de banho ligado durante todo período reacional com agitação mecânica.

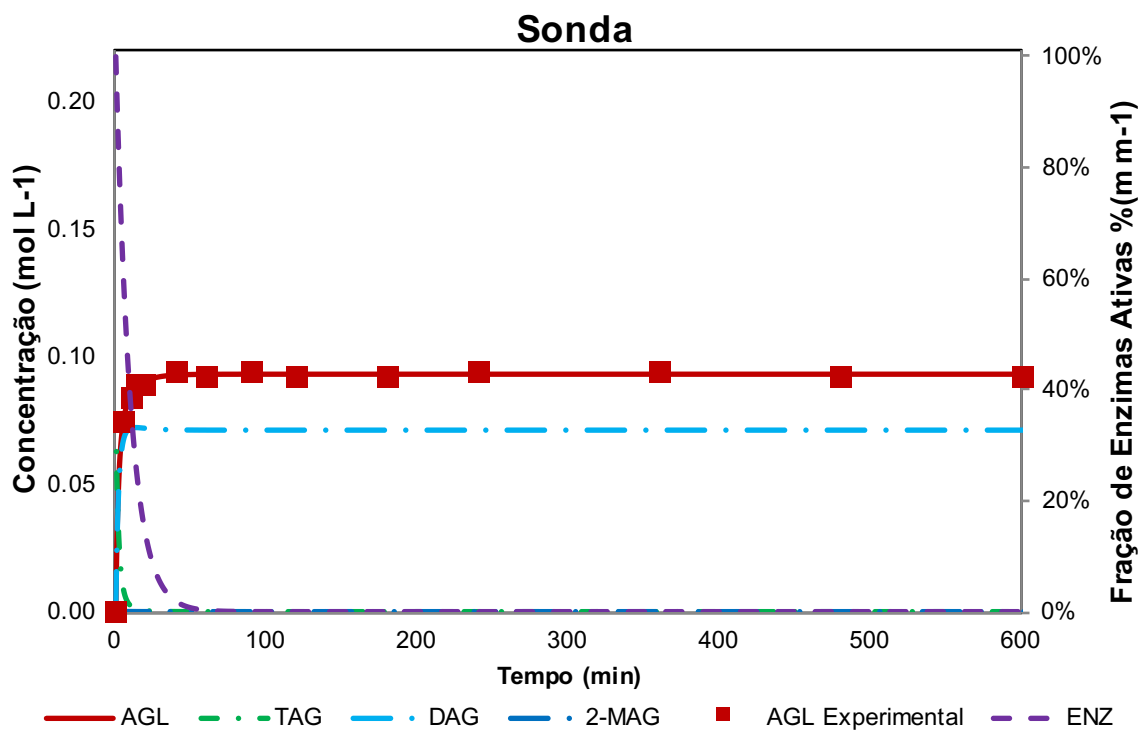


Figura 5.6.3 – Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com ultrassom de sonda; Ultrassom de sonda ligado durante todo período em reator encamisado.

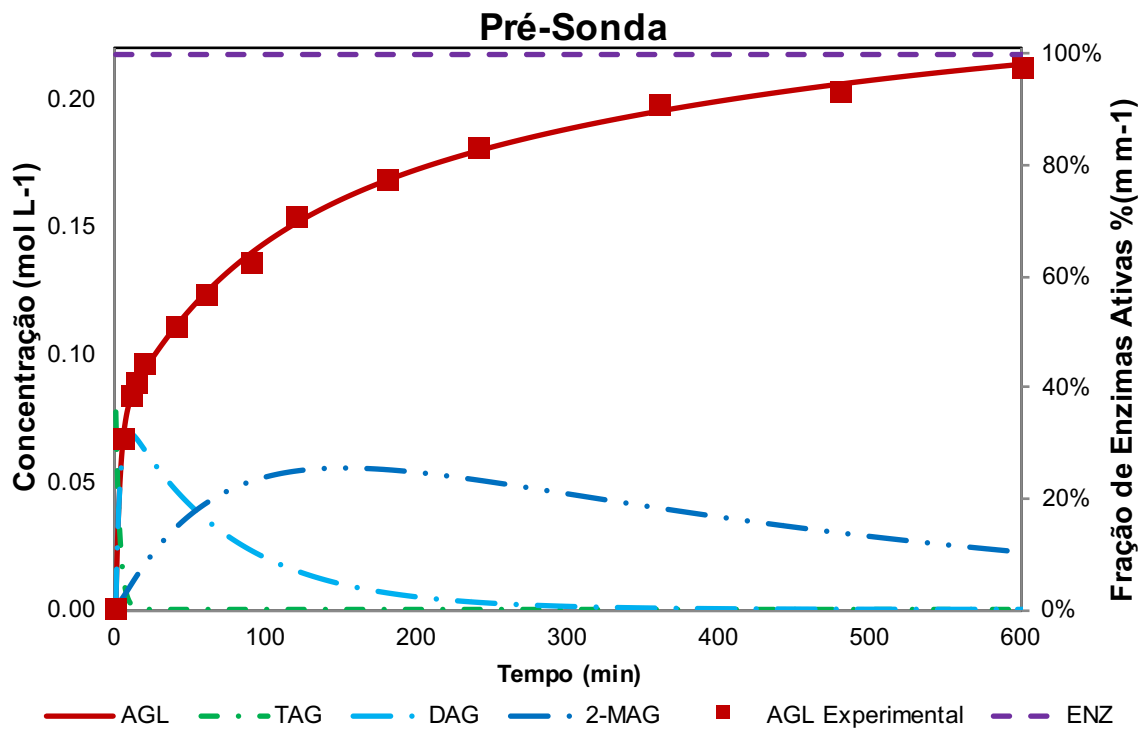


Figura 5.6.4 – Simulação do modelo matemático para a cinética realizada da metodologia com pré-emulsão no ultrassom de sonda; Pré-emulsão no ultrassom de sonda e agitação mecânica durante a reação.

6 Conclusão

Neste trabalho foi estudado quatro diferentes metodologias de aplicação de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de soja com baixas concentrações de óleo, sendo elas: ultrassom de banho, ultrassom de sonda, pré-emulsão com ultrassom de sonda e reação controle (sem ultrassom). Também foi proposto um modelo matemático simplificado para representar os resultados experimentais de acidez. Também foram realizados experimentos para avaliar a influência da concentração de surfactante (goma arábica), tempo de pré-emulsão e carga enzimática.

Os resultados experimentais e das simulações do modelos propostos mostraram que o uso de ultrassom é eficiente em promover aumento na taxa de reação da hidrólise enzimática do óleo de soja. Porém, as metodologias em que o sistema reacional foi exposto a radiação ultrassônica durante todo a reação apresentaram desativação enzimática intensa. Desta forma, a melhor metodologia proposta foi a que empregou ultrassom apenas para formação da pré-emulsão, obtendo boas taxas de reação e evitando a desativação enzimática.

A concentração ideal de surfactante encontrada foi de 10 g L^{-1} . Mesmo nos menores tempos de pré-emulsão (1 s), a taxa foi maior do que sem ultrassom, mostrando a eficiência da agitação ultrassônica. A concentração de saturação de carga enzimática foi de 2% ($m_{ENZ} m_{H_2O}^{-1}$) para a hidrólise sem ultrassom, enquanto que os experimentos com emprego de pré-emulsão não apresentaram saturação, levando a conclusão de que o uso de ultrassom aumenta significativamente a área interfacial entre os reagentes (pelo princípio de atuação das lipases).

7 Sugestões para Trabalhos Futuros

Abaixo estão descritas algumas possibilidades de estudos para melhorar os conhecimentos a cerca do uso de ultrassom na reação de hidrólise enzimática de óleos e gorduras:

- Investigar a relação entre área superficial e atividade enzimática no ponto de saturação enzimática utilizando ultrassom para pré-emulsão;
- Determinar o tamanho das partículas da emulsão;
- Desenvolver um processo que utilize a hidrólise parcial com baixas concentrações de óleo para maximizar a produção de DAG;
- Estudar o uso da pré-emulsão para reação de hidrólise enzimática com baixas concentrações de óleo em reatores contínuos;
- Analisar a área superficial entre as fases para desenvolver um modelo matemático que leve isso em consideração;
- Desenvolver um processo hidroesterificação a partir da proposta de hidrólise deste trabalho.
- Utilizar eletroforese para confirmar a desativação enzimática causada pelo ultrassom;
- Determinar concentrações de TAG, DAG e MAG;

Referências

ABISMAİL, B. et al. **Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 6, n. 1-2, p. 75–83, mar 1999. ISSN 1350-4177. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233941>>.

AGUIEIRAS, E. C. et al. **Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts.** *Fuel*, v. 135, p. 315–321, nov 2014. ISSN 00162361. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114006358>>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Diário Oficial da União. Brasília, DF, de 13 de outubro 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC_482_1999.pdf?MOD=AJPERES>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União. Brasília, DF, de 23 de setembro 2005. Disponível em: <http://www.oliva.org.br/pdf/RDC_270_2005_oleos_gorduras_vegetais_azeite_de_oliva.PDF>.

ALCANTARA, R. et al. **Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow.** *Biomass and Bioenergy*, v. 18, n. 6, p. 515–527, jun 2000. ISSN 09619534. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953400000143>>.

AWADALLAK, J. A. Uso de ultrassom na hidrólise enzimática do óleo de palma: Síntese de diacilglicerol. Dissertação (Mestrado) — Universidade Estadual de Maringá - UEM, 2012.

AWADALLAK, J. A. et al. **Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: diacylglycerol synthesis.** *Ultrasonics sonochemistry*, v. 20, n. 4, p. 1002–7, jul 2013. ISSN 1873-2828. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712002738>>.

BABICZ, I. Produção de diacilgliceróis via hidrólise enzimática do óleo de palma. Tese (Dissertação de mestrado em ciências e tecnologia de processos químicos e bioquímicos) — Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 2009.

BABICZ, I. et al. **Lipase-catalyzed diacylglycerol production under sonochemical irradiation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 17, n. 1, p. 4–6, 2010. ISSN 13504177.

BALCAO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. **Bioreactors with immobilized lipases: State of the art.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 6, p. 392–416, may 1996. ISSN 01410229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022995001255>>.

- BASHARI, M. et al. **Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase**. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 20, n. 1, p. 155–61, jan 2013. ISSN 1873-2828. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417712001332>>.
- BASTIDA, A. et al. **A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports**. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 58, n. 5, p. 486–93, 1998.
- BASTO, C. et al. **Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 14, n. 3, p. 355–362, 2007. ISSN 13504177.
- BERGMEYER, H. **Methods of enzymatic analysis 1**. [S.l.]: Academic Press, 1974.
- BERRIOS, M. et al. **A kinetic study of the esterification of free fatty acids (FFA) in sunflower oil**. *Fuel*, v. 86, n. 15, p. 2383–2388, oct 2007. ISSN 00162361. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236107000798>>.
- BON, E. P. S. et al. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIRJAN / SENAI, 1999. p. 113.
- BORNSCHEUER, U. T. **Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 7, p. 578–586, jul 1995. ISSN 01410229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102299400096A>>.
- BORWANKAR, R. P.; LOBO, L. A.; WASAN, D. T. **Emulsion stability — kinetics of flocculation and coalescence**. *Colloids and Surfaces*, v. 69, n. 2-3, p. 135–146, dec 1992. ISSN 01666622. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016666229280224P>>.
- BOYLE, E.; GERMAN, J. B. **Monoglycerides in membrane systems**. *Critical reviews in food science and nutrition*, Taylor & Francis Group, v. 36, n. 8, p. 785–805, dec 1996. ISSN 1040-8398. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399609527750#.VZQmaBNViko>>.
- BRESSANI, A. P. et al. **Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, p. 287–297, 2014. ISSN 16157591.
- BRUNEAU, M. **Fundamentals of Acoustics**. [S.l.]: Wiley-ISTE, 2010.
- CANAKCI, M.; GERPEN, J. V. **Comparison of engine performance and emissions for petroleum diesel fuel, yellow grease biodiesel, and soybean oil biodiesel**. *Transactions of the ASAE*, v. 46, n. 4, p. 937–944, 2003. Disponível em: <<http://www.prairieswine.com/pdf/3047.pdf>>.
- CASTRO, H. F. de et al. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146–156, feb 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000100025&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt>.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'Avila et al. **Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by Thermomyces lanuginosus Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification**. *Enzyme Research*, v. 2011, p. 1–8, 2011. ISSN 2090-0414. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/er/2011/618692/>>.

CHENGELIS, C. P. et al. **A chronic dietary toxicity study of DAG (diacylglycerol) in Beagle dogs**. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 44, n. 1, p. 81–97, jan 2006. ISSN 0278-6915. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084638>>.

CHEONG, L.-Z. et al. **Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology**. *Food Chemistry*, v. 105, n. 4, p. 1614–1622, jan 2007. ISSN 03088146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607003093>>.

CHEW, Y. H. et al. **Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 3, p. 516–520, may 2008. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07004093>>.

CHU, B. **Factors affecting pre-concentration of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis**. *Food Chemistry*, v. 79, n. 1, p. 55–59, oct 2002. ISSN 03088146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814602001772>>.

CLAUSEN, K. **Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase**. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 103, n. 6, p. 333–340, jun 2001. ISSN 1438-7697.

COLLINS, P. M. **Dictionary of Carbohydrates**. Taylor & Francis, 1997. ISBN 9780412386701. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=LeMcFvqZbpQC>>.

COMPTON, D. L.; VERMILLION, K. E.; LASZLO, J. A. **Acyl migration kinetics of 2-Monoacylglycerols from soybean oil via ¹H NMR**. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 84, n. 4, p. 343–348, 2007. ISSN 0003021X.

DAHLQVIST, a.; STÅHL, U. **Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants**. *Proceedings of the ...*, v. 97, n. 12, p. 6487–92, jun 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=18631&tool=pmcentrez&rendertype=abstracthttp://www.pnas.org/lookup/pmid?view=full&pmid=10829075>>.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. **Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, n. 1, p. 90–94, jan 2002. ISSN 01410229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901004537>>.

FACCIO, C. Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais. Dissertação (Mestrado) — Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Rural Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Campos Erechim. RS, Brasil, 2004.

FEITEN, M. C. et al. **Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Elsevier, v. 3, n. 3, p. 83–85, 2014. ISSN 18788181. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.003>>.

FIAMETTI, K. G. et al. **Kinetics of ultrasound-assisted lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil in solvent-free system.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 19, n. 3, p. 440–451, 2012. ISSN 13504177.

GATT, S.; BARTFAI, T. **Rate equations and simulation curves for enzymatic reactions which utilize lipids as substrates II. Effect of adsorption of the substrate or enzyme on the steady-state kinetics.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, v. 488, n. 1, p. 13–24, jul 1977. ISSN 00052760. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276077901187>>.

GIOIELLI, L. A. **Óleos e Gorduras Vegetais: Composição e Tecnologia.** *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 5, n. 2, p. 211–232, 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X1996000200008&script=sci_arttext>.

GOERING, C. E.; FRY, B. **Engine durability screening test of a diesel oil/soy oil/alcohol microemulsion fuel.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 61, n. 10, p. 1627–1632, oct 1984. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02541647>>.

GUMEL, A. M. et al. **Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of poly-6-hydroxyhexanoate.** *Ultrasonics Sonochemistry*, Elsevier B.V., v. 19, n. 3, p. 659–667, 2012. ISSN 13504177. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.10.016>>.

HIELSCHER, T. **Ultrasonic Production of Nano-Size Dispersions and Emulsions.** aug 2007. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/0708.1831>>.

HUANG, J. et al. **Kinetic study on the effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil: Study of the interfacial area and the initial rates.** *Ultrasonics Sonochemistry*, Elsevier B.V., v. 17, n. 3, p. 521–525, mar 2010. ISSN 13504177. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417709001850>>.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. **Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases.** *Annual review of microbiology*, v. 53, p. 315–351, 1999. ISSN 0066-4227.

JENSEN, C. L.; HEIRD, W. C. **Lipids with an emphasis on long-chain polyunsaturated fatty acids.** *Clinics in Perinatology*, v. 29, n. 2, p. 261–281, 2002. ISSN 00955108.

JONES, E. et al. SciPy: Open source scientific tools for Python. 2001. [Online; accessed 2015-10-20]. Disponível em: <<http://www.scipy.org/>>.

KASAMATSU, T. et al. **Genotoxicity studies on dietary diacylglycerol (DAG) oil**. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 43, n. 2, p. 253–60, feb 2005. ISSN 0278-6915. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691504003060>>.

KINCS, F. R. **Meat fat formulation**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 62, n. 4, p. 815–818, apr 1985. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF03028759>>.

KLIBANOV, A. M. **Improving enzymes by using them in organic solvents**. Nature, Macmillan Magazines Ltd., v. 409, n. 6817, p. 241–6, jan 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/35051719>>.

KODALI, D. R. et al. **Acyl migration in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol**. Chemistry and physics of lipids, v. 52, n. 3-4, p. 163–170, 1990. ISSN 00093084.

KULDILÖKE, J. Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. Tese (Tese de Doutorado) — Technischen Universität Berlin, 2002.

LEONG, T. S. H. et al. **Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 16, n. 6, p. 721–727, 2009. ISSN 13504177.

LERIN, L. A. et al. **A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems**. Bioprocess and biosystems engineering, Springer, v. 37, n. 12, p. 2381–2394, 2014.

LEVINE, R. B.; PINNARAT, T.; SAVAGE, P. E. **Biodiesel Production from Wet Algal Biomass through in Situ Lipid Hydrolysis and Supercritical Transesterification**. Energy & Fuels, American Chemical Society, v. 24, n. 9, p. 5235–5243, sep 2010. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ef1008314>>.

LIU, Y. et al. **The effect of ultrasound on lipase-catalyzed hydrolysis of soy oil in solvent-free system**. Ultrasonics sonochemistry, v. 15, n. 4, p. 402–7, apr 2008. ISSN 1350-4177. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998168>>.

LÖNING, J. M.; HORST, C.; HOFFMANN, U. **Investigations on the energy conversion in sonochemical processes**. Ultrasonics Sonochemistry, v. 9, n. 3, p. 169–179, 2002. ISSN 13504177.

MACHADO, G. D. et al. **Computer Simulation of Biodiesel Production By Hydro-esterification**. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2015. v. 1, n. 2, p. 11119–11126. ISSN 23591757. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/computer-simulation-of-biodiesel-production-by-hydro-esterification-18031><http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/18031>>.

MACHADO, M. S. et al. **Selective synthesis of glycerol monolaurate with zeolitic molecular sieves**. *Applied Catalysis A: General*, v. 203, n. 2, p. 321–328, oct 2000. ISSN 0926860X. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926860X00004932>>.

MAKI, K. C. et al. **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**. *The American journal of clinical nutrition*, v. 76, n. 6, p. 1230–6, dec 2002. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12450887>>.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. **Engineering triacylglycerols: The role of interesterification**. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, n. 10, p. 329–335, oct 1995. ISSN 09242244. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224400891670>>.

MASON, T. J.; PETERS, D. **Practical Sonochemistry: Power Ultrasound Uses and Applications**. [s.n.], 2002. ISBN 1782420622. Disponível em: <<https://books.google.com/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZwbnAgAAQBAJ&pgis=1>>.

MATOS, L. M.; LEAL, I. C.; SOUZA, R. O. de. **Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, n. 1-2, p. 36–39, oct 2011. ISSN 13811177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117711001251>>.

MATSUO, N. **Nutritional Characteristics and Health Benefits of Diacylglycerol in Foods**. *Food Science and Technology Research*, Japanese Society for Food Science and Technology, v. 10, n. 2, p. 103–110, may 2004. ISSN 1344-6606. Disponível em: <<http://ci.nii.ac.jp/naid/10013346478/en/http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/fstr/10.103?from=CrossRef>>.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 10, n. 3, p. 248–268, jun 2006. ISSN 13640321. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032104001236>>.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. **Die kinetik der invertinwirkung**. *Biochem. z.*, v. 49, n. 333-369, p. 352, 1913.

MINAMI, E.; SAKA, S. **Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process**. *Fuel*, v. 85, n. 17-18, p. 2479–2483, dec 2006. ISSN 00162361. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236106001475><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236106001475>>.

MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. **Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system**. *Biotechnology Letters*, Kluwer Academic Publishers, v. 25, n. 8, p. 641–644, 2003. ISSN 01415492. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1023016215537><http://link.springer.com/10.1023/A:1023016215537>>.

- MOQUIN, P. H.; TEMELLI, F. **Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media**. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 45, n. 1, p. 94–101, may 2008. ISSN 08968446. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844607004500>>.
- MUNIYAPPA, P.; BRAMMER, S.; NOUREDDINI, H. **Improved conversion of plant oils and animal fats into biodiesel and co-product**. *Bioresource Technology*, v. 56, n. 1, p. 19–24, apr 1996. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0960852495001786><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852495001786>>.
- MURASE, T. et al. **Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism**. v. 43, p. 1312–9, 2002.
- MURASE, T. et al. **Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice**. *Journal of lipid research*, v. 42, n. 3, p. 372–8, mar 2001. ISSN 0022-2275. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254749>>.
- NAGAO, T. et al. **Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial**. *The Journal of nutrition, American Society for Nutrition*, v. 130, n. 4, p. 792–7, apr 2000. ISSN 0022-3166. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/130/4/792.full>>.
- NAIDU, G. N.; PANDA, T. **Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger***. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, n. 1, p. 57–67, oct 2003. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X03000226>>.
- NELDER, J. A.; MEAD, R. **A Simplex Method for Function Minimization**. *The Computer Journal*, v. 7, n. 4, p. 308–313, jan 1965. ISSN 0010-4620. Disponível em: <<http://comjnl.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/comjnl/7.4.308>>.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. [S.l.]: Artmed, 2011. p. 1274. ISBN 978-85-363-2418-0.
- NOOR, I.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. **Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase**. *Process Biochemistry, Elsevier*, v. 39, n. 1, p. 13–20, sep 2003. ISSN 13595113. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/els/00329592/2003/00000039/00000001/art00263>>.
- OSAKI, M.; BATALHA, M. **Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: realidade e desafio**. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v. 13, n. 2, p. 227–242, 2011. Disponível em: <<http://ideas.repec.org/p/ags/sbrfsr/108146.html>>.
- ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. O. **The stability of enzymes after sonication**. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 9, p. 1037–1043, 2000. ISSN 13595113.
- PERSSON, M. et al. **Preparation of lipases for use in organic solvents**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n. 6, p. 833–841, nov 2002. ISSN 01410229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902001849>>.

PHUAH, E.-T. et al. **Kinetic study on partial hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 91–97, jun 2012. ISSN 13811177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117712000689>>.

PYO, Y.-G. et al. **Synthesis of monoacylglycerol containing pinolenic acid via stepwise esterification using a cold active lipase**. *Biotechnology Progress*, v. 28, n. 5, p. 1218–1224, sep 2012. ISSN 87567938. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753389><http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.1596>>.

RAMACHANDRAN, K. et al. **Kinetic study on hydrolysis of oils by lipase with ultrasonic emulsification**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 32, n. 1, p. 19–24, nov 2006. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X0600218X>>.

RASO, J. et al. **Influence of different factors on the output power transferred into medium by ultrasound**. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 5, n. 4, p. 157–162, jan 1999. ISSN 13504177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135041779800042X>>.

RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. **Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 47, n. 1-3, p. 93–99, dec 2009. ISSN 1369703X.

REETZ, M. T. **Lipases as practical biocatalysts**. *Current opinion in chemical biology*, v. 6, n. 2, p. 145–50, apr 2002. ISSN 1367-5931. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12038997>>.

RIBEIRO, C. M. R.; PASSAROTO, E. N.; BRENELLI, E. C. S. **Ultrasound in enzymatic resolution of ethyl 3-hydroxy-3-phenylpropanoate**. *Tetrahedron Letters*, v. 42, n. 37, p. 6477–6479, 2001. ISSN 00404039.

ROSADO, E. L.; MONTEIRO, J. B. R. **Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta**. *Rev. Nutr.*, v. 14, n. 2, p. 145–152, 2001.

ROSU, R. et al. **Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil**. v. 74, n. 4, p. 445–450, 1997.

RUDKOWSKA, I. et al. **Diacylglycerol: efficacy and mechanism of action of an anti-obesity agent**. *Obesity research*, v. 13, n. 11, p. 1864–76, nov 2005. ISSN 1071-7323. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339116>>.

RUSSELL, J. B. **Química geral**. [S.l.]: McGraw-Hill, 1981.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. **Chemistry and biochemistry of palm oil**. *Progress in lipid research*, v. 39, n. 6, p. 507–558, 2000. ISSN 0163-7827.

SANTOS, J. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2011.

- SCHMID, R. D.; VERGER, R. **Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications**. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, jul 1998. ISSN 1433-7851.
- SCHÜGERL, K. **Development of bioreaction engineering**. [S.l.]: Springer, 2000. p. 41–76.
- SCRIMGEOUR, C. **Chemistry of fatty acids**. 6. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 1–44.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. **Production, purification, characterization, and applications of lipases**. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 8, p. 627–662, dec 2001. ISSN 07349750. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975001000866>>.
- SIKORSKI, Z. Z. E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. [S.l.]: CRC Press, 2002.
- SINISTERRA, J. **Application of ultrasound to biotechnology: an overview**. *Ultrasonics*, v. 30, n. 3, p. 180–185, jan 1992. ISSN 0041624X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041624X92900703>>.
- SOUSA, J. S. de et al. **Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 65, n. 1-4, p. 133–137, aug 2010. ISSN 13811177. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117710000044>>.
- SUSLICK, K. S.; SKRABALAK, S. E. **Handbook of Heterogeneous Catalysis**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 2006–2017. ISBN 3527292128.
- TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P.-L. **Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification**. *Energy & Fuels*, v. 24, n. 3, p. 2016–2019, mar 2010. ISSN 0887-0624. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef9011824>>.
- TANAKA, Y.; HIRANO, J.; FUNADA, T. **Concentration of docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase**. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 69, n. 12, p. 1210–1214, dec 1992. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02637682>>.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. B. **Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks**. *Applied Engineering in Agriculture*, v. 60, n. 23, p. 5915–21, jun 2012. ISSN 1520-5118.
- VOLESKY, B. **Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century**. *Hydrometallurgy*, v. 59, n. 2-3, p. 203–216, feb 2001. ISSN 0304386X.
- VOLL, F. A. P. **Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do Óleo de Palma**. Tese (Tese de doutorado em Engenharia Química) — Universidade Estadual de Maringá - UEM, 2011.

- VOLL, F. A. P. et al. **Kinetic Modeling of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis of Palm Oil**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 168, n. 5, p. 1121–1142, 2012. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-012-9846-x>>.
- WALT, S. van der; COLBERT, S. C.; VAROQUAUX, G. **The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation**. Computing in Science & Engineering, v. 13, n. 2, p. 22–30, mar 2011. ISSN 1521-9615. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=5725236>>.
- WANG, W. et al. **Production of extremely pure diacylglycerol from soybean oil by lipase-catalyzed glycerolysis**. Enzyme and microbial technology, v. 49, n. 2, p. 192–6, jul 2011. ISSN 1879-0909. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112408>>.
- WANG, Y. et al. **Preparation of a diacylglycerol-enriched soybean oil by phospholipase A1 catalyzed hydrolysis**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 56, n. 2-3, p. 165–172, feb 2009. ISSN 13811177. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381117708001690>>.
- WANG, Y. et al. **Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra)**. Food Chemistry, v. 121, n. 4, p. 1066–1072, aug 2010. ISSN 03088146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610001317>>.
- WATANABE, T. et al. **Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase lipozyme RM IM**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 80, n. 12, p. 1201–1207, dec 2003. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11746-003-0843-5>>.
- WATANABE, T. et al. **Diacylglycerol production in a packed bed bioreactor**. Process Biochemistry, v. 40, n. 2, p. 637–643, feb 2005. ISSN 13595113. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003295920400086X>>.
- WU, J.; ZHANG, G.; HE, Z. **No Title**. Biotechnology Letters, Kluwer Academic Publishers, v. 23, n. 3, p. 211–214, 2001. ISSN 01415492. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005675807353><http://link.springer.com/10.1023/A:1005675807353>>.
- XIE, W.; LI, H. **Alumina-supported potassium iodide as a heterogeneous catalyst for biodiesel production from soybean oil**. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 255, n. 1-2, p. 1–9, aug 2006. ISSN 13811169. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116906007126><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381116906007126>>.
- YACHMENEV, V. G.; BLANCHARD, E. J.; LAMBERT, A. H. **Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton**. Ultrasonics, v. 42, n. 1-9, p. 87–91, apr 2004. ISSN 0041-624X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041624X04000101>>.
- YANAI, H. et al. **Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome**. Nutrition journal, v. 6, p. 43, jan 2007. ISSN 1475-2891. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2235882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

YASUKAWA, T.; KATSURAGI, Y. **Diacylglycerols**. AOCS Press, 2004. p. 1–15. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/20043188819.html;jsessionid=EB1B950E0B1D45F8D6E9F9EFF7EE7875;jsessionid=C15FE35364B405BEDD1CF7F65D7F0A88?freeview=true>>.

ZHONG, N. et al. **High yield of monoacylglycerols production through low-temperature chemical and enzymatic glycerolysis**. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 115, n. 6, p. 684–690, jun 2013. ISSN 14387697. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201200377>>.