



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

**ESTUDO DA CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA:
EXPERIMENTAL E MODELAGEM**

MELINE GURTAT

TOLEDO – PR

Abril 2018

MELINE GURTAT

**ESTUDO DA CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA:
EXPERIMENTAL E MODELAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba

Co-orientadora: Profa. Dra. Camila da Silva

TOLEDO – PR

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

G981e Gurtat, Meline
Estudo da cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja :
experimental e modelagem / Meline Gurtat. -- Toledo, PR : [s. n.],
2018.

xiv ; 70 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba

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. Óleos e gorduras 3.
Cinética enzimática 4. Hidrólise 4. Óleo de soja 5. Modelagem
matemática I. Borba, Carlos Eduardo, orient. II. Silva, Camila da,
coorient. III. T.

CDD 20. ed. 660.2994

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

Exame de qualificação apresentada por Meline Gurtat perante Comissão Julgadora do Curso
de Mestrado em Engenharia Química em 22 de março de 2018

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Orientador

Profa. Dra. Daniela Estelita Goes Trigueros
Membro

Prof. Dr. Luciano Tormen
Membro

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus, pois Ele é quem me dá todo suporte e toda força para encarar os obstáculos da vida, e me ajuda a seguir nesse caminho. Em seguida quero agradecer a pessoa mais importante do mundo, minha mãe, Marli Salette Chapieski. Ela é a minha inspiração, meu ânimo, minha coragem e faz parte de todos os momentos da minha vida, tristes ou felizes. Mãe, meu gigantesco obrigada!

À minha família: avós, tios e tias, primas (sempre dizendo que sou uma influência), obrigada por compartilhar comigo essa experiência. Por mesmo sem saber nada do assunto, ainda me perguntam com que trabalho! Agradeço de coração, e com um coração cheio de saudade, ao meu namorado, Cláudio Reatto Porcel. Obrigada amor, por toda paciência, companheirismo, pelas correções de texto, e principalmente por continuar do meu lado me apoiando sempre! O meu agradecimento se estende também à um “serzinho” maravilhoso, ao meu afilhado Felipe Reynaud, que me deixa louca toda vez que quer fazer experiências no seu “laboratório” (vai seguir os passos da madrinha haha). Obrigada a todos vocês, meus amores!

Agradeço sem medidas também, ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba, por toda sabedoria, paciência, criatividade, e sem dúvida por todo esforço durante esse período. Todos os alunos falavam do tamanho da sua bondade e sabedoria, e foi um imenso prazer para mim poder compartilhar disso!

Agradeço as professoras, Daniela Estelita Goes Trigueros e Maria Luiza Fernandes Rodrigues pela disponibilidade e colaboração, pelas ótimas dicas, e toda contribuição. Obrigada!

Agradeço ao meus ex-orientadores Prof. Dr.: Wanderson Wanzeller. Carlos Augusto Dagnone e Prof. Gian de Castro, também aos Profs. Drs da UFFS, Luciano Tormen, Eduarda Bainy, Thiago Bergler Bitencourt e Gustavo Fidelis dos Santos, por desde o início da graduação, plantarem a sementinha do conhecimento e da curiosidade em mim. Por me incentivarem a crescer em conhecimento e como pessoa. Vou estar sempre em débito com vocês!

E o que somos sem os amigos? Eles nos distraem, nos fazem rir e algumas vezes chorar, mas, na maioria das vezes nos ajudam a engordar (risos). A vida é muita chata sem eles, então meu “muito obrigada” a: Angélica Bertolo, Betina Koop, Daia Lançanova, Carol Sayury, Carol Trentini, Samara Marcon, Sabryna Giordani, Polly Locatelli, Josemara Martins, Luana Braun

e Júnior Staudt. Agradeço também a minha Líder Maura, obrigada por todas as orações e todo o carinho. Vocês foram essenciais para os meus dias!

Enfim, tive o prazer de conhecer muitas outras pessoas, pessoal do laboratório (Toledo e Umuarama), colegas e professores, à cada um de vocês, obrigada!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
NOMENCLATURAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. ÓLEOS E GORDURAS.....	3
3.2. ÓLEO DE SOJA.....	6
3.3. TRANSFORMAÇÕES E APLICAÇÕES DE ÓLEOS E GORDURAS.....	7
3.3.1. Hidrólise de Óleos Vegetais	9
3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS.....	11
3.5. CATALISADORES ENZIMÁTICOS.....	12
3.5.1. Lipozyme TL IM	17
3.6. FATORES QUE INFLUENCIAM NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	17
3.7. MECANISMO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	20
3.8. ESTADO DA ARTE.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. MATERIAIS.....	27
4.2. MÉTODOS.....	27
4.2.1. Reação de Hidrólise	27
4.2.2. Determinação do Índice de Acidez	28
4.3. Avaliação da Atividade Enzimática durante o Processo Reacional	29
4.3.1. Fisissorção de N₂	29
5. MODELAGEM MATEMÁTICA	31
5.1. MODELO 1 – MECANISMO PPBBS SEM INIBIÇÃO COMPETITIVA.....	31
5.2. MODELO 2 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO POR ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.....	33
5.3. MODELO 3 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO PELO GLICEROL.....	33

5.4. MODELO 4 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E GLICEROL	34
5.5. RESOLUÇÃO DOS MODELOS E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1. CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA.....	37
6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE O PROCESSO REACIONAL	42
6.3. FISISSORÇÃO DE N ₂ DA LIPOZYME TL IM.....	47
6.4. MODELAGEM MATEMÁTICA	49
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1. Estrutura molecular do triacilglicerol (TAG).....	5
Figura 3. 2. Estrutura molecular do diacilglicerol (DAG).....	5
Figura 3. 3. Estrutura molecular do monoacilglicerol (MAG).....	6
Figura 3. 4. Mecanismo simplificado de hidrólise de um triacilglicerol.....	9
Figura 3. 5. Fluxograma de produção do biodiesel via hidroesterificação.....	10
Figura 3. 6. Representação esquemática da influência da concentração da enzima (A) e da concentração do substrato (B) na velocidade de reação.....	18
Figura 3. 7. Efeito da temperatura sobre a constante de velocidade de uma reação catalisada por enzima.....	19
Figura 3. 8. Representação da velocidade de reação sobre o pH do meio reacional.....	19
Figura 3. 9. Mecanismo de reação de dois substratos sem a formação de grupos ternários: (A) PPBB; e com a formação de grupos ternários: (B) PPBB ordenado e (C) PPBB randômico..	21
Figura 3. 10. Mecanismo da catálise enzimática do óleo vegetal proposto por Al-Zuhair et al., 2007 – PARTE I.....	22
Figura 3. 11. Mecanismo da catálise enzimática do óleo vegetal proposto por Al-Zuhair et al., 2007 – PARTE II.....	22
Figura 3. 12. Mecanismo cinético de inibição competitiva de I pelo sítio da enzima.....	25
Figura 4. 1. Representação esquemática para o processo de hidrólise enzimática do óleo de soja.....	28
Figura 6. 1. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 40°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).....	38
Figura 6. 2. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 52°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).....	38
Figura 6. 3. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 64°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).....	39
Figura 6. 4. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 40°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).	44

Figura 6. 5. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 52°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)	44
Figura 6. 6. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 64°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)	45
Figura 6. 7. Isoterma de fisissorção de N ₂ (A) e Distribuição do tamanho de poros (B) para a Lipozyme TL IM	48
Figura 6. 8. Estrutura tridimensional de uma molécula de triacilglicerol (MolView)	49
Figura 6. 9. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 9:1	53
Figura 6. 10. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 20:1	53
Figura 6. 11. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 46:1	54
Figura 6. 12. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 60:1	54
Figura 6. 13. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 9:1	57
Figura 6. 14. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 20:1	57
Figura 6. 15. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 46:1	58
Figura 6. 16. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 60:1:	58

Figura 6. 17. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 9:1.	59
Figura 6. 18. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 20:1.	59
Figura 6. 19. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 46:1.	60
Figura 6. 20. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 60:1.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1. Classificação dos lipídeos.....	4
Tabela 3. 2. Composição de Ácidos graxos no Óleo de Soja.....	7
Tabela 3. 3. Estudos da literatura com hidrólise enzimática de óleos vegetais com diferentes condições operacionais	13
Tabela 3. 4. Classificação internacional das enzimas.....	15
Tabela 3. 5. Mecanismo Pingue-Pongue para a hidrólise enzimática do óleo de soja	23
Tabela 3. 6. Mecanismo PPBB simplificado para a hidrólise enzimática do óleo de soja.....	24
Tabela 5. 1. Mecanismo PPBBS sem inibição.....	31
Tabela 5. 2. Discriminação do conjunto de equações utilizadas para cada modelo matemático (1, 2, 3 e 4).....	36
Tabela 6. 1. Resultados de rendimento de ácidos graxos livres da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.....	37
Tabela 6. 2. Resultados da taxa inicial da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja.....	40
Tabela 6. 3. Percentual de redução da atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM no processo de hidrólise enzimática	43
Tabela 6. 4. Resultados dos parâmetros morfológicos para a enzima Lipozyme TL IM.....	47
Tabela 6. 5. Valores dos coeficientes de velocidades específicas calculados pelo modelo matemático.....	51
Tabela 6. 6. Valores dos coeficientes de determinação (R^2) e do critério corrigido de informação Akaike (AICc) estimados pelos modelos aos dados experimentais da hidrólise enzimática do óleo de soja, sob diferentes temperaturas.	52
Tabela 6. 7. Concentrações simuladas dos componentes (monoacilgliceróis e glicerol) com base no Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição	55

NOMENCLATURAS

Ac	Índice de acidez
AE	Atividade Enzimática
AGL	Ácido Graxo Livre
AICc	Crítério de Informação Akaike Corrigido
AOCS	American Oil Chemists Society
ATP	Adenosina Trifosfato
A/O	Água/Óleo
BET	BRUNAUER-EMMETT-TELLER
BJH	BARRETT-JOYNER-HALENDA
DAG	Diacilglicerol
d_p	Tamanho médio dos poros
DR	DUBININ-RADUSHKEVICH
E	Enzima
EAGL	
EDAG	Complexo Enzima-Diacilglicerol
EI	Complexo Enzima-Inibidor
EMAG	Complexo Enzima-Monoacilglicerol
EP	Complexo Enzima-Produto
EP₂	Complexo Enzima-Produto 2
ES	Complexo Enzima-Substrato
ES₁	Complexo Enzima-Substrato 1
ETAG	Complexo Enzima-Triacilglicerol
E'	Enzima modificada
E'P₁	Complexo Enzima modificada-Produto 1

E'S₂	Complexo Enzima modificada-Substrato 2
E'DAG	Complexo Enzima modificada-Diacilglicerol
E'GLI	Complexo Enzima modificada-Glicerol
E'H₂O	Complexo Enzima modificada-Água
E'MAG	Complexo Enzima modificada-Monoacilglicerol
Fc	Fator de correção (solução NaOH)
fOB	Função Objetivo
GLI	Glicerol
I	Inibidor
LabCatProBio	Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustíveis
ma	Massa da amostra
MAG	Monoacilglicerol
M_{NaOH}	Massa molecular de NaOH
M1	Modelo 1
M2	Modelo 2
M3	Modelo 3
M4	Modelo 4
n	número de ensaios
nc	número de componentes da reação
nd	número de dados experimentais
P	Produto
p	número de parâmetros AICc
P₁	Produto 1
P₂	Produto 2
PM_{AGL}	Peso molecular do AGL
PPBB	Pingue-Pongue Bi Bi

PPBBS	Pingue-Pongue Bi Bi Simplificado
R	Constante dos gases ideias
RM	Razão molar
S	Substrato
S₁	Substrato 1
S₂	Substrato 2
S_{BET}	Área superficial específica
T	Temperatura
TAG	Triacilglicerol
t_r	tempo de reação
UFPR	Universidade Federal do Paraná
V	Volume
V_P	Volume total de poro
[I]	Concentração de Inibidor
[S]	Concentração de Substrato
α	Energia de ativação
k	Constante de velocidade específica
k_0	Constante de velocidade específica inicial

GURTAT, Meline. Estudo da Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja: Experimental e Modelagem. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Campus Toledo, 2017.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme TL IM diante da variação de condições experimentais razão molar água/óleo e temperatura, bem como determinar por meio de modelagem matemática, os perfis de concentrações de acilgliceróis (TAG, DAG e MAG), glicerol, e ácidos graxos livres e água. Para tanto, foram realizados experimentos cinéticos em reator batelada tipo tanque agitado. Os experimentos foram conduzidos com diferentes razões molares água/óleo (9:1, 20:1, 46:1 e 60:1) e diferentes temperaturas (40, 52 e 64°C), em condições constantes de dosagem de enzima (1% em relação a massa de óleo) e velocidade de agitação (250 rpm). O rendimento das reações foi quantificado em termos da concentração de ácidos graxos livres. Para descrever a cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja, foi empregado o mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi Simplificado considerando quatro hipóteses: sem inibição competitiva; com inibição pelo ácido graxo livre; com inibição pelo glicerol, e, com inibição de ambos os produtos. Os melhores rendimentos foram obtidos utilizando a razão molar água/óleo 46:1 e 60:1, nas temperaturas de 52 e 64°C (ambas com 77%), indicando a influência destas variáveis no processo de hidrólise do óleo pela ação da enzima Lipozyme TL IM. A partir dos valores do critério corrigido de informação Akaike e do coeficiente de determinação foi verificado que o Modelo 1 – Mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi Simplificado sem inibição competitiva descreveu bem curvas cinéticas experimentais e, forneceu resultados fisicamente consistentes dos perfis de concentrações dos demais componentes da reação (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol, ácido graxo livre e água).

Palavras-chave: Hidrólise enzimática, Óleo de soja; Lipozyme TL IM; Modelagem matemática.

GURTAT, Meline. Study of the Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Soybean Oil: Experimental and Modeling. Master Thesis in Chemical Engineering. State University of Western Paraná – UNIOESTE/Campus Toledo, 2017.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the kinetic hydrolysis of soybean oil by action of the Lipozyme TL IM enzyme, especially the effect of the operational conditions such as water/oil molar ratio and temperature. In addition, to evaluate the capability of mathematical models to describe kinetic data including all compounds of the reaction (acylglycerols, glycerol, free fatty acids and water). Kinetic experiments, in batch reactor, were performed at different water/oil molar ratios (9:1, 20:1, 46:1 and 60:1) and temperatures (40, 52 and 64°C) under constant enzyme dosage (1% in relation to the oil mass) and stirring speed (250 rpm). The reaction yield was determined based on the free fatty acids concentration. Mathematical models based on the simplified Bi Bi Ping-Pong kinetic mechanism were used to describe kinetic data. The models were applied considering inhibition and non-inhibition by products of the reaction (without competitive inhibition; with inhibition by the free fatty acid; with inhibition by glycerol, with inhibition of both products). In the 46:1 and 60:1 water/oil molar ratios at temperatures of 52 and 64°C was achieved the higher reaction yield (77%). From the criterion of information Akaike and coefficient of determination values, it was verified that the mathematical model that consider non-inhibition by reaction products described better kinetic experimental data in all conditions. In addition, this model provided physically consistent results of the concentration profiles of the reaction compounds (triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols, glycerol, free fatty acid and water).

Keywords: Enzymatic hydrolysis; Soybean oil; Lipozyme TL IM, Mathematical modeling.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos, gorduras e seus derivados são produtos amplamente difundidos pelas indústrias químicas, farmacêuticas, de alimentos e de bioenergia. Eles despertam interesse na exploração de matérias-primas renováveis, tais como os óleos vegetais, tendo como resultado um número significativo de produtos de alto valor agregado (SATYARTHI et al., 2011; MELLO et al., 2015). Incluí estes: revestimentos, adesivos, surfactantes, óleos lubrificantes, biocombustível entre outros.

A produção de ácidos graxos livres por meio da hidrólise de triacilgliceróis desperta interesse na exploração de matérias primas renováveis, como os óleos vegetais, além da utilização de óleos residuais. A hidrólise é uma reação homogênea que ocorre na fase de óleo e apenas uma pequena parcela da reação ocorre na fase interativa de óleo e água durante o período de indução (LASCARAY et al., 1952), mais tarde. À medida que a reação prossegue, ácidos graxos livres são produzidos, aumentando o índice de acidez da amostra (PUPO et al., 2011). A reação é reversível; na prática, a hidrólise é favorecida por uso excessivo de água, altas temperaturas, pressão e ação de enzimas lipolíticas ou catalisadores químicos.

A hidrólise enzimática apresenta vantagens técnicas e econômicas. Pode ser realizada em condições amenas, como temperaturas mais brandas e pressão atmosférica, levando a um menor gasto energético em comparação aos processos físico-químicos (POURZOLFAGHAR et al., 2016).

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases. As lipases são classificadas como catalisadores enzimáticos, e são consideradas carboxilesterases que catalisam a hidrólise de ligações éster em triacilgliceróis (TAG), produzindo diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), glicerol (GLI) e ácidos graxos livres (AGL) (JAEGER et al, 1999; CASTRO et al., 2009; POURZOLFAGHAR et al., 2016). Entre os processos de maior interesse industrial estão as reações de hidrólise (CASTRO et al., 2004; OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009).

A cinética da hidrólise enzimática de acilgliceróis pode ser influenciada por diversas variáveis, como: temperatura, pH, velocidade de agitação, razão mássica de enzima/substrato, razão molar água/óleo, entre outros. Uma vez que ao aumentar temperatura eleva-se também a velocidade de reação, cabe investigar esse fator em conjunto com a razão molar água/óleo, pois este tem se mostrado um fator relevante quando deseja-se atingir uma hidrólise total

(ZENEVICZ et al., 2016). Diante dos fatores citados ao longo do texto, entende-se que há uma necessidade em aprofundar os estudos referentes a hidrólise enzimática variando as suas condições operacionais, bem como a aplicação de modelos matemáticos que permitam ajustar e otimizar estes.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme TL IM diante das variações dos parâmetros experimentais razão molar água/óleo e temperatura. Bem como determinar por meio de modelagem matemática, os perfis de concentrações de acilgliceróis (TAG, DAG e MAG), glicerol, e ácidos graxos livres e água.

Para tanto, foram definidos os seguintes objetivos específicos: (i) obtenção de dados cinéticos da hidrólise do óleo de soja com variações de: razão molar água/óleo, temperatura e pH; (ii) modelagem matemática da hidrólise enzimática do óleo de soja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ÓLEOS E GORDURAS

Os lipídeos são considerados um grupo de compostos quimicamente diversos, no qual a principal característica em comum que os define é a insolubilidade em água (NELSON & COX, 2014). Óleos e gorduras são classificados como lipídeos. A diferença entre eles é definida quanto ao seu estado físico, pois em temperatura ambiente, lipídeos que são líquidos são chamados de óleos (óleo de soja, milho, algodão, etc.), enquanto os sólidos ou pastosos são chamados de gorduras (manteiga, etc.) (ANVISA, 2005).

As gorduras e óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos (NELSON & COX, 2014). Eles também exercem diversas funções no organismo humano, como por exemplo: (i) componentes estruturais em membranas celulares; (ii) precursores de hormônios e ácidos biliares; (iii) fonte de ácidos graxos essenciais (que não são produzidos pelo organismo); (iv) agem como lubrificantes. Eles também agem como veículos para as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, e K) para alimentação humana (GIOIELLI, 1996; CASTRO et al., 2004). Além de possuírem alto valor alimentício, óleos e gorduras estão entre os primeiros insumos naturais que o homem usou com fins não alimentares, tanto na forma natural como a partir de modificações químicas (NELSON & COX, 2014)

Os lipídeos definem um conjunto de substâncias químicas que não são caracterizadas por algum grupo funcional comum. Eles são caracterizados como lipídeos pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Incluem uma variedade de substâncias químicas como os triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, fosfolipídeos, cerebrosídeos, esteróis, terpenos, ácidos graxos e outras substâncias (GIOIELLI, 1996; JORGE, 2009).

As gorduras e os óleos são derivados de ácidos graxos. São considerados ácidos carboxílicos com cadeias com comprimento variando de 4 a 36 carbonos. Em alguns ácidos graxos, essa cadeia é totalmente saturada (i.e., não contém ligações duplas) e não ramificadas, em outros, a cadeia contém uma ou mais ligações duplas, e, alguns poucos contêm anéis de três carbonos, grupos hidroxila ou ramificações de grupos metila (GIOIELLI, 1996; NELSON & COX, 2014). Os óleos vegetais, como o óleo de milho, óleo de soja e o azeite¹ de oliva são compostos em grande parte por triacilgliceróis com ácidos graxos insaturados.

¹ O termo azeite se diferencia de óleo, pois o azeite é produto do processamento a partir dos frutos (azeite de oliva é obtido por meio do fruto da oliveira), enquanto o óleo é produto com base em sementes e/ou grãos (óleo de soja).

Devido ao amplo grupo de substâncias heterogêneas denominadas lipídeos sua classificação pode ser definida de diferentes formas. A classificação mais generalista distingue dois grandes grupos, os lipídeos polares e apolares. No primeiro grupo (apolares ou neutros) estão os ésteres ácidos graxos com álcoois, e incluem-se nesse grupo os glicerídeos, ceras, esteróis. Enquanto no segundo grupo (polares) estão as substâncias que, além das ligações éster do ácidos graxos e álcool, têm outras funções químicas, como os fosfolipídios e outros lipídeos complexos (JORGE, 2009; NELSON & COX, 2014).

Outra classificação usualmente utilizada divide os lipídeos em simples, compostos ou complexos e derivados. Os lipídeos simples são aqueles que, por hidrólise total, dão origem somente a ácidos graxos e álcoois. Os lipídeos compostos (ou complexos) contêm outros grupos nas moléculas. Os lipídeos derivados são substâncias obtidas por hidrólise dos lipídeos simples e compostos. A Tabela 3.1 apresenta a classificação dos lipídeos (JORGE, 2009).

Tabela 3. 1. Classificação dos lipídeos

Lipídeos Simples	Composição Química
Acilgliceróis	Glicerol + ácidos graxos
Ceras	Ésteres de ácidos graxos + álcoois de alto peso molecular
Lipídeos Compostos	
Fosfolipídeos	Glicerol + ácidos graxos + compostos de ácido fosfórico + base nitrogenada
Esfingomielinas	Esfingosina + ácido graxo + fosfato + colina
Cerebrosídeos	Esfingosina + ácido graxo + açúcar simples
Gangliosídeos	Esfingosina + ácido graxo + carboidrato
Lipídeos Derivados	
Esteróis	Colesterol, fitosteróis
Vitaminas lipossolúveis	A, D, E, e K
Carotenóides	

Fonte: Adaptado de JORGE, 2009.

Ácidos graxos são os principais componentes estruturais dos óleos e gorduras e responsáveis por determinar as suas propriedades físicas, tais como estabilidade, ponto de fusão e características metabólicas. Além dos triacilgliceróis, os óleos e gorduras possuem outros componentes menores como ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, tocoferol, esteróis, e vitaminas de gorduras solúveis (NELSON & COX, 2014).

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

acilgliceróis. Industrialmente, a produção de AGL é realizada por meio da hidrólise de óleos vegetais.

As propriedades físicas e químicas dos óleos e gorduras dependem dos tipos e proporções dos ácidos graxos que os constituem, bem como sua distribuição na molécula de glicerol (JORGE, 2009). Os triacilgliceróis são compostos ésteres formados de uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos. Podem mudar sua consistência dependendo da temperatura ambiente e representam a principal forma de armazenamento no tecido adiposo dos animais (NELSON & COX, 2014). A estrutura do triacilgliceróis é apresentada na Figura 3.1.

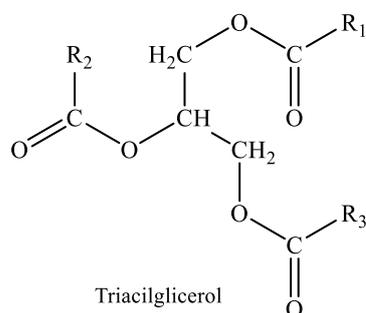


Figura 3. 1. Estrutura molecular do triacilglicerol (TAG)

Os diacilgliceróis são compostos ésteres, os quais são formados por uma molécula de glicerol e duas moléculas de ácidos graxos, conforme a Figura 3.2. Eles podem ser encontrados em duas formas estequiométricas: 1,2-DAG e 1,3-DAG. São utilizados como emulsificantes e estabilizadores de alimentos, cosméticos e nas indústrias farmacêuticas (VOLL & BRITO, 2010). Mesmo possuindo propriedades físico-químicas semelhantes, tanto em relação ao sabor, no cozimento ou frituras de alimentos, o óleo de diacilgliceróis tem melhores propriedades nutricionais que o óleo de triacilgliceróis (YASUNAGA et al., 2004; VOLL & BRITO, 2010; NELSON & COX, 2014).

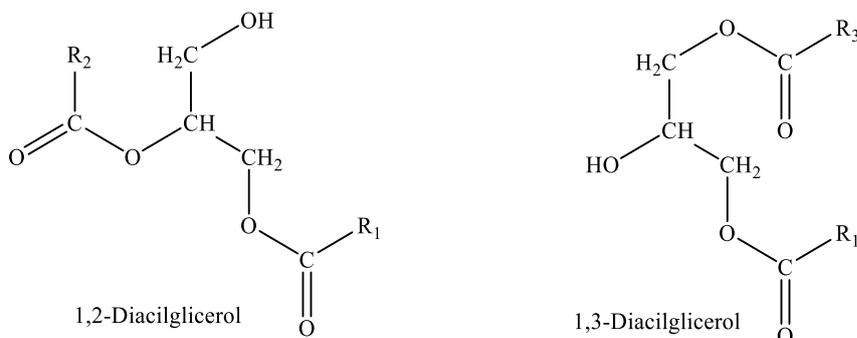


Figura 3. 2. Estrutura molecular do diacilglicerol (DAG)

Os monoacilgliceróis são compostos por apenas uma molécula de ácido graxo substituída na hidroxila de uma molécula de glicerol via ligação éster e possui duas formas estequiométricas: 1-MAG e 2-MAG, conforme a Figura 3.3 (WATANABE et al., 2007). São empregados em maior parte nas indústrias de cosméticos para melhorar a consistência de cremes e loções, e em fármacos como emolientes para emplastos (DOS SANTOS & REZENDE, 2012).

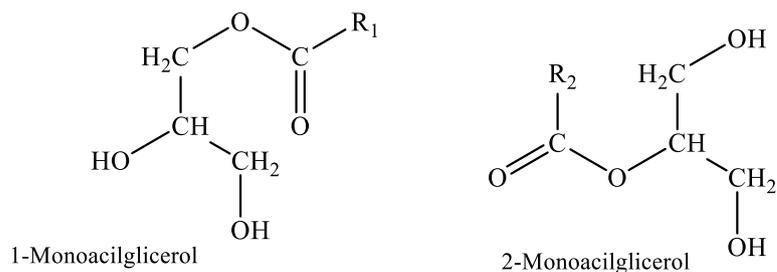


Figura 3.3. Estrutura molecular do monoacilglicerol (MAG)

3.2. ÓLEO DE SOJA

Um dos mais antigos produtos agrícolas que o homem conhece é a soja (*Glycine max*). Seu cultivo iniciou pelos chineses e ao longo do tempo espalhou-se pela Ásia. Em 1914, foi introduzida no Brasil pelos imigrantes japoneses no estado do Rio Grande do Sul. Posteriormente surgiu o interesse na indústria de óleos e, conseqüentemente à demanda do mercado internacional (GIOIELLI, 1996; JORGE, 2009).

Nos dias atuais, a soja domina o mercado mundial tanto de proteína vegetal como de óleo comestível, sendo considerado o mais utilizado no mundo. O óleo de soja surgiu como um subproduto do processamento do farelo de soja e tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (2017), os principais países produtores de soja são: Estados Unidos da América e Brasil. E no Brasil, o estado do Mato Grosso é o maior produtor, seguido do Paraná.

Segundo Jorge (2009), o grão de soja apresenta em sua composição aproximadamente 40% de proteínas; 20% de lipídeos; 17% de celulose e hemicelulose; 7% de açúcares; 5% de fibra e 6% de cinzas. Os ácidos graxos insaturados correspondem a 85% do total de lipídeos no óleo de soja. A Tabela 2.2 apresenta os dados para a composição dos ácidos graxos presentes no óleo de soja, com adaptações de Friedich e List (1982).

Tabela 3. 2. Composição de Ácidos graxos no Óleo de Soja.

Ácidos Graxos	Estrutura	Valores de Referência (%)
Ácido Láurico	C 12:0	≤ 0,1
Ácido Mirístico	C 14:0	≤0,2
Ácido Palmítico	C 16:0	9,7 – 13,3
Ácido Palmitoleico	C 16:1	≤0,2
Ácido Esteárico	C 18:0	3,0 – 5,4
Ácido Oleico (Ômega 9)	C 18:1	17,7 – 30,0
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C 18:2	44,0– 62,0
Ácido Linolênico (Ômega 3)	C 18:3	4,0 – 11,0
Ácido Araquídico	C 20:0	0,1 – 0,6
Ácido Eicosenoico	C 20:1	≤0,3
Ácido Eicosadienoico	C 20:2	≤0,1
Ácido Behênico	C 22:0	0,3 – 0,7
Ácido Erúxico	C 22:1	≤0,3
Ácido Lignocérico	C 24:0	≤0,4

Fonte: Adaptado de FRIEDRICH & LIST (1982).

3.3. TRANSFORMAÇÕES E APLICAÇÕES DE ÓLEOS E GORDURAS

A indústria oleoquímica vem demonstrando um crescente interesse em desenvolver técnicas para modificar as propriedades físico-químicas, funcionais e organolépticas das matérias-primas oleosas. Isto permite uma maior possibilidade de aplicação de seus produtos (KRUGER, 2010).

Os óleos e gorduras naturais podem ser os únicos constituintes de um produto ou podem fazer parte de uma mistura de compostos. Existem casos, em que se torna necessário modificar as características desses a fim de adequá-los a uma determinada aplicação. Logo a estrutura básica desses pode ser redesenhada, por meio de modificações químicas dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triacilglicerol e, também pela reversão da ligação éster (hidrólise) (CASTRO et al., 2004; RAMOS et al., 2011).

O processo de hidrogenação consiste da adição de hidrogênio (H₂) às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, livres ou combinados. Essa reação é de grande importância industrial, pois permite a conversão de óleos em gorduras adequados para a produção de margarinas e para aplicação em produtos de panificação, sorvetes, entre outros. Também pode ser utilizada para melhorar a consistência de gorduras, ou ainda, para reduzir na sensibilidade à rancidez oxidativa. Industrialmente, este processo é realizado por meio da hidrogenação catalítica de duplas ligações, aumentando a ocorrência de ácidos graxos com ponto de fusão

acima da temperatura ambiente. Contudo, neste processo pode ocorrer a produção de ácidos graxos insaturados na forma *trans*² (JORGE, 2009).

Do mesmo modo que as duplas ligações recebem hidrogênio (no processo de hidrogenação) elas podem receber halogênios, o qual é chamado de processo de halogenação. Os halogênios incluem cloro, bromo e principalmente o iodo. Esse processo permite a obtenção de um dos índices de qualidade que caracterizam os óleos, o índice de iodo. Com a determinação deste índice, pode-se avaliar a quantidade de insaturações presentes no triacilglicerol (CASTRO et al., 2004; RAMOS et al., 2011).

A interesterificação, também chamada de transesterificação, é um processo de modificação de óleo e gorduras, pois neste ocorre a quebra de um triacilglicerol específico com remoção de um ácido graxo ao acaso, havendo um embaralhamento deste com o restante dos ácidos graxos e, sua substituição ao acaso por outro ácido graxo. Neste processo, consegue-se modificar a posição dos ácidos graxos entre diferentes posições na hidroxila. Tal reação é utilizada na indústria para modificar o comportamento cristalino de uma gordura e suas propriedades físicas (sem a formação de *trans*). É utilizado amplamente na elaboração de *shortening*³ a partir de banha, melhorando as características plásticas e suas qualidades emulsificantes, tornando-as adequadas para a elaboração de bolos e sorvetes. Além disso, o processo de transesterificação permite preparar mono e diacilgliceróis, os quais são utilizados nos alimentos como agentes emulsificantes (CASTRO et al., 2004; JORGE, 2009).

O processo de hidrólise difere-se dos demais, pois neste ocorre a quebra de ligações éster no triacilglicerol com formação de ácidos graxos livres, mono, diacilglicerol e glicerol, podendo ser catalisada por enzimas (lipases) ou por agentes químicos (ácidos e bases).

Os processos de modificações das cadeias de triacilglicerol de óleos e gorduras fornecem os produtos de grande utilidade para consumo alimentício (óleos vegetais refinados, margarinas/manteigas, ração animal) também possuem uma vasta aplicação industrial, como na área farmacêutica (fabricação de medicamentos e cosméticos) e na indústria de plastificantes

² Os ácidos graxos insaturados podem ser classificados como *cis* ou *trans* dependendo da configuração dos átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono na posição da dupla ligação. Se os átomos de hidrogênio estiverem no mesmo lado da cadeia de carbono, o arranjo é chamado de *cis*, e se os átomos de hidrogênio estão em lados opostos do carbono, o arranjo é chamado de *trans* (JORGE, 2009).

³ O termo *shortening* refere-se à habilidade de uma gordura em lubrificar, enfraquecer ou encurtar a estrutura dos componentes de um alimento para que eles atuem de um modo característico em fornecer propriedades desejáveis de textura em um produto alimentício. Nos produtos de panificação sem a adição de gordura tipo *shortening*, as partículas de glúten e de amido aderem-se umas às outras e dão uma sensação de dureza e tenacidade quando mastigados (GHOTRA et al., 2002).

(fabricação de garrafas pets, sacolas plásticas; atuam também na fabricação de tintas, sabões e sabonetes, lubrificantes entre outros). Além destas aplicações, óleos e gorduras são muito utilizados na indústria de combustíveis para a fabricação de biodiesel (CASTRO et al., 2004; TAPANES et al., 2013; ZENEVICZ et al., 2016).

3.3.1. Hidrólise de Óleos Vegetais

Triacilglicerídeos, em presença de água e catalisador, sofrem hidrólises reversíveis, liberando ácidos graxos (mono e diacilgliceróis), ácidos graxos livres e glicerol. Os catalisadores podem ser ácidos, bases ou enzimas lipolíticas. A esterificação destes (mono e diacilgliceróis) é a reação inversa à hidrólise (DIECKELMANN & HEINZ, 1988), conforme apresentado na Figura 3.4. A hidrólise é, portanto, uma reação química em meio aquoso, em que a água sofre uma decomposição: um hidrogênio da molécula de água é transferido para um dos produtos, e o grupo OH é transferido para o outro produto.

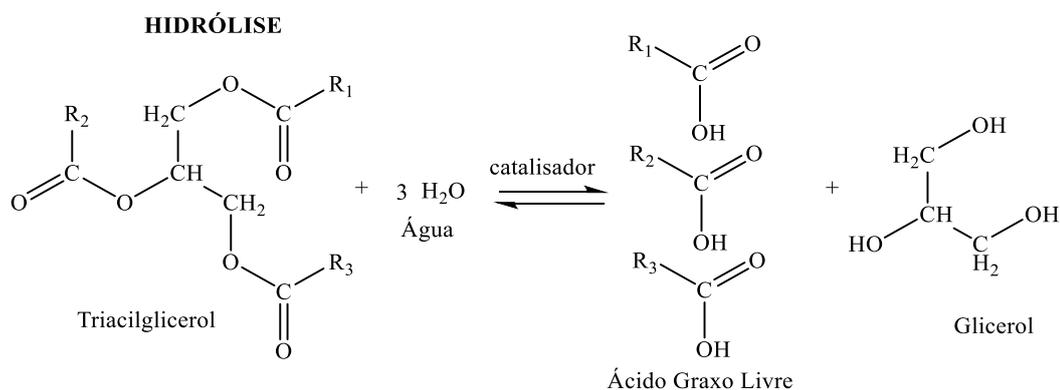


Figura 3. 4. Mecanismo simplificado de hidrólise de um triacilglicerol

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reação de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual na velocidade de reação, devido ao aumento da solubilidade da água nos glicerídeos (mono e di). Os principais fatores que afetam esta reação são temperatura, tipo de catalisador, teor de água no meio reacional e a concentração de glicerol liberado na fase aquosa (DIECKELMANN & HEINZ, 1988).

Uma das aplicabilidades da reação de hidrólise vem sendo comumente estudada no processo de hidroesterificação, o qual é classificado como uma moderna alternativa para a produção de biodiesel. Isto porque, este processo possui um grande diferencial frente ao

processo convencional (transesterificação), sendo possível a utilização de qualquer matéria-prima graxa, como: gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino dos óleos vegetais, entre outros. Neste processo, essas matérias-primas são transformadas em biodiesel independente da sua acidez e de sua umidade (TAPANES et al., 2013; ZENEVICZ et al., 2016). A Figura 3.5 apresenta o processo de produção do biodiesel via hidroesterificação.

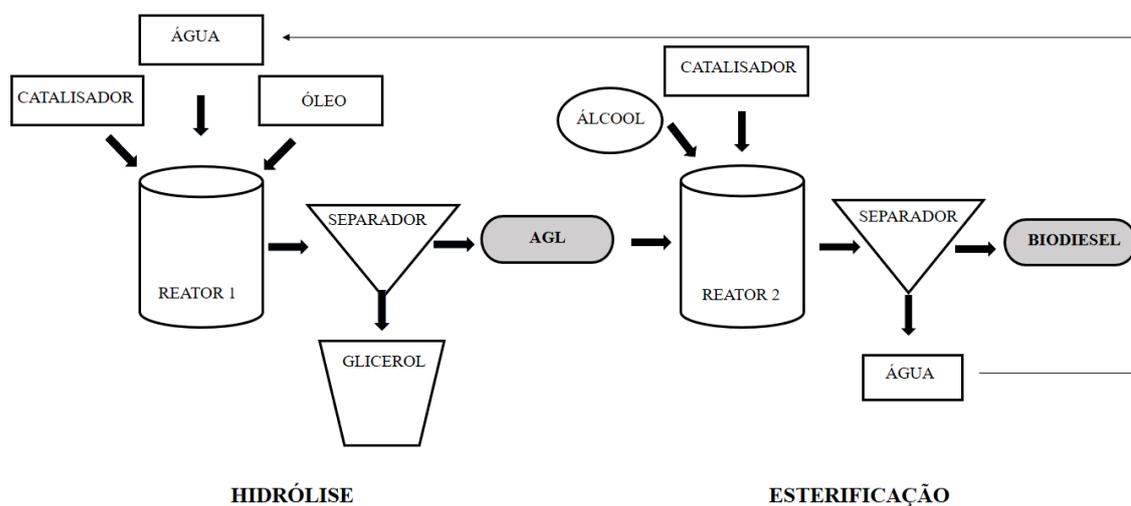


Figura 3. 5. Fluxograma de produção do biodiesel via hidroesterificação

Basicamente o processo de hidroesterificação é composto por duas etapas: a hidrólise seguida da esterificação. A hidrólise consiste na reação química entre acilgliceróis com a água, gerando glicerol e ácidos graxos livres. Ao final dessa etapa, o glicerol é separado e os ácidos graxos livres seguem para o processo de esterificação. Na esterificação os ácidos graxos livres reagem com metanol ou etanol, produzindo o biodiesel e água (TAPANES et al, 2013; ZENEVICZ et al., 2016).

O interesse industrial por tecnologia enzimática vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais. Essas ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO et al., 2004). Entre os processos de interesse estão as reações de hidrólise, síntese e interesterificação de lipídeos por meio das lipases. As razões do enorme potencial tecnológico dessas enzimas incluem fatos relacionados com: (i) sua alta estabilidade em solventes orgânicos; (ii) não requerem a presença de cofatores; (iii) possuem uma larga especificidade pelo substrato e; (iv) exibem uma alta enantiosseletividade (JAEGER et al., 1999; CASTRO et al., 2004).

3.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS

O processo de hidrólise enzimática necessita de dois requisitos para a operação: a formação de uma interface lipídeo/água e a adsorção da enzima nesta interface (JAEGER et al., 1999; CASTRO et al., 2004; FOGLER, 2004; NELSON & COX, 2014). Assim, quanto maior interface, maior a quantidade de enzima adsorvida, acarretando taxas de hidrólise mais elevadas. Diferentes parâmetros podem influenciar no desempenho da hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, diversas técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras usando as lipases como catalisadores (OLIVEIRA et al., 1999; CASTRO et al., 2004).

O processo tradicional de hidrólise exige a utilização de alta temperatura e pressão, sendo conduzido geralmente por temperaturas de 250°C ou mais, sob pressão na ordem de 4,83 MPa por, no máximo, 2 h de reação. Este processo geralmente conduz a uma alta conversão (98%) (BARNEBEY & BROWN, 1948). Entretanto, este processo demanda de intensiva energia. Os catalisadores enzimáticos são utilizados nas reações de hidrólise visando reduzir o alto consumo de energia que se tem pelo processo tradicional. Nesse sentido, as reações de hidrólise enzimática são conduzidas em condições de temperaturas amenas (<70°C) e pressão atmosférica. No entanto, um dos principais problemas associados a hidrólise enzimática de óleos vegetais se dá pela lenta taxa de reação, que mesmo em longos períodos de tempo, atinge baixos índices de acidez.

Karleslind (1996) citado por Castro et al. (2004), descreveu um processo contínuo de hidrólise enzimática de triacilglicerol, constituído de uma coluna encamisada por aquecimento, na qual uma suspensão aquosa de lipase era continuamente alimentada pelo topo da coluna, enquanto em sua base um difusor impulsionava ascensão de finas partículas de óleo em fluxo contracorrente. Uma solução contendo água/glicerina e lipase era recolhida na base da coluna e os ácidos graxos recolhidos no topo da coluna. A recuperação da lipase era processada por ultrafiltração.

Segundo Agueiras et al. (2014), a hidrólise enzimática tem algumas vantagens sobre a hidrólise química ou térmica, pois requer temperaturas mais baixas, o que previne a degradação dos produtos e reduz as despesas com energia. As enzimas são biodegradáveis e, por conseguinte, são menos poluentes do que os catalisadores químicos. As principais desvantagens da catálise enzimática são o maior tempo reacional e os custos elevados dos biocatalisadores. Outro fator que apresenta desvantagem é o baixo rendimento – distantes dos 99%-100%

desejados (DABDOUB et al., 2009; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; RAMOS et al., 2017).

Uma das vantagens do uso de catalisadores enzimáticos na hidrólise é justificada pelo fato destes poderem ser utilizados por vários ciclos sem perda de atividade ou com perda desprezível. Além disso, apontam interessantes potencialidades de uso, em função da facilidade de recuperação e reuso; as baixas temperaturas requeridas; condições suaves com baixo consumo energético. Porém, é necessário realizar uma série de estudos que resultem na melhoria da velocidade de reação, reduzindo o tempo da hidrólise e fornecendo produtos em rendimentos mais altos, a fim de possibilitar aplicações industriais práticas e competitivas (DABDOUB et al., 2009; RAMOS et al., 2017).

Diversos autores vêm explorando o processo de hidrólise enzimática de óleo vegetais (óleo de soja, milho, palma, macaúba). Dentre eles, há estudos de hidrólise total, outros com óleos enriquecidos com um glicerídeo específico, e também estudos de otimização para produção em larga escala. A Tabela 3.3 apresenta alguns desses autores.

3.5. CATALISADORES ENZIMÁTICOS

A catálise biológica foi reconhecida e descrita no final dos anos 1700, em estudos da digestão de carne por secreções do estômago. A pesquisa continuou no século seguinte examinando a conversão do amido em açúcar pela saliva e por vários extratos de plantas. E em 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcares em álcool por leveduras é catalisada por “fermentos”. Posteriormente, Frederick W. Kühne deu nome de “enzimas” para essas moléculas (NELSON & COX, 2014).

A literatura apresenta as enzimas como tendo um poder catalítico extraordinário, geralmente muito maior do que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Possuem um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, visando acelerar as reações químicas (podem elevar a velocidade de uma reação de 10^8 a 10^{12} vezes) e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de pH e temperatura (30 a 70°C, em pressão atmosférica) (MENDES et al., 2011; ZHANG et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016; SOUZA et al., 2016).

Tabela 3. 3. Estudos da literatura com hidrólise enzimática de óleos vegetais com diferentes condições operacionais

Substrato	Condições Operacionais						Autor
	Temperatura (°C)	pH	Razão molar água/óleo	Catalisador	Tempo	Rendimento (%)	
Óleo de palma	65	Água	50% peso em água	10% em massa de substrato – RM IM.	12 h	32 em DAG	Cheong et al., 2007
Óleo de soja	40	Água	4:1	1% em massa de substrato.	4 h	30	Freitas et al., 2007
Óleo de palma	55	Água	5,3% peso em água	TL IM	6 h	70	Chew et al., 2008
Óleo de soja	55	8	1:1	TLL 2,3% em massa de substrato	48 h	89	Cavalcanti-Oliveira et al., 2011
Óleo de palma	55	Água	5, 10 e 15% em massa de água	1,36% em massa de substrato	50 h	43, 52 e 52	Voll 2011
Óleo de palma	55	Água	5% peso em água	10% em massa de substrato – RM IM	6 h	31 em DAG	Phuah et al., 2012
Óleo de canola	37,5	4,5	30% peso em água	<i>Ricinus Communis L.</i>	2 h	100	Avelar et al., 2013
Óleo de palma	55	Água	9:1	1,36% em massa de substrato	4 h	38	Awadallak et al., 2013
Óleo de milho e girassol	33	4,5	40% peso em água	5% em massa de substrato – Lipase vegetal	70 a 80 min	84 e 76	Coelho et al., 2013
Óleo de soja	65	Água	9:1	10% em massa de substrato	2 h	95	Feitten et al., 2013
Óleo de macaúba	55	8	2:1	TL IM	6 h	82	Raspe et al., 2013
Óleo de macaúba	30	4	50% peso em água	2% em massa de substrato – Lipase vegetal	6 h	99	Aguieiras et al., 2014
Resíduo de óleo de sardinha	35	7	-	<i>Mucor circinelloides</i>	72 h	>80	Purwatto et al., 2015
Óleo de soja	40	Água	20:1	10% em massa de substrato	2 h	60	Zenevycz et al., 2016

A especificidade da enzima está relacionada ao fato desta possuir uma cavidade, ou, fenda de ligação do substrato, a qual está situada na superfície da enzima. Essa cavidade recebe o nome de sítio ativo, e é o local onde ocorre a catálise. O substrato liga-se ao sítio ativo da enzima por ligações não-covalentes (interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas.). Somente uma porção pequena do substrato onde ocorre a transformação está ligada à enzima (ZHANG et al., 2011; NELSON & COX, 2014; CARVALHO et al., 2015). A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo de átomos no sítio ativo. Uma das explicações para elevada especificidade das enzimas é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos foram propostos para explicar a especificidade da enzimática, o modelo chave-fechadura e o modelo do encaixe induzido (FOGLER, 2004; SOUZA et al., 2016).

No modelo chave-fechadura, muitas enzimas contêm fendas com dimensões fixas que permitem a inserção de compostos com uma dada configuração. O substrato se ajusta a esse sítio de ligação como uma chave que se ajusta a sua fechadura. Substâncias que não se encaixam na fenda para formar o complexo enzima-substrato, não reagem (FOGLER, 2004; NELSON & COX, 2014, SOUZA et al., 2016).

O modelo mais flexível de interação enzima-substrato é o encaixe induzido. Neste, os sítios ativos das enzimas não estão completamente pré-formados e a interação inicial do substrato com a enzima induz uma alteração conformacional na enzima. Isso promove o reposicionamento dos aminoácidos catalíticos para formar o sítio ativo e a estrutura correta para interagir com os grupos funcionais do substrato (FOGLER, 2004; NELSON & COX, 2014, SOUZA et al., 2016).

Muitas enzimas receberam seus nomes pela adição do sufixo “ase” ao nome dos seus substratos ou a uma palavra que descreve sua atividade, entretanto outras enzimas foram batizadas pelos seus descobridores em razão de uma função ampla, antes que fosse conhecida a reação específica catalisada por elas. A Tabela 3.4 apresenta a classificação internacional das enzimas.

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (JAEGER et al, 1999). Estas enzimas podem ser encontradas na natureza a partir de fontes animais (obtidas a partir do pâncreas de animais), vegetais e microbianas.

Tabela 3. 4. Classificação internacional das enzimas

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidrônio ou átomo de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liasas	Clivagem de C–C, C–O, C–N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerasas	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C–C, C–S, C–O, C–N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares.

Fonte: Adaptado de JORGE (2009)

As lipases podem ser produzidas por diversos micro-organismos, como *Bacillus* sp., *Candida rugosa*, *Candida antartica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor*, *Geotrichum* sp., *Tulopsis* sp. e *Candida* sp. (BON et al., 2008; SANTOS et al., 2008; PINHEIRO et al., 2008; HAIGH et al., 2012; HU et al., 2012; BASRI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; CARVALHO et al., 2014). Além disso, dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C (CASTRO et al, 2004).

Segundo Kapoor e Gupta, (2012) a versatilidade das lipases é a capacidade das enzimas catalisarem diferentes reações na sua fisiológica natural, podendo ocorrer em diferentes áreas: versatilidade da condição enzimática (catálise em condições não naturais, como meio anidro, diferentes temperaturas ou pH); versatilidade da enzima e substrato (catalisam grande quantidade de substratos devido a sua ampla especificidade) e, por fim, a versatilidade catalítica (capacidade do sítio ativo em catalisar transformações quimicamente distintas). Do ponto de vista industrial as lipases são consideradas muito importantes devido às suas propriedades catalíticas e fácil produção em escala ampliada (CARVALHO et al, 2015).

As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C, entretanto, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem. Estas enzimas

possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis à ácidos graxos correspondentes (di e monoacilgliceróis), além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria do óleo e de alimentos (CASTRO et al., 2004; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016)

As reações lipolíticas ocorrem na interface água – lipídeo podendo, em alguns casos, impedir que as cinéticas das reações sejam descritas pelas equações de Michaelis – Menten (que só são válidas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea) (SHARMA et al., 2001). O fenômeno mais conhecido originado de estudos cinéticos de reações lipolíticas é a ativação interfacial. Essa relaciona o aumento da atividade da lipase com a solubilidade do substrato, os quais formam uma emulsão, visto que as lipases são definidas como carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados (JAEGER et al, 1999; SHARMA et al., 2001; CASTRO et al., 2004; MESSIAS et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, tornando o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (JAEGER et al, 1999; SHARMA et al., 2001; CASTRO et al., 2004; MESSIAS et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

As lipases se destacam entre as hidrolases devido as suas múltiplas aplicações, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e também no tratamento de efluentes (JAEGER et al., 1999; MESSIAS et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

O custo para o emprego de lipases em indústrias ainda é elevado, sendo que estas enzimas devem ser ativas e estáveis em pH, temperatura, solventes, e condições específicas, sendo otimizadas para cada processo. Uma opção para diminuir os custos está no uso de lipases imobilizadas, bem como a possibilidade de reuso (MESSIAS et al., 2011; CARVALHO et al., 2015; POURZOLFAGHAR et al., 2016).

3.5.1. Lipozyme TL IM

A lipase Lipozyme® TL IM, é uma enzima imobilizada em sílica. Sua fonte é de origem fúngica, do fungo 18 *Thermomyces lanuginosus*. Trata-se de um produto granulado, seco, branco. A Lipozyme TL IM apresenta atividade enzimática em 250 U/g, atuando na faixa de pH entre 6-8 e de temperatura entre 50-75°C. (NOVOZYMES). A Lipozyme TL IM é uma lipase 1,3-específica. Essa lipase vem ganhando atenção na indústria de alimentos, principalmente em pesquisas com lipídeos. Apresenta uma estrutura tridimensional estabilizada por três ligações dissulfeto e contém quatro triptofanos, um dos quais localizado na tampa, e tem se mostrado eficiente para a hidrólise de óleos vegetais. *Thermomyces lanuginosus* tem uma preferência por hidrolisar triglicérides de cadeias médias (C10-C12) e tem alta estabilidade térmica (XU et al., 2004; KHOR et al., 2010).

Vários pesquisadores vêm estudando a aplicação da Lipozyme TL IM como: Yang et al., (2003); Xu et al., (2004); Yang et al., (2005); Chew et al., (2008); Hernández-Martín & Otero, (2008); Rodrigues & Avub, (2011); Zhang et al, (2011); Blanco et al., (2013); Raspe et al., (2013); Zenevich et al., (2016); Focking (2017), em processo de hidrólise, esterificação, transesterificação, glicerólise, entre outros.

3.6. FATORES QUE INFLUENCIAM NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Vários fatores influenciam a cinética e a atividade enzimática como a temperatura, pH, concentração do substrato, tempo e produto da reação. Segundo Lima et al. (2008), dentro de certos limites, a velocidade de reação é proporcional a concentração de enzima adicionada ao meio reacional, conforme exemplificado na Figura 3.6-A. A velocidade máxima da reação é uma função da quantidade de enzima disponível, a qual aumenta pela introdução de mais enzima no sistema (NELSON & COX, 2014, SOUZA et al., 2016). Além disso, o autor afirma que, ao variar a concentração inicial de substrato, há também, uma variação na velocidade da reação, conforme a Figura 3.6-B. A velocidade de reação é função crescente da concentração do substrato até um determinado valor dessa concentração, mantendo-se praticamente constante para concentrações de substratos superiores a esse valor (LIMA et al., 2008).

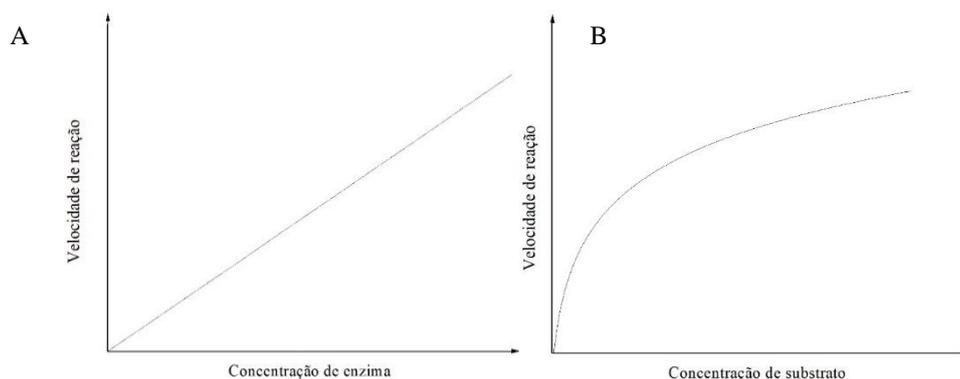


Figura 3. 6. Representação esquemática da influência da concentração da enzima (A) e da concentração do substrato (B) na velocidade de reação. Adaptado de LIMA et al., (2008).

Além disso, a velocidade de reação pode ser influenciada pelos inibidores, os quais acarretam na diminuição desta velocidade. Esse inibidor pode reagir irreversivelmente, bloqueando parcial ou totalmente, e também, pode reagir reversivelmente. Em diversos casos, o inibidor pode ser uma das substâncias que participa da reação (sendo substrato ou produto – como é o caso do AGL e do GLI). Dentro da classe de inibidores reversíveis há uma classificação quanto ao seu mecanismo: inibição competitiva e não-competitiva. Em poucas palavras, uma inibição competitiva é quando o inibidor compete com o substrato ocupando o sítio ativo da enzima. Para a inibição não-competitiva, o inibidor não compete com o substrato pelo sítio da enzima, mas ocupa outro sítio.

As reações químicas são afetadas pela temperatura. A velocidade de reação aumenta com a temperatura porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Entretanto em reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com máxima eficiência, conforme a Figura 3.7. Em temperatura elevadas, a atividade das enzimas declina abruptamente por desnaturação proteica (NELSON & COX, 2014, SOUZA et al., 2016).

A velocidade de reação está relacionada diretamente com a constante de cinética de reação (k), a qual obedece à lei de Arrhenius, dada pela Equação 3.1:

$$k = k_0 \cdot e^{-\frac{\alpha}{RT}} \quad (3.1)$$

Em que α é a energia de ativação, R é a constante dos gases ideais e T é a temperatura absoluta do sistema. A Figura 3.7 apresenta uma representação da constante de velocidade (k) com a temperatura T . Entretanto a temperatura pode atuar influenciando as enzimas (catalisadores),

isto porque, as enzimas são classificadas com termolábeis, podendo ocorrer a sua inativação térmica, e consequentemente afetando a velocidade da reação. Logo, a partir de uma determinada temperatura, a constante de velocidade específica deixa de ser expressa pela Eq. 3.1.

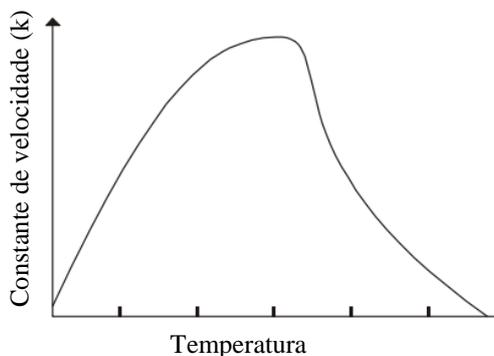


Figura 3. 7. Efeito da temperatura sobre a constante de velocidade de uma reação catalisada por enzima Adaptado de LIMA et al., 2008.

Outro fator que influencia a velocidade da reação é o pH. A Figura 3.8 apresenta um esquema do comportamento da velocidade de reação em relação ao pH do meio. O pH de um meio aquoso em que se ocorre a reação pode afetar tanto o estado de dissociação da enzima quanto a velocidade de reação. A concentração de íons de hidrogênio afeta as enzimas de vários modos. Primeiro, a atividade catalítica das enzimas está relacionada à dissociação de aminoácidos do sítio ativo. Por exemplo, se o pH torna-se suficientemente alcalino de tal modo que o grupo perde seu próton, a atividade da enzima pode ser reduzida. Além disso, os substratos podem também serem afetados, pois se um substrato contém um grupo dissociável, as mudanças no pH afetam a capacidade de ligação ao sítio ativo. Mudanças drásticas no pH promovem a desnaturação das enzimas (NELSON & COX, 2014, SOUZA et al., 2016).

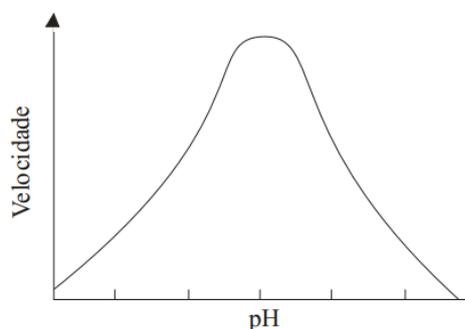


Figura 3. 8. Representação do pH do meio reacional sobre a velocidade de reação (LIMA et al., 2008).

3.7. MECANISMO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A abordagem mais antiga para entender o mecanismo das enzimas e que permanece ainda entre as mais importantes, é determinar a velocidade da reação (ATKINS & JONES, 2012) e como ela se modifica em resposta à mudança nos parâmetros experimentais. Uma reação enzimática simples pode ser escrita como na Equação 3.2.



Em que E , S e P representam a enzima, substrato e produto, respectivamente, e ES e EP são as concentrações dos complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto.

A função do catalisador é de aumentar a velocidade de reação, logo a catálise não afeta o equilíbrio da reação. Um equilíbrio favorável não significa que a conversão de substrato em produto ocorra em uma velocidade detectável, pois há uma barreira energética para a formação de cargas instáveis transitórias, rearranjos de ligações e ainda outras transformações necessárias para que a reação ocorra em qualquer sentido. Logo, para que isso ocorra, as moléculas devem suplantar essa barreira e atingir um nível de energia mais elevado (LIMA et al., 2008; NELSON & COX, 2014; SOUZA et al., 2016).

A velocidade da reação pode aumentar com a temperatura e/ou pressão, o que aumenta o número de moléculas com energia suficiente para suplantar. Um dos parâmetros que afeta a velocidade das reações catalisadas por enzimas é a concentração do substrato $[S]$ (LIMA et al., 2008; NELSON & COX, 2014; SOUZA et al., 2016). Entretanto, o estudo dos efeitos da concentração do substrato é complicado pelo fato de modificar-se durante o curso de uma reação *in vitro* à medida que o mesmo é convertido em produto.

Uma vez que a $[S]$ afeta a velocidade de uma reação enzimática simples ($S \rightarrow P$) com apenas uma molécula de substrato, pode-se ocorrer que duas (e algumas vezes mais) moléculas de substratos diferentes ligam-se à enzima e participam da reação. Logo, as reações enzimáticas com dois substratos geralmente envolvem a transferência de um átomo de um grupo funcional de um substrato para outro. Essas reações ocorrem por vários mecanismos diferentes (LIMA et al., 2008; NELSON & COX, 2014; SOUZA et al., 2016).

Em alguns casos, ambos os substratos ligam-se à enzima simultaneamente em ponto do curso da reação, formando um complexo ternário. Os substratos ligam-se conforme uma sequência aleatória ou em uma sequência com ordem específica. Em outros casos, o primeiro substrato se dissocia antes que o segundo substrato se ligue, de modo que não há formação de

um complexo ternário. A Figura 3.9 apresenta de forma esquemática exemplos de reações enzimáticas com grupos ternários (B e C), e sem a formação deste (A). Um exemplo deste último caso é o mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi (PPBB), ou deslocamento duplo.

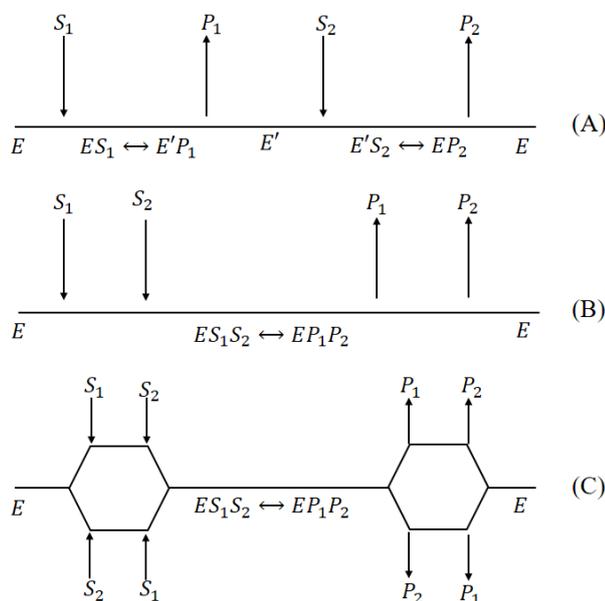


Figura 3. 9. Mecanismo de reação de dois substratos sem a formação de grupos ternários: (A) PPBB; e com a formação de grupos ternários: (B) PPBB ordenado e (C) PPBB randômico

Segundo Bornadel et al, (2013), as lipases seguem o mecanismo de pingue-pongue, também conhecido como enzima substituída. O mecanismo PPBB ocorre envolvendo a interação da enzima livre e o primeiro substrato S_1 , resultando na formação de um intermediário acil-enzima ES_1 . Esta enzima é então modificada, de forma a liberar o produto ao mesmo tempo em que está ligada ao substrato, apresentando uma característica $E'P_1$. À medida que o produto P_1 , é formado, ocorre um ataque nucleofílico do segundo substrato S_2 , ao intermediário (E'), formando o complexo $E'S_2$, o qual modifica-se em EP_2 , terminando na formação do produto P_2 , e liberação da enzima livre E (LIMA et al., 2008; NELSON & COX, 2014; SOUZA et al., 2016).

A catálise enzimática de ácidos graxos descrita pelo mecanismo de PPBB é relatado em várias obras: Bousquet-Dobouch (2008); Chew et al., (2008); Gofferjé et al., (2014); Adewale et al., (2016); Choong et al., (2016); Zarejousheghani et al., (2016). Al-Zuhair et al., (2007) estudaram a determinação experimental dos efeitos das concentrações de óleo de palma e metanol na taxa de transesterificação enzimática. A reação ocorreu em meio orgânico de n-hexano com a utilização da lipase *Mucor miehei*. O mecanismo de PPBB com inibição por

ambos os reagentes foi adotada para melhor explicar os resultados experimentais. O modelo matemático foi usado para identificar as regiões onde o efeito da inibição surge por ambos os substratos. A equação do modelo proposto é essencial para prever a taxa de metanólise do óleo de palma em um lote, ou em um reator contínuo, com o intuito de determinar as condições ideais para a produção de biodiesel. As Figuras 3.10 – 3.11 apresenta o mecanismo PPBB estudada por Al-Zuhair et al. (2007).

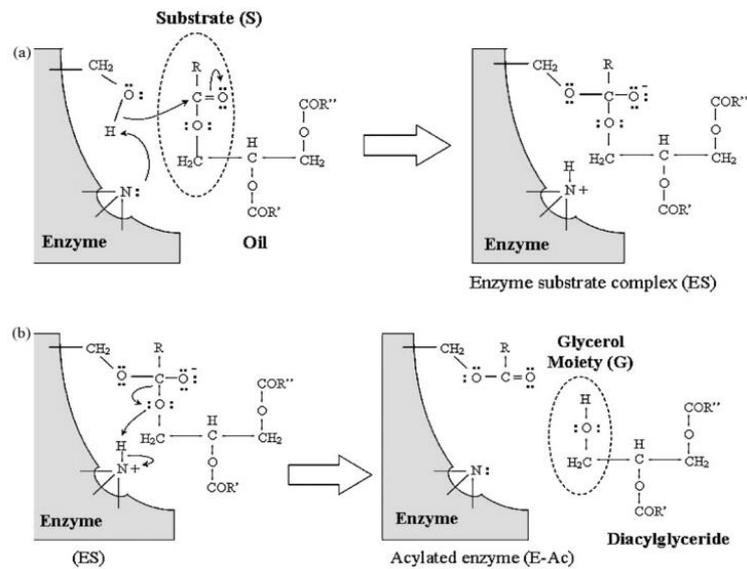


Figura 3. 10. Mecanismo da catálise enzimática do óleo vegetal proposto por Al-Zuhair et al., 2007 – PARTE I

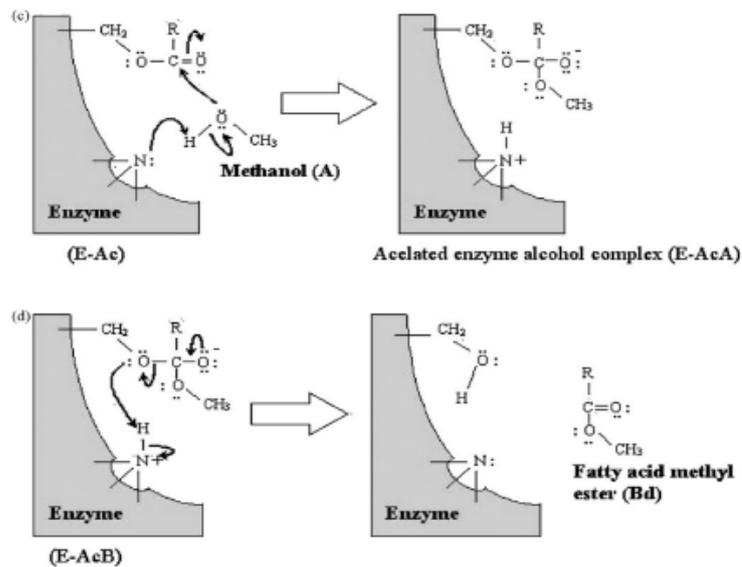


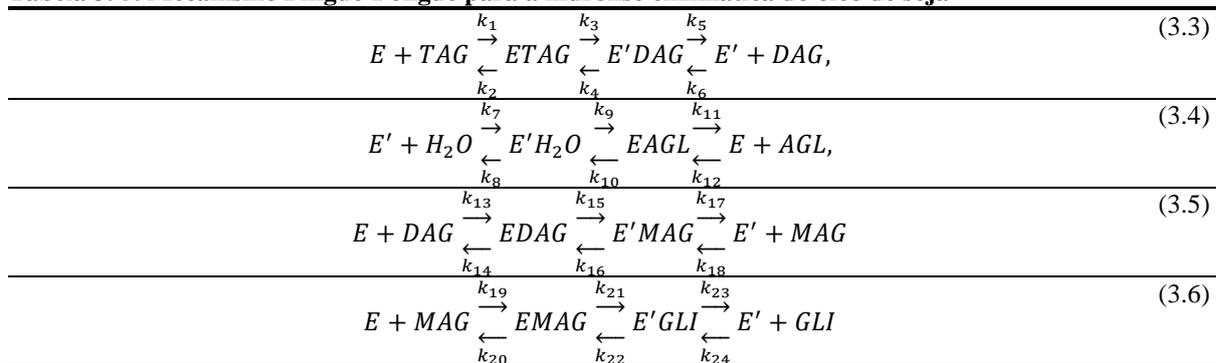
Figura 3. 11. Mecanismo da catálise enzimática do óleo vegetal proposto por Al-Zuhair et al., 2007 – PARTE II

Nas Figuras 3.10 – 3.11 são apresentados de forma esquemática, as ligações da enzima e substratos com seus respectivos complexos, bem como as ligações de enzima e produto com seus complexos enzimáticos. Esta Figura pode auxiliar no entendimento, também, para o mecanismo de hidrólise enzimática de óleos vegetais.

A hidrólise de uma molécula de triacilglicerol (*TAG*) ocorre de acordo com as seguintes etapas: (i) a molécula *TAG* se liga à enzima por adição nucleofílica formando um complexo enzima-substrato (*ETAG*); (ii) O complexo *E'DAG* é formado pela transferência de prótons entre os grupos funcionais do complexo *ETAG* e a enzima (nomeadamente, grupo amina); (iii) *DAG* é liberado para o meio, deixando a enzima acilada (*E'*); (iv) o átomo de oxigênio de uma molécula de água liga-se ao grupo *C=O* do intermediário da enzima acil, formando assim um complexo enzima-água acilado (*E'H₂O*); (v) o complexo *EAGL* é formado pela transferência de prótons entre os grupos funcionais do *E'H₂O*; da enzima (grupo amina); (vi) Finalmente, o *AGL* é liberado para o meio juntamente com a enzima na sua forma original (*E*).

A descrição (modelagem e simulação) da cinética de uma hidrólise enzimática de triacilglicerol com base nesse mecanismo requer a determinação de 12 parâmetros ($k_1 \dots k_{12}$). Conseqüentemente, se considerarmos também a diacilglicerol e monoacilglicerol, seria necessária a determinação de 24 parâmetros ($k_1 \dots k_{24}$). Logo, o mecanismo de PPBB para a hidrólise enzimática de óleos vegetais pode ser descrita conforme a Tabela 3.5. Ressalta-se que a equação 3.4 repete-se a medida que *E'* se dissocia do complexo.

Tabela 3. 5. Mecanismo Pingue-Pongue para a hidrólise enzimática do óleo de soja



Mecanismos baseados em reações enzimáticas multi-substrato, como PPBB, podem ser complexas e levar a modelos cinéticos com dezenas de parâmetros. A estimativa de parâmetros para modelos dessa magnitude não é uma tarefa trivial. De acordo com Macrae (1983) e

Bornadel et al. (2013), o procedimento é suscetível a diferentes erros, especialmente devido à possibilidade de forte correlação entre alguns dos parâmetros. Portanto, é necessário propor novas abordagens para o desenvolvimento de modelos cinéticos simples e práticos para tais reações.

Uma simplificação do mecanismo cinético PPBB, chamado de mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi simplificado (PPBBS) pode ser adotada sob as seguintes hipóteses: (i) as etapas de adsorção/dessorção de *TAG*, *DAG* e *MAG* na superfície da enzima e a reação entre os complexos formados (*ETAG*, *EDAG*, *EMAG*) com a molécula de água são passos limitantes da hidrólise enzimática do óleo de soja; e (ii) o passo de reação entre os complexos formados com a molécula de água são descritos por reações irreversíveis devido ao excesso de água utilizada na reação (base molar). Essas simplificações resultam em um modelo cinético com 9 parâmetros, conforme descrito na Tabela 3.6

Tabela 3. 6. Mecanismo PPBB simplificado para a hidrólise enzimática do óleo de soja

$E + TAG \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ETAG$	(3.7)
$ETAG + H_2O \xrightarrow{k_3} DAG + AGL + E,$	(3.8)
$E + DAG \xrightleftharpoons[k_5]{k_4} EDAG$	(3.9)
$EDAG + H_2O \xrightarrow{k_6} MAG + AGL + E,$	(3.10)
$E + MAG \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} EMAG$	(3.11)
$EMAG + H_2O \xrightarrow{k_9} GLI + AGL + E,$	(3.12)

Assim como nas demais reações, a cinética da hidrólise enzimática dos óleos vegetais pode ser influenciada pela ação de inibidores, por exemplo, os ácidos graxos livres e/ou o glicerol. Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas. O estudo de inibidores enzimáticos fornece informações sobre os mecanismos enzimáticos e ajudam a desvendar algumas vias metabólicas. Dentre as duas vias metabólicas apresentadas na literatura (inibição reversível e inibição irreversível), a inibição competitiva (inibição reversível) é a mais comum. O mecanismo da inibição competitiva é apresentado na Figura 3.12.

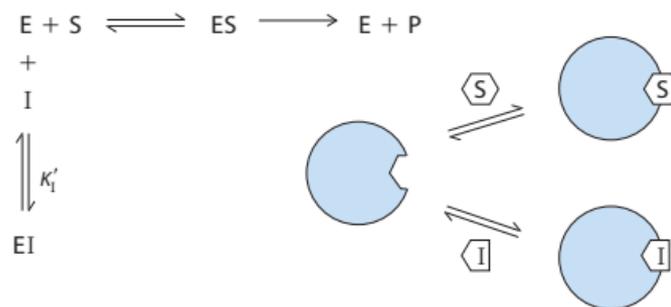


Figura 3. 12. Mecanismo cinético de inibição competitiva de I pelo sítio da enzima (NELSON & COX, 2014)

Um inibidor competitivo compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, assim à medida que o inibidor *I* ocupa o sítio ativo, ele impede que o substrato *S* se ligue a enzima *E*. Muitos desses inibidores apresentam estrutura similar à do substrato e se combinam com a enzima formando um complexo *EI*, mas que não leva a catálise e podem reduzir a eficiência da enzima. Quando ligado reversivelmente à enzima, o substrato pode ter a competição deslocada ao seu favor por meio da adição de mais substrato. Em outras palavras, quando $[S]$ exceder muito a $[I]$, é minimizada a probabilidade de uma molécula de inibidor se ligar a enzima.

Dessa forma, a modelagem matemática é um artifício útil para compreender a dinâmica do processo. Para tal objetivo, ela busca descrever da forma mais exata possível, por meio de modelos empíricos (obtidos geralmente da correlação matemática de dados experimentais) ou por modelos fenomenológicos.

3.8. ESTADO DA ARTE

As indústrias químicas, farmacêutica, de alimentos e de bioenergia, vêm demonstrando crescente interesse em produtos à base de óleos, gorduras e seus derivados. Tendo como resultado um número significativo de produtos de alto valor agregado, como: revestimentos, adesivos, surfactantes, óleos lubrificantes, biocombustível entre outros (POURZOLFAGHAR et al., 2016).

A produção de ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, por meio da hidrólise de acilgliceróis desperta interesse na exploração de matérias-primas renováveis, como os óleos vegetais e óleos provenientes de resíduos industriais, além de apresentar com vantagens técnicas e econômicas (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Dessa forma, encontra-se na

literatura uma gama de estudos referentes a hidrólise de óleo vegetais como: óleo de soja (CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; WANG et al., 2011; ZENEVICZ et al., 2016), óleo de palma (CHEONG et al., 2007; PHUAH et al., 2012; AWADALLAK et al., 2013), óleo de girassol (ROONEY & WEATHERLEY, 2001; COELHO et al., 2013, RAIZER et al., 2015), óleo macaúba (TRENTINI et al., 2014), óleo de crambe (MELLO et al., 2015; TAVARES et al., 2018) entre outros (TALUKDER et al., 2010; SHARMA et al., 2013). Alguns destes utilizam de tecnologias como o ultrassom; processo com água supercrítica, além do uso de catalisadores (químicos e enzimáticos).

A utilização de catalisadores no meio reacional aumenta a velocidade de reação. O uso de catalisadores enzimáticos vem ganhando destaque devido as suas inúmeras vantagens, dentre elas o uso de temperaturas amenas e pressões atmosféricas durante o processo. Logo, a literatura apresenta diversos autores que abordam o uso de enzimas no processo de hidrólise, como nos trabalhos de Noor et al., 2003; Cheong et al., 2007; Chew et al., 2008; Wang et al., 2009a-b; Gonçalves et al., 2012; Awadallak et al., 2013, entre outros.

A modelagem matemática é uma ferramenta de grande importância na área das engenharias, como na otimização e simulação de processos catalíticos. A literatura apresenta uma gama de trabalhos que abordam o uso do mecanismo de PPBB como nos trabalhos de Bousquet-Dobouch (2008); Chew et al., (2008); Gofferjé et al., (2014); Adewale et al., (2016); Choong et al., (2016); Zarejousheghani et al., (2016). Entretanto, é escasso o número de trabalhos que abordam tal mecanismo ao processo de hidrólise enzimática de óleo vegetais, podendo destacar o trabalho Li et al., (2015), Wang et al. (2010) e Tavares et al., (2018),

Neste contexto o presente trabalho destaca o estudo da cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja abordando as variações das condições operacionais razão molar água/óleo e temperatura, bem como a utilização de modelos matemáticos para tratar esse processo por meio do mecanismo de PPBBS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

O substrato utilizado para o presente trabalho foi o Óleo de Soja refinado, tipo I, da marca Imcopa (Leve), adquirido nos supermercados locais.

O catalisador utilizado foi a enzima comercial Lipozyme TL IM, produzida a partir do microrganismo *Thermomyces lanuginosu*, imobilizada em sílica e apresentando especificidade na posição 1,3 do triacilglicerídeo. Esta foi fornecida pela LNF latino-americana.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Reação de Hidrólise

As reações de hidrólise enzimática do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme TL IM foram conduzidas em sistema fechado e batelada. Determinada quantidade de óleo de soja, água destilada e enzima foram colocados em frascos Erlenmeyer, os quais foram hermeticamente fechados. Em seguida, os frascos foram colocados sob temperatura e velocidade de agitação controladas (250 rpm – corresponde ao nível máximo do equipamento) em incubadora refrigerada com agitação orbital, comumente, denominado como *shaker*. Em tempos pré-determinados o frasco foi retirado do *shaker* e a mistura (fase óleo + fase água + enzima) foi submetida a um processo de centrifugação durante 5 min com 3000 rpm. Finalmente, a fase óleo foi submetida a análise do índice de acidez, o qual foi utilizado para determinar o rendimento da reação (ver Equação 4.2). Foram conduzidas reações de hidrólise de óleo de soja com diferentes razões molares água/óleo (9:1, 20:1, 46:1 e 60:1 – manteve-se a massa de óleo fixa e variou-se a massa de água) para diferentes temperaturas (40, 52 e 64°C) mantendo-se as demais condições fixas (pH 6,1 e 250 rpm). Em particular a dosagem de enzima foi fixada em 1% (base mássica) em relação ao substrato óleo de soja. Na Figura 4.1 é apresentada de forma esquemática o procedimento para realização da hidrólise enzimática do óleo de soja.

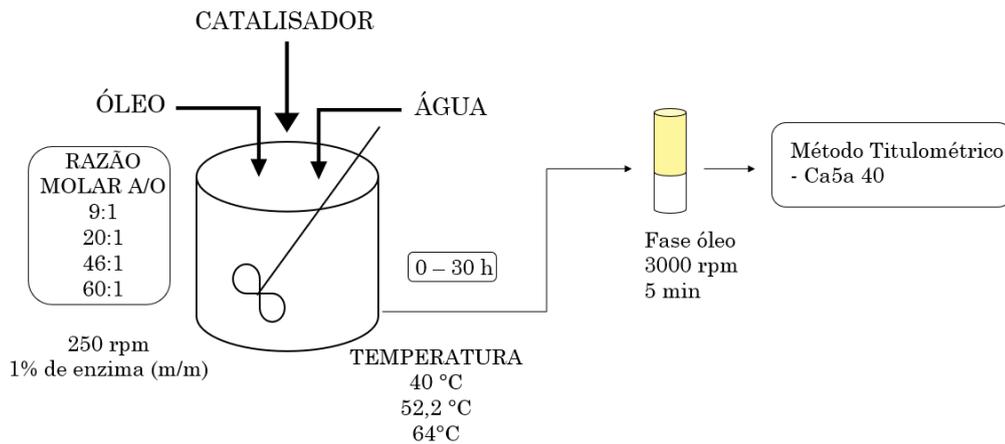


Figura 4. 1. Representação esquemática para o processo de hidrólise enzimática do óleo de soja

4.2.2. Determinação do Índice de Acidez

Para determinação do índice de acidez das amostras (na fase óleo) foi empregado o método base Ca5a-40, recomendado pela AOCS (1999). As análises do índice de acidez foram realizadas a partir da titulação com solução de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Para isso, mediu-se a massa em aproximadamente 1 g de óleo em Erlenmeyer e adicionou-se de 15 mL de solução 1:1 éter etílico/álcool etílico, e quatro gotas de solução de fenolftaleína. Esta, foi titulada com uma solução de NaOH sob agitação vigorosa até mudança de coloração (mudança súbita de uma coloração branca para rosa). O índice de acidez foi calculado de acordo com a Equação 4.1:

$$Ac(\%) = 100 \frac{V M_{NaOH} PM_{AGL}}{1000 m} \quad (4.1)$$

$$Rendimento = 100 \frac{Ac - Ac_{inicial}}{100 - Ac_{inicial}} \quad (4.2)$$

Em que: Ac é o percentual de ácidos graxos livres em relação a mistura de ácidos graxos do óleo de soja (%); V é o volume (mL) de solução de NaOH gasto na titulação; M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH (mol L^{-1}); PM_{AGL} é a massa molar média ponderada dos ácidos graxos presentes no óleo de soja; e m é a massa da amostra de óleo (g).

Uma vez que o óleo de soja possui diferentes ácidos graxos em sua composição, as moléculas de TAG, DAG, MAG, e AGL foram tratadas como pseudo-componentes. A massa molar de ácido graxos livre foi calculada como uma média ponderada (baseada na fração molar) das massas molares dos ácidos graxos presentes no óleo de soja ($PM_{AGL} = 275,62 \text{ g mol}^{-1}$, SILVEIRA, 2011).

4.3. Avaliação da Atividade Enzimática durante o Processo Reacional

Após as reações de hidrólise enzimática, as enzimas utilizadas foram separadas da mistura por filtração, utilizando papel filtro qualitativo. Posteriormente, foram lavadas com 10 mL de hexano por duas vezes, e então filtradas à vácuo. Em seguida estas foram secadas em estufa por 4 h em temperatura de 40°C, e então mantidas no dessecador por 24 h.

A atividade enzimática das amostras foi determinada conforme o método proposto por Pastore et al., (2003) com adaptações. Primeiramente foi preparada uma emulsão composta por goma arábica (10% m/v) e azeite de oliva (7,15%), os quais foram emulsificados com auxílio de um agitador magnético por 5 min. Em seguida foi adicionada a solução Tampão de Fosfato (50 mmol L⁻¹ pH 7,0), e solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ foi empregada para ajustar o pH da emulsão em 7. Posteriormente, utilizou-se de 20 mL de emulsão e 1 g de enzima para preparar a amostra, a qual foi colocada em *shaker* com agitação (200 rpm) e temperatura (40°C) controladas por 20 min. Após o tempo de reação de 20 min, foi adicionado 20 mL de solução de acetona/etanol (1:1 v/v), interrompendo a reação enzimática. Por fim, a amostra foi titulada com solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ até atingir pH 10,0. A atividade enzimática foi calculada utilizando da Equação 4.3:

$$AE = \frac{V M_{NaOH} F_c}{t_r \cdot 1000} \quad (4.3)$$

Em que: AE é a Atividade Enzimática (U g⁻¹ – Unidades por grama); V é o volume de NaOH titulado; t_r é o tempo de reação; M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH e F_c é o fator de correção de NaOH obtido na padronização (0,986).

4.3.1. Fisissorção de N₂

A análise de fisissorção de N₂ na lipase Lipozyme TL IM foi realizada no Laboratório de Catálise e Produção de Biocombustíveis (LabCatProBio) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), utilizando o equipamento Nova-2000 da marca Quantachorme. Para obtenção das isotermas de adsorção/dessorção da lipase foi empregada a técnica de fisissorção de Nitrogênio N₂. As isotermas foram realizadas na temperatura de ebulição do N₂ no intervalo de pressão relativa 10⁻⁶ até 1. Inicialmente, a enzima foi seca em estufa por 24 h à temperatura de 70°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento a 75°C por 6 h sob vácuo,

para degaseificação da amostra. As propriedades texturais da enzima foram então determinadas a partir dos dados de isoterma. A área superficial específica (S_{BET}) foi determinada pela técnica de multipontos BET (BRUNAUER-EMMETT-TELLER), o volume total de poros (V_{P}) por volume total de poro de um ponto único em $P/P_0=0,986669$, o tamanho médio dos poros (d_{P}) pelo método de BJH (BARRETT-JOYNER-HALENDA), a área de superfície microporosa, e, o volume de microporos pelo método de DR (DUBININ-RADUSHKEVICH) (IUPAC, 2015).

5. MODELAGEM MATEMÁTICA

A cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja em um sistema fechado e batelada, foi modelada considerando as seguintes hipóteses: (i) mistura perfeita para a fase líquida; (ii) processo isobárico e isotérmico; (iii) taxa de reação elementar; (iv) a reação de hidrólise enzimática foi definida pelo mecanismo de PPBB simplificado. Além das hipóteses anteriores, foram propostas modificações no modelo de modo a contemplar o mecanismo de inibição pelos produtos (ácidos graxos livres e glicerol). Dessa forma foram avaliados 4 modelos matemáticos, os quais foram nomeados da seguinte forma:

- Modelo 1: Mecanismo PPBBS sem inibição;
- Modelo 2: Mecanismo PPBBS com inibição do ácido graxo livre (AGL);
- Modelo 3: Mecanismo PPBBS com a inibição do glicerol (GLI);
- Modelo 4: Mecanismo PPBBS com inibição do ácido graxo livre e do glicerol simultaneamente.

5.1. MODELO 1 – MECANISMO PPBBS SEM INIBIÇÃO COMPETITIVA

O mecanismo cinético PPBBS da hidrólise enzimática do óleo de soja sem a interação de inibidores é representado na Tabela 5.1:

Tabela 5. 1. Mecanismo PPBBS sem inibição

$TAG + E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} ETAG$	(5.1)
$ETAG + H_2O \xrightarrow{k_3} AGL + DAG + E$	(5.2)
$DAG + E \xrightleftharpoons[k_5]{k_4} EDAG$	(5.3)
$EDAG + H_2O \xrightarrow{k_6} AGL + MAG + E$	(5.4)
$MAG + E \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} EMAG$	(5.5)
$EMAG + H_2O \xrightarrow{k_9} AGL + GLI + E$	(5.6)

TAG= Triacilglicerol; DAG= diacilglicerol; MAG= monoacilglicerol; AGL= ácidos graxos livres; GIL= glicerol; E= enzima; ETAG, EDAG, EMAG = complexo enzima – substrato; k1, k4, e k7 =constantes da velocidade específica de adsorção da enzima entre a interface aquosa enzima – substrato; k2, k5, e k8 =constantes de velocidade específica de desorção da enzima entre a interface aquosa enzima – substrato; k3, k6, e k9= constantes de velocidade específicas das reações.

O modelo matemático para a cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja foi obtido pela aplicação da lei de conservação de massa (em base molar) para todos os compostos. O balanço molar para TAG, DAG, MAG, água (H₂O), GLI e AGL, bem como para os complexos enzimáticos (ETAG, EDAG e EMAG) são demonstrados pelas Equações 5.7 – 5.15:

$$\frac{dC_{TAG}(t)}{dt} = -k_1 \cdot C_{TAG}(t) \cdot C_E(t) + k_2 \cdot C_{ETAG}(t) \quad (5.7)$$

$$\frac{dC_{ETAG}(t)}{dt} = k_1 \cdot C_{TAG}(t) \cdot C_E(t) - k_2 C_{ETAG}(t) - k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.8)$$

$$\frac{dC_{DAG}(t)}{dt} = k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_4 \cdot C_{DAG}(t) \cdot C_E(t) + k_5 \cdot C_{EDAG}(t) \quad (5.9)$$

$$\frac{dC_{EDAG}(t)}{dt} = k_4 \cdot C_{DAG}(t) \cdot C_E(t) - k_5 C_{EDAG}(t) - k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.10)$$

$$\frac{dC_{MAG}(t)}{dt} = k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_7 \cdot C_{MAG}(t) \cdot C_E(t) + k_8 \cdot C_{EMAG}(t) \quad (5.11)$$

$$\frac{dC_{EMAG}(t)}{dt} = k_7 \cdot C_{MAG}(t) \cdot C_E(t) - k_8 C_{EMAG}(t) - k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.12)$$

$$\frac{dC_{H_2O}(t)}{dt} = -k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.13)$$

$$\frac{dC_{GLI}(t)}{dt} = k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.14)$$

$$\frac{dC_{AGL}(t)}{dt} = k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) \quad (5.15)$$

O balanço molar para a enzima livre (E), dado pela Equação 5.16, foi escrito baseado na concentração do complexo enzima – substrato e na concentração total de enzima (C_E^{total}). Dessa forma, o modelo 1 é composto pelo sistema de equações 5.7 – 5.16.

$$C_E(t) = C_E^{total} - C_{ETAG}(t) - C_{EDAG}(t) - C_{EMAG}(t) \quad (5.16)$$

5.2. MODELO 2 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO POR ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

O mecanismo cinético PPBBS da hidrólise enzimática do óleo de soja com a inibição pelo glicerol é representada na Tabela 5.1, adicionado do mecanismo:



Dessa forma, o modelo 2 possui 11 parâmetros, adicionado de k_{10} e k_{11} . Neste, também foi aplicada a lei de conservação de massa (em base molar) para todos os compostos, para o qual utilizou-se das Eq. 5.7 – 5.14. Entretanto, a Eq. 5.15 é alterada para a Equação 5.18 devido ao fato do ácido graxo livre agir como inibidor. Além disso, adiciona-se ao modelo a Equação 5.19.

$$\frac{dC_{AGL}(t)}{dt} = k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_{10} C_{AGL}(t) \cdot C_E(t) + k_{11} C_{EAGL}(t) \quad (5.18)$$

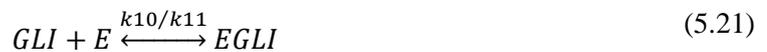
$$\frac{dC_{EAGL}(t)}{dt} = k_{10} \cdot C_{AGL}(t) \cdot C_E(t) - k_{11} C_{EAGL}(t) \quad (5.19)$$

O balanço molar para a enzima livre (E) foi escrito baseado na concentração do complexo enzima–substrato e na concentração total de enzima (C_E^{total}), e é dado pela Equação 5.20. Dessa forma, o modelo 2 é composto pelo sistema de equações 5.7 – 5.14, 5.18 – 5.20.

$$C_E(t) = C_E^{total} - C_{ETAG}(t) - C_{EDAG}(t) - C_{EMAG}(t) - C_{EAGL}(t) \quad (5.20)$$

5.3. MODELO 3 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO PELO GLICEROL

Acredita-se que um grande obstáculo para a hidrólise total é a formação contínua de glicerol durante a reação. Este pode formar uma camada hidrofílica em torno da enzima que limita a taxa de difusão do substrato, resultando em menor taxa de conversão de acilgliceróis em AGL (CHEONG et al., 2007; YEOH et al., 2009). Logo, de forma análoga ao modelo 2, o mecanismo cinético PPBBS da hidrólise enzimática do óleo de soja com inibição do glicerol é representado na Tabela 5.1, e adicionado do mecanismo:



O modelo 3 também possui 11 parâmetros (adicionado de k_{10} e k_{11}) e neste também foi aplicado a lei de conservação de massa (em base molar) para todos os compostos. Dessa forma, a Eq. 5.14 é alterada para a Equação 5.22, e adiciona-se a Equação 5.23.

$$\frac{dC_{GLI}(t)}{dt} = k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_{10} C_{GLI}(t) \cdot C_E(t) + k_{11} C_{EGLI}(t) \quad (5.22)$$

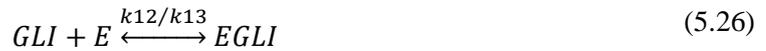
$$\frac{dC_{EGLI}(t)}{dt} = k_{10} \cdot C_{GLI}(t) \cdot C_E(t) - k_{11} C_{EGLI}(t) \quad (5.23)$$

O balanço molar para a enzima livre (E) foi escrito baseado na concentração do complexo enzima–substrato e na concentração total de enzima (C_E^{total}), dado pela Equação 5.24. Dessa forma, o modelo 3 é composto do sistema de equações 5.7 – 5.13, 5.15, 5.22 – 5.24.

$$C_E(t) = C_E^{total} - C_{ETAG}(t) - C_{EDAG}(t) - C_{EMAG}(t) - C_{EGLI}(t) \quad (5.24)$$

5.4. MODELO 4 – MECANISMO PPBBS COM INIBIÇÃO ÁCIDOS GRAXOS LIVRES E GLICEROL

Para o modelo 4, considerou-se na cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja pelo mecanismo de PPBBS a inibição competitiva tanto do ácido graxo livres como também a interação do glicerol. Este mecanismo é apresentado na Tabela 5.1 e adicionado dos mecanismos:



O modelo 4, é adicionado de 4 constantes (k_{10} , k_{11} , k_{12} e k_{13}), totalizando 13 parâmetros. Para a cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja, também, foi obtido pela aplicação da lei de conservação de massa (em base molar) para todos os compostos, para o qual utilizou-se das Eq. 5.7 – 5.13. Neste modelo a Eq. 5.14 é substituída pela Equação 5.27 e a Eq. 5.15 pela Equação 5.28. Além disso, adicionou-se as Equações 5.29 e 5.30.

$$\frac{dC_{GLI}(t)}{dt} = k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_{12} C_{GLI}(t) \cdot C_E(t) + k_{13} C_{EGLI}(t) \quad (5.27)$$

$$\frac{dC_{AGL}(t)}{dt} = k_3 \cdot C_{ETAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_6 \cdot C_{EDAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) + k_9 \cdot C_{EMAG}(t) \cdot C_{H_2O}(t) - k_{10} C_{AGL}(t) \cdot C_E(t) + k_{11} C_{EAGL}(t) \quad (5.28)$$

$$\frac{dC_{EAGL}(t)}{dt} = k_{10} \cdot C_{AGL}(t) \cdot C_E(t) - k_{11} C_{EAGL}(t) \quad (5.29)$$

$$\frac{dC_{EGLI}(t)}{dt} = k_{12} \cdot C_{GLI}(t) \cdot C_E(t) - k_{13} C_{EGLI}(t) \quad (5.30)$$

O balanço molar para a enzima livre (E), dado pela Equação 5.31, foi escrito baseado na concentração do complexo enzima – substrato e na concentração total de enzima (C_E^{total}). Dessa forma, o modelo 4 é composto do sistema de equações 5.7 – 5.13, 5.27 – 5.31.

$$C_E(t) = C_E^{total} - C_{ETAG}(t) - C_{EDAG}(t) - C_{EMAG}(t) - C_{EAGL}(t) - C_{EGLI}(t) \quad (5.31)$$

5.5. RESOLUÇÃO DOS MODELOS E OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS

Os modelos matemáticos foram compostos por diferentes sistemas de equações conforme discriminado na Tabela 5.2, e utilizou-se das condições iniciais dadas pelas Equações 5.32 – 5.41, em que os valores foram calculados com base na massa total de óleo e água utilizadas na reação de hidrólise. Os modelos foram resolvidos pelo método numérico Rosenbrock (ROSENBROCK, 1963) utilizando para tanto o *software* Maple®. As condições iniciais para TAG e H₂O variaram conforme a razão molar água/óleo.

$$C_{TAG}(0) = 4,916 \cdot 10^{-4} - 8,973 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL}^{-1} \quad (5.32)$$

$$C_{DAG}(0) = 0 \quad (5.33)$$

$$C_{MAG}(0) = 0 \quad (5.34)$$

$$C_{AGL}(0) = 5,704 \cdot 10^{-7} \text{ mol mL}^{-1} \quad (5.35)$$

$$C_{GLI}(0) = 0 \quad (5.36)$$

$$C_{H_2O}(0) = 8,070 \cdot 10^{-3} - 29,55 \cdot 10^{-3} \text{ mol mL}^{-1} \quad (5.37)$$

$$C_{ETAG}(0) = 0 \quad (5.38)$$

$$C_{EDAG}(0) = 0 \quad (5.39)$$

$$C_{EMAG}(0) = 0 \quad (5.40)$$

$$C_E(0) = 1,093 \cdot 10^{-5} \text{ mol mL}^{-1} \quad (5.41)$$

Tabela 5. 2. Discriminação do conjunto de equações utilizadas para cada modelo matemático (1, 2, 3 e 4)

Modelo		Equações
1	Mecanismo Pingue-Pongue simplificado SEM inibição competitiva	5.7 – 5.16
2	Mecanismo Pingue-Pongue simplificado com inibição competitiva pelo AGL	5.7 – 5.14, 5.18 – 5.20
3	Mecanismo Pingue-Pongue simplificado com inibição competitiva pelo GLI	5.7 – 5.13, 5.15, 5.22 – 5.24
4	Mecanismo Pingue-Pongue simplificado com inibição competitiva pelo AGL e GLI	5.7 – 5.13, 5.27 – 5.31

Os valores das constantes de velocidade foram estimados a partir dos dados experimentais obtidos pela cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja e a minimização da função objetivo, a qual é representada pela Equação 5.42. Para a busca do mínimo da função objetivo foi empregado o método *Golden Search* à um conjunto de dados aleatório, o qual posteriormente serviu de estimativa para o método o *Simplex Downhill* desenvolvido por Nelder e Mead (1965).

$$fOB = \sum_{j=1}^{nc} \sum_{i=1}^{nd} (c_{j,i}^{exp} - c_{j,i}^{mod})^2, \quad (5.42)$$

em que: nc é o número de componentes da reação; nd é o número de dados experimentais; $c_{j,i}^{exp}$ é a concentração experimental i do componente j ; $c_{j,i}^{mod}$ é a concentração i do componente j calculado pelo modelo.

O ajuste dos modelos foi avaliado por meio da análise do coeficiente de determinação (R^2) e do critério corrigido de informação Akaike (AICc), que considera os diferentes números de parâmetros em cada modelo (HURVICH & TSAI, 1991), conforme a Equação 5.43:

$$AICc = n \ln \left(\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{nd} \frac{(c_{i,j}^{exp} - c_{i,j}^{mod})^2}{n} \right) + 2(p + 1) + \frac{2(p + 1)(p + 2)}{n - p - 2} \quad (5.43)$$

Em que $c_{j,i}^{exp}$ é a concentração experimental i do componente j ; $c_{j,i}^{mod}$ é a concentração modelada i do componente j ; n é o número de experimentos e p é o número de parâmetros do modelo.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE SOJA

Na Tabela 6.1 são apresentados os resultados de rendimento de AGL para as diferentes: razões molares água/óleo e temperaturas. Nas Figuras 6.1, 6.2 e 6.3 são apresentados os dados experimentais para as cinéticas da hidrólise enzimática do óleo de soja obtidos das razões molares água/óleo de 9:1, 20:1, 46:1 e 60:1, e temperatura de 40, 52 e 64°C, respectivamente. Em geral, pode-se observar que os equilíbrios das reações de hidrólise enzimática do óleo de soja foram alcançados em torno de 30 h. Os dados experimentais obtidos para o rendimento em AGL apresentam valores superiores em relação aos demais estudos sobre a cinética da hidrólise enzimática dos óleos vegetais relatados por outros autores, como: Awadallak et al. (2013) (38% em 4 h), Freitas et al. (2007) (30% em 4 h), Voll (2011) (máx. 52% em 50 h), mas inferiores a Cavalcanti-Oliveira et al. (2011) (89% em 48 h), conforme descritos na Tabela 3.3. Para esse último os autores utilizaram de uma lipase líquida, o que pode ter favorecido a reação. Dessa forma, o melhor resultado para o rendimento de ácidos graxos livres foi de 77%, para as razões molares água/óleo de 46:1 e 60:1 com temperaturas de 52 e 64°C.

Tabela 6. 1. Resultados de rendimento em percentual (%) de ácidos graxos livres da reação de hidrólise enzimática do óleo de soja

Razão molar água/ óleo	Temperatura (°C)		
	40	52	64
9:1	45 ±0,9	59 ±1,2	57 ±1,1
20:1	49 ±1,0	71 ±1,4	69 ±1,4
46:1	53 ±1,1	77 ±1,5	77 ±1,5
60:1	53 ±1,1	75 ±1,5	77 ±1,5

No presente trabalho considerou-se o maior erro obtido com base nos experimentos realizados em duplicata, logo este foi de 2% e aplicados em todos os dados experimentais.

Segundo Pourzolfaghar et al. (2016), a reação de hidrólise enzimática de óleos vegetais é governada (ou limitada) pela interface água/óleo. A reação inicia com a adsorção da lipase na interface, e em seguida, essa lipase adsorvida se liga à molécula do substrato, gerando um complexo enzima-substrato. Posteriormente, após uma série de reações, os produtos solúveis (ácidos graxos livres e glicerol) difundem na camada de água. A hidrólise de óleos e gorduras

ocorre pela presença de água no meio, sabe-se por meio da estequiometria da reação que, um mol de triacilglicerol reage com 3 mols de água para produzir 3 mols de ácidos graxos livres e 1 mol de glicerol. O excesso de água no sistema poderá favorecer o deslocamento da reação no sentido da formação de produtos. Isso pode ser observado quando se compara o rendimento das reações de hidrólise nas razões molares de 9:1 (temp. 52°C em que o rendimento foi 59%) até a razão molar de 46:1 (temp. 52°C – rendimento 77%).

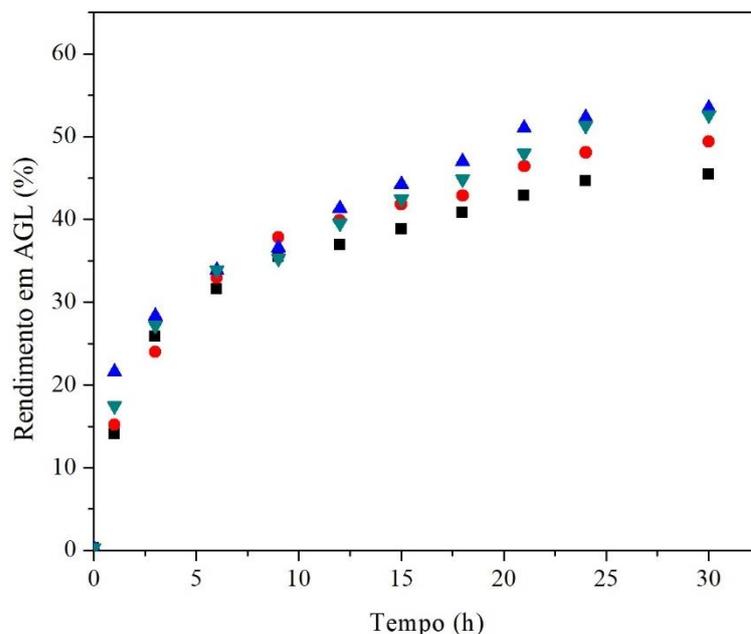


Figura 6. 1. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 40°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).

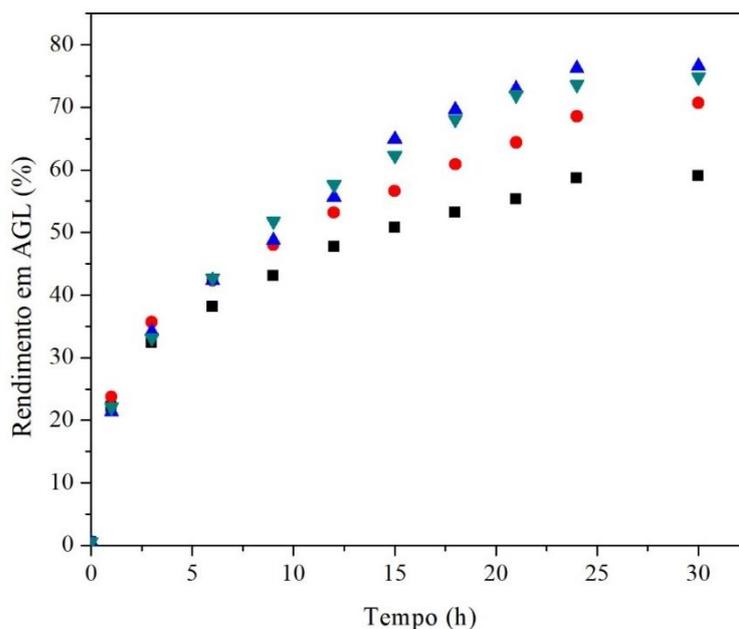


Figura 6. 2. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 52°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)

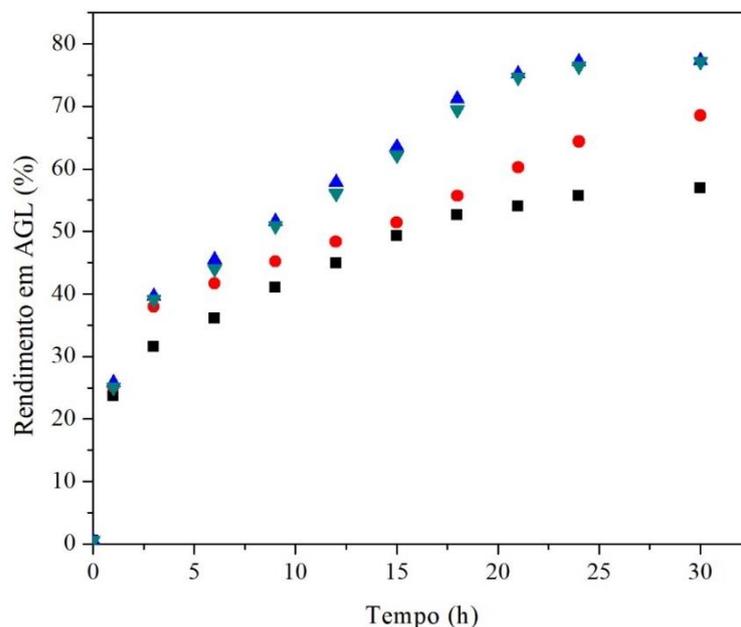


Figura 6. 3. Cinética da Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 64°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)

Registros na literatura indicam que um leve aumento na quantidade de água no meio reacional, leva a um aumento de atividade enzimática devido à melhor conformação enzimática e maior área de interface. Porém, a partir de uma quantidade máxima, pode ocorrer a inibição da atividade catalítica da lipase pelo alto teor de água (COSTA et al., 1999; CHU et al., 2002; YOU & BAHARIN, 2006; LU et al., 2009; GOG et al., 2012; AWADALLAK et al., (2013). Entretanto, esse fato não pode ser observado dentro da faixa da razão molar água/óleo 9 – 60:1 no presente estudo. De acordo com Yadav e Devi (2004), a adição de água além de um valor crítico, pode aumentar a espessura da camada da água formada em torno da enzima. Este fato faz com que os reagentes e os produtos com fraca solubilidade em meio aquoso, como é o caso do óleo, tenham mais dificuldade de se difundir por meio da camada de água para os centros ativos da enzima. A quantidade de água na reação influencia o equilíbrio entre a enzima e o substrato, bem como na área interfacial da fase polar e não polar. Além disto, uma alta quantidade de água (acima do ponto crítico) pode influenciar negativamente na estrutura secundária e terciária das enzimas afetando assim sua atividade (WARSHEL & LEVITT, 1976; BELL et al., 1995; COSTA et al., 1999; LU et al., 2009; GOG et al., 2012).

Um dos principais fatores que limitaram o uso de enzimas na hidrólise de óleos vegetais são as baixas taxas de reação comumente observadas (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Na

Tabela 6.2 são apresentadas as taxas de reação inicial ($d C_{AGL}/dt$, para $t = 0$), para as razões molares e temperaturas estudadas. As taxas de reação inicial encontradas no presente estudo são inferiores ao estudo de Chew et al., (2008), que estudaram a hidrólise da cinética do óleo palma usando Lipozyme TL IM com temperatura de 55°C e velocidade de agitação de 200 rpm atingindo a maior taxa de reação inicial de $3,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$. E superiores ao estudo de Huang et al. 2010, que estudaram o efeito cinético do ultrassom na hidrólise do óleo de soja catalisada por lipase *Candida lipolytica* com temperatura de 45 ° C e potência ultrassônica de $1,64 \text{ W cm}^{-2}$ e obtiveram uma taxa de reação inicial de $5,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Segundo Voll (2011), as reações de hidrólise enzimática de óleo vegetais apresentam uma taxa de reação inicial lenta, devido a miscibilidade limitada da água no óleo. Contudo, à medida que a reação ocorre há formação dos compostos intermediário (diacilgliceróis e monoacilgliceróis), as quais possuem propriedades surfactante, logo a miscibilidade de água no óleo é favorecida promovendo maior contato entre as fases. Esse fenômeno pode aumentar a velocidade de reação em determinado período de tempo. Posteriormente, ao final da reação (consumo de substratos), as velocidades de reação se tornam mais lentas e tendem a zero quando a reação se aproxima do equilíbrio químico.

Tabela 6. 2. Resultados da taxa inicial da reação ($\times 10^{-5} \text{ mol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de hidrólise enzimática do óleo de soja

Razão molar água/ óleo	Temperatura (°C)		
	40	52	64
9:1	$1,01 \pm 0,05$	$1,39 \pm 0,07$	$1,40 \pm 0,07$
20:1	$0,99 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,08$	$1,61 \pm 0,08$
46:1	$1,26 \pm 0,06$	$1,41 \pm 0,07$	$1,67 \pm 0,08$
60:1	$1,13 \pm 0,06$	$1,40 \pm 0,07$	$1,64 \pm 0,08$

Os resultados obtidos no presente trabalho têm semelhança com o estudo de Phuah et al., (2012), que estudaram a hidrólise de óleo vegetal em uma faixa de temperatura entre 45 – 85°C. Observaram que a taxa inicial de reação apresentou um maior acréscimo na faixa de 45 – 55°C, quando comparado com a faixa de 55 – 65°C. Este fato também é observado nos resultados (taxa inicial de reação) apresentados na Tabela 6.2, em que a faixa de 40 – 52°C apresentou uma maior inclinação quando comparada com a de 52 – 64°C.

As reações químicas são claramente afetadas pela temperatura. Tal influência é observada nas cinéticas estudadas. Ao elevar a temperatura houve um aumento na taxa inicial de reação (Tabela 6.2). Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Barsi et al., (2013) e Lascaray et al., (1952). Estes últimos, estabeleceram que um aumento de temperatura de 10°C poderia aumentar a taxa de reação em um fator de 1,2-1,5. Quando se eleva a temperatura de uma reação, conseqüentemente eleva-se a agitação das partículas reagentes, fornecendo mais energia cinética para elas. Com isso, mais colisões ocorrerão e com mais energia, aumentando a quantidade de partículas que reagirão, aumentando a velocidade da reação (LIMA et al., 2008). Este fenômeno é devido ao fato de que mais moléculas de substrato ganharam quantidade suficiente de energia para superar o estado de transição da reação de hidrólise. Além disso, a viscosidade reduzida tanto para o óleo como para a água em temperatura elevada, reduz a resistência à transferência de massa externa, melhorando o processo de difusão das moléculas de substratos com as enzimas, assim, aumenta-se a interação entre partículas de enzima e substrato (PHUAH et al., 2012). Contudo, ressalta-se que em temperaturas mais elevadas (>70°C) a taxa inicial de reação pode decrescer devido a desnaturação proteica (NARWAL & GUPTA, 2013).

Entretanto, ao avaliar a temperatura 40°C, nota-se que está apresentou um comportamento diferente em relação as demais. Observou-se que há um aumento da taxa inicial entre as razões molares água/óleo de 20:1 a 46:1, e um decréscimo entre as razões de 46:1 e 60:1. Para as temperaturas de 52 e 64°C, esse aumento da taxa inicial ocorreu entre as razões molares de 9:1 a 20:1. Visto que a redução da viscosidade da emulsão é uma consequência do aumento da temperatura, esta pode contribuir com o aumento da taxa inicial de reação nas razões molares de 9 e 20:1. Da mesma forma, os estudos realizados por Coelho et al., (2013), mostram que ensaios conduzidos em temperaturas iguais ou/e inferiores a 40°C reduzem a taxa da hidrólise de óleos vegetais. Isso ocorre devido ao aumento da viscosidade da emulsão pela aglomeração das gotas de óleo, as quais são favorecidas com a redução da temperatura.

Em paralelo a esse fato, Phuah et al., (2012), relatou em seu estudo que, uma baixa taxa de reação inicial pode ser observada com baixo teor de água, indicando moléculas de água insuficientes para reagir com óleo durante o processo de hidrólise. No estudo de Zaks e Klibanov (1988) descobriu-se que as moléculas de água são responsáveis pela ativação dos biocatalisantes, mantendo a conformação das moléculas da enzima e a adição de certa quantidade de água é, portanto, crucial para atingir uma maior taxa de reação. Esses fatores (baixa temperatura, baixo teor de água e viscosidade elevada), em conjunto, podem estar

influenciando o comportamento da taxa inicial de reação na temperatura de 40°C. Outro fator que pode estar relacionado a razão molar água/óleo frente a taxa inicial de reação é a emulsificação do meio reacional. Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo, consistindo de ao menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas, com o diâmetro que, em geral, excede 0,1µm. Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólidos finamente divididos, que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras (BARROS et al., 2007). Em conjunto, DAG e MAG (produtos intermediários da hidrólise) apresentam características emulsificantes, o que em períodos de tempo maiores, podem auxiliar na estabilidade do meio. Mas, em curtos períodos de tempo a mistura (água + óleo) pode não estar homogênea, podendo causar alterações entre as ligações enzima- substrato (VOLL, 2011).

Em suma, os resultados da cinética de hidrólise enzimática do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme TL IM mostraram que a razão molar água/óleo, bem como a temperatura, têm influência tanto sobre a taxa de velocidade inicial, quanto sobre o rendimento de ácidos graxos livres. Logo, a otimização desses parâmetros se faz necessária visando aumentar quantitativamente o rendimento da hidrólise.

6.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DURANTE O PROCESSO REACIONAL

Para avaliar a possibilidade de desativação da enzima ao longo do processo de hidrólise foram realizadas medidas de atividade enzimática da Lipozyme TL IM. Conforme apresentado na seção 4.2.3, foi necessário estabelecer um procedimento de recuperação da enzima da mistura (fase óleo + fase água) para realização da análise de atividade enzimática, o qual consistiu em lavagem com hexano, filtração e secagem em estufa à 40°C. Desta forma, para avaliar inicialmente o efeito deste procedimento, a enzima virgem foi submetida a estas etapas antes da determinação da sua atividade enzimática. Os valores da atividade da enzima antes e pós-processo de recuperação foram 237 e 229 U g⁻¹, respectivamente. Verifica-se que o procedimento promoveu uma redução de aproximadamente 3% na atividade da enzima Lipozyme TL IM.

Segundo Zaks e Klivanov (1988), as enzimas possuem uma fina camada de hidratação (água), a qual atua como componente primário do microambiente enzimático. Essa, age como tampão entre a superfície da enzima e o ambiente. Para reações conduzidas em ambientes não aquosos, a atividade enzimática é controlada pela interação entre os solventes orgânicos e as moléculas de água ligadas à enzima. Contudo, alguns solventes que sejam capazes de subtrair esta água estrutural podem provocar a inativação da enzima (COSTA et al., 1999). Conforme Norin et al. (1994), uma característica preponderante das lipases em meio anidro é a rigidez conformacional adquirida, consequência de fortes interações de natureza eletroestática. No caso de enzimas ativas em solventes orgânicos, a água pode atuar como lubrificante, fazendo ligações com os grupos funcionais da proteína, assim atenuando a rigidez, mantendo as características estruturais, bem como a sua atividade enzimática (COSTA et al., 1999). Esse fato foi observado por Rodrigues e Ayub (2011), quando avaliaram a reutilização de lipases (Lipozyme TL IM e RM IM) em ciclos de hidrólise do óleo de soja. A cada ciclo, as enzimas foram lavadas com *n*-hexano e, foi verificado que após 10 bateladas a atividade das enzimas manteve-se praticamente constante. Adicionalmente, realizaram ciclos com as lipases sem empregar o procedimento de lavagem com *n*-hexano e, verificaram que após 3 ciclos as enzimas perderam significativamente sua atividade. Ao comparar com o presente trabalho, acredita-se que redução de aproximadamente 3% da atividade da enzima Lipozyme TL IM deve-se principalmente ao procedimento de secagem.

Na Figura 6.4 – 6.6 é apresentado a cinética de desativação da enzima Lipozyme TL IM utilizadas nas cinéticas de hidrólise do óleo de soja nas temperaturas de 40, 52 e 64°C, com suas respectivas razões molares. Observa-se, em todas as cinéticas, uma diminuição da atividade enzimática durante o processo. Considerando uma atividade inicial de 229 U g⁻¹, houve reduções da atividade enzimática observadas para as cinéticas conforme observado na Tabela 6.3.

Tabela 6. 3. Percentual de redução da atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM no processo de hidrólise enzimática

Razão molar água/ óleo	Temperatura (°C)		
	40	52	64
9:1	23 ± 1,1	25 ± 1,2	25 ± 1,2
20:1	25 ± 1,2	30 ± 1,5	29 ± 1,4
46:1	27 ± 1,3	30 ± 1,5	30 ± 1,5
60:1	27 ± 1,3	27 ± 1,3	28 ± 1,4

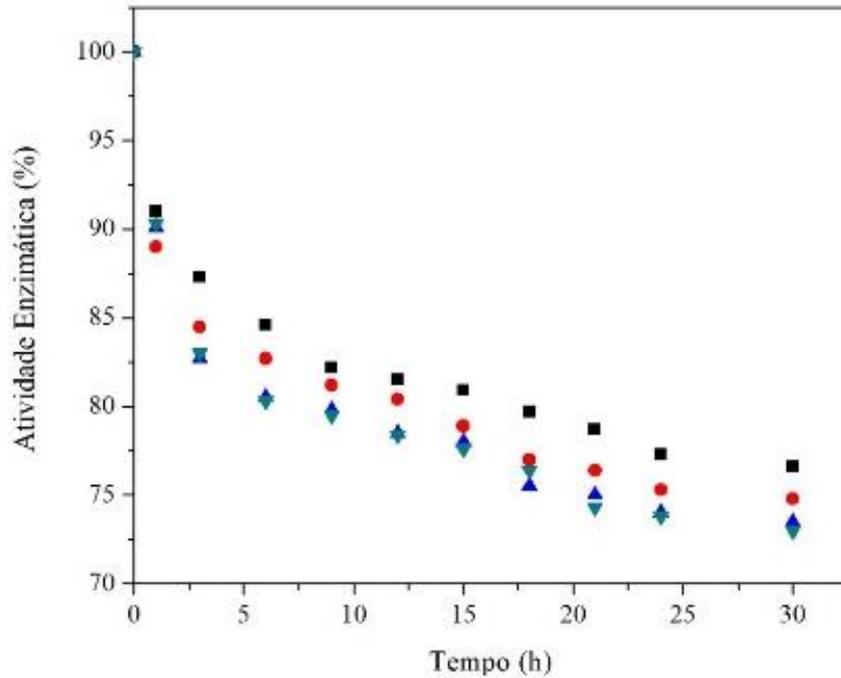


Figura 6. 4. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 40°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O).

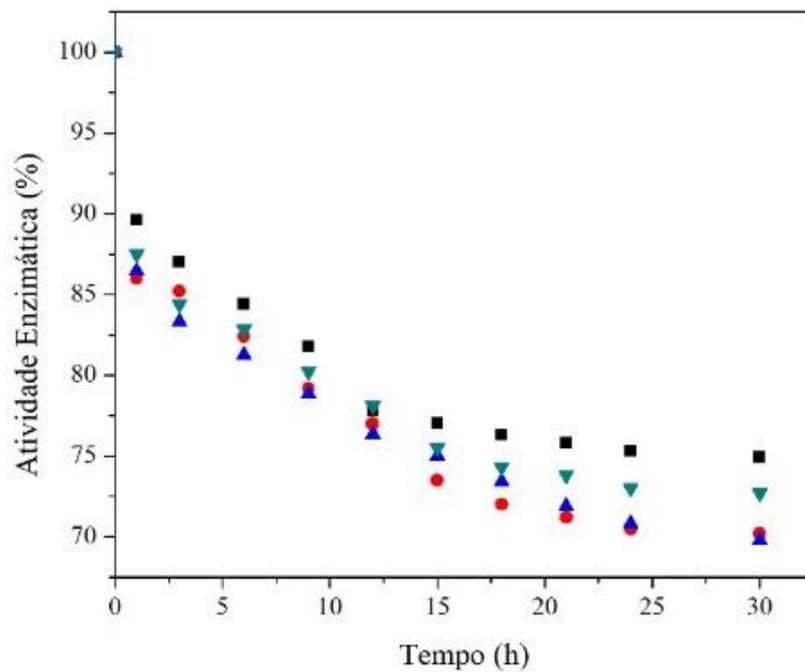


Figura 6. 5. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 52°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)

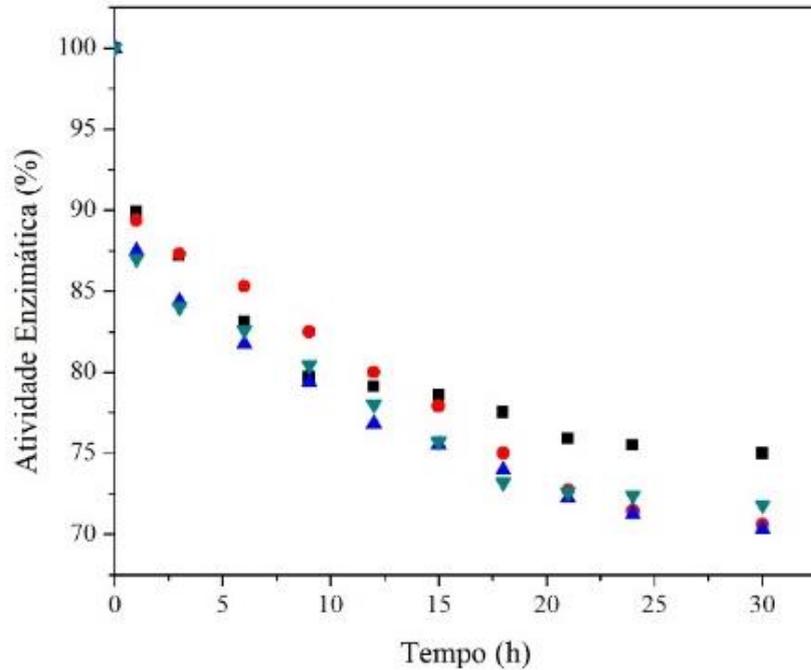


Figura 6. 6. Atividade enzimática da lipase Lipozyme TL IM para as razões molares A/O de 9:1 (■), 20:1(●), 46:1 (▲), e 60:1 (▼) com 64°C; 250 rpm e 1% de enzima (razão mássica E/O)

Inúmeros são os fatores que influenciam a atividade enzimática da lipase durante o processo de hidrólise tais como: pH, temperatura, velocidade de agitação, entre outras. De acordo com Castro et al (2004) as lipases possuem atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e usualmente estáveis em soluções aquosas neutras em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Entretanto a ficha técnica apresentada pela Novozymes, para a Lipozyme TL IM é a faixa de temperatura de 50 – 75°C e o pH é entre 6 – 8. Embora as lipases, em geral, apresentem os intervalos com determinadas condições (pH, temperatura), estes não garantem que a sua atividade seja preservada durante o processo.

O pH do meio (fase óleo + fase água) pode afetar a estrutura tridimensional da enzima, bem como as cargas de caráter iônico dos substratos, o que conseqüentemente afeta a atividade desta (ZENEVICZ et al, 2016). Contudo para o presente trabalho não estudou-se a variação do pH, mantendo-se o mesmo para todas as cinéticas estudadas. Logo, não foi possível avaliar a influência do pH em relação a atividade enzimática da Lipozyme TL IM.

As enzimas quando submetidas a temperaturas elevadas por um período de tempo considerável pode ter sua estrutura comprometida. Esse fato ocorre devido ao processo de desnaturação das proteínas que a compõe (ZENEVICZ et al., 2016). A desnaturação ocorre devido ao rompimento das ligações de hidrogênio. Essas ligações são termolábeis e

desencadeiam uma série de modificações estruturais, que alteram a conformação da enzima. As modificações podem reduzir gradativamente a atividade enzimática até o ponto onde ocorre sua completa inativação. De acordo com a Novozymes, a Lipozyme TL IM é estável na faixa de temperatura de 50 a 75°C, logo, neste estudo utilizou-se 40, 52 e 64°C, sendo essas temperaturas inferiores ao limite máximo. Observou-se, por meio da Tabela 6.3, que ao elevar a temperatura (40 para 52°C) houve um decréscimo da atividade enzimática, entretanto ao elevar novamente (52 para 64°C), estas não alteraram significativamente ($\pm 2\%$). Dessa forma, acredita-se que este fator não seja o causador da desativação ao longo do processo.

Noor et al. (2003), avaliaram o efeito de diferentes variáveis operacionais na velocidade inicial da reação de hidrólise do óleo de palma pela ação da lipase-SP398 (lipase em solução líquida). Uma das condições avaliadas foi a velocidade de agitação (250 e 2000 rpm – agitador com pás de hélice). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a taxa inicial da reação foi aumentada com a velocidade de agitação. É importante ressaltar que a taxa de reação inicial é calculada a partir da derivada da concentração do reagente e/ou produto em função do tempo com limite tendendo a zero ($d C_{AGL}/dt$, para $t=0$). Logo, estes resultados não contemplam o efeito da agitação sobre a enzima ao longo do processo. Inclusive, de acordo com Noor et al. (2003), determinadas velocidades de agitação podem promover a desativação da enzima ao longo do tempo por cisalhamento e, deve ser um efeito considerável (NOOR et al., 2003), principalmente, para enzimas suportadas.

Chen e Wang (1998), Cheirsilp et al. (2007) e Voll et al. (2011) avaliaram a produção de monoacilgliceróis (MAG) a partir da hidrólise/glicerólise/transesterificação de óleos vegetais. Experimentos foram conduzidos com diferentes dosagens iniciais de glicerol no óleo vegetal e mostraram que o rendimento da reação em termos de monoacilglicerol foi reduzido com a dosagem inicial de glicerol. De acordo com os autores, este fato deve-se a adsorção do glicerol no suporte da enzima, o que provoca maiores limitações para que a reação de formação dos monoacilgliceróis a partir de tri e diacilgliceróis (TAG e DAG) ocorra. Esta reação depende da ligação dos substratos, neste caso TAG e DAG, nos sítios da enzima (mecanismo conhecido como *chave-fechadura*) e, o glicerol adsorvido age com um inibidor desta etapa. Acredita-se que o mesmo tenha ocorrido no presente trabalho, uma vez que, a reação de hidrólise enzimática de óleos vegetais promove a quebra do tri, di e mono-acilgliceróis formando glicerol e ácidos graxos livres. De acordo com Rooney e Weatherley (2001), uma forma de aumentar o grau de hidrólise é pela remoção do glicerol formado durante o processo.

Dentre os fatores que influenciam a atividade enzimática como: pH, temperatura, velocidade de agitação e adsorção do glicerol na superfície da enzima, acredita-se que este último possa ter maior influência na perda de atividade enzimática da Lipozyme TL IM para o presente trabalho. Dessa forma, o intuito da determinação da atividade enzimática faz-se necessária para contribuir com a modelagem matemática.

6.3. FISISSORÇÃO DE N₂ DA LIPOZYME TL IM

A isoterma de fisissorção de N₂ da lipase Lipozyme TL IM e a distribuição de poros são apresentados nas Figuras 6.7 e 6.8, respectivamente. Os parâmetros morfológicos da Lipozyme TL IM são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6. 4. Resultados dos parâmetros morfológicos para a enzima Lipozyme TL IM

Enzima	Área superficial específica (S _{BET})	Volume total de poros (V _P)	Volume de microporos	Tamanho médio de poro (d _P)	Área superficial microporosa
Lipozyme TL IM	68,785 m ² g ⁻¹	0,128 cm ³ g ⁻¹	0,00303 cm ³ g ⁻¹	15,783 Å	37,14 m ² g ⁻¹

Souza et al. (2013), que estudaram a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada e obtiveram resultados de área superficial de 143 – 245 m² g⁻¹ e diâmetro de poros de 19 – 38 Å. Sharma et al. (2013) avaliaram a hidrólise enzimática de óleo de fígado de bacalhau com a lipase *Candida cylindrace* e obtiveram valores de 17,9 m² g⁻¹ para área superficial, diâmetro de poro de 66,3 Å e, 0,03 cm³ g⁻¹ para o volume de poros. Com a lipase *Candida rugosa*, os autores obtiveram valores de 7,8 m² g⁻¹ para área superficial, 48,7 Å de diâmetro de poro, e volume de poros em 0,09 cm³ g⁻¹. Com isso, os parâmetros estimados da Lipozyme TL IM indicam ser uma lipase pouco porosa, quando comparado com as lipases *Burkholderia cepacia*, *Candida rugosa* e *Candida cylindrace*.

A isoterma de adsorção/dessorção de N₂ (Figura 6.7-A) apresentou tipo IV(a), com circuito de histerese, que está associado à condensação capilar em mesoporos. Além disso, a curva de dessorção mostrou um loop de histerese tipo H3, que pode ser atribuído com poros em forma de placas (IUPAC, 2015). Pelo modelo de fisissorção BET, a constante C foi maior do

que a unidade ($C=48,224$) confirmando a isoterma do tipo IV(a). Além disso, a distribuição do tamanho dos poros (Figura 6.7-B) apresenta uma maior incidência de mesoporos na faixa de 10 a 50 Å (1 a 5,0 nm), com alguns pontos em macroporos. Também o valor médio do tamanho dos poros é característico de partículas mesoporosas ($2 < d_p < 50$ nm), concordando com a isoterma do tipo IV(a).

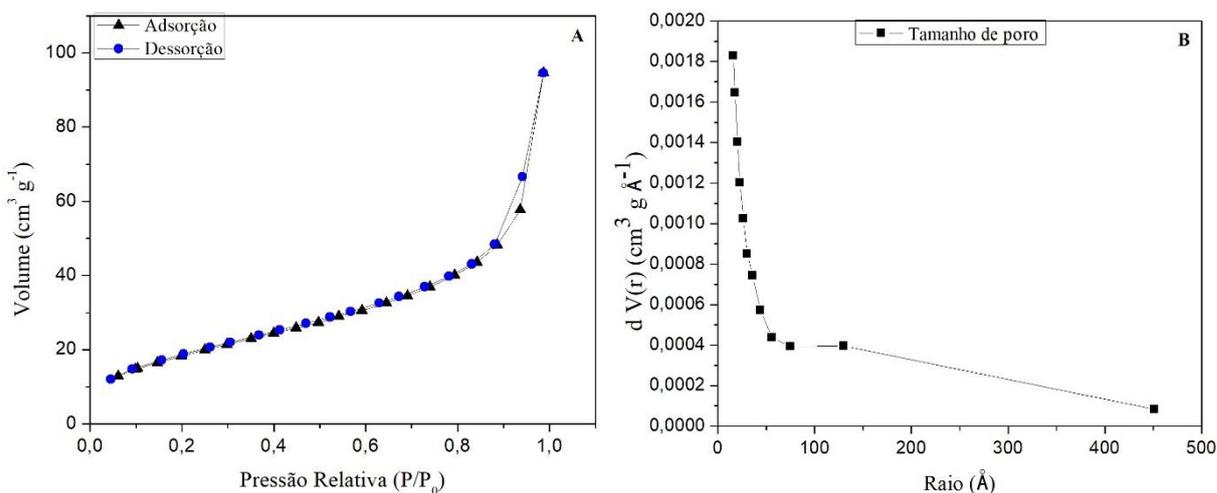


Figura 6. 7. Isotherma de fisissorção de N2 (A) e Distribuição do tamanho de poros (B) para a Lipozyme TL IM

Os resultados descritos anteriormente demonstram que a forma ou, a conformação do sítio ativo da lipase, desempenham um papel importante na especificidade da lipase para o seu substrato, logo, a ligação perfeita do substrato depende da uniformidade na forma e tamanho das lipases, isso porque as partículas uniformes podem fornecer uma melhor ligação do substrato na estrutura da tampa aberta da lipase em seus sítios ativos (SHARMA et al., 2013). Além disso, o tamanho da partícula é muito importante para a atividade enzimática, pois a área superficial da matriz está intimamente relacionada com a atividade catalítica da enzima (MENDES et al., 2011). E, também, um sólido que possui elevada área superficial é capaz de reagir ou adsorver mais rápido um adsorvato em ensaios de adsorção/dessorção. Grandes áreas superficiais são características de suportes mesoporosos (diâmetros que variam de 2 a 5 nm), tornando-se uma estratégia geralmente positiva devido à minimização das restrições difusionais e melhoria da acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima. (CARVALHO et al., 2015).

Na Figura 6.8 é apresentado a estrutura tridimensional de uma molécula de triacilglicerol, a qual apresenta 50 Å. Dessa forma fica evidente que a reação entre a enzima e o triacilglicerol é uma reação de superfície, visto que os poros da enzima são de 15,78Å.

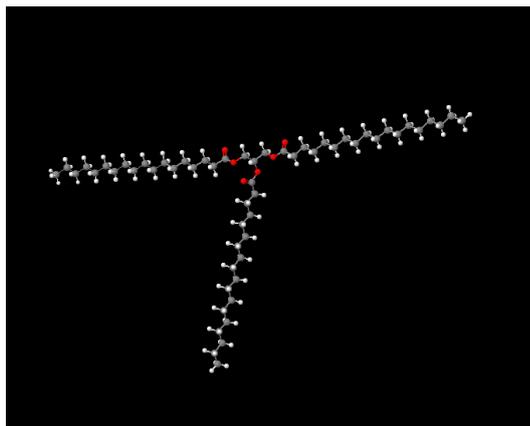


Figura 6. 8. Estrutura tridimensional de uma molécula de triacilglicerol (MolView)

Para as lipases imobilizadas, como a Lipozyme TL IM, a natureza física do suporte, como por exemplo, a morfologia, o tamanho e distribuição dos poros, influencia diretamente no rendimento de imobilização e em efeitos difusionais causados pela transferência de massa entre o meio líquido e os biocatalisadores. Dentre as limitações que podem influenciar é a transferência de massa externa, que envolve a transferência de reagentes/substratos do meio reacional até a superfície do suporte de imobilização, visto que o tamanho da molécula de triacilglicerol é superior aos tamanhos médios de poros da enzima (CARVALHO et al., 2015).

6.4. MODELAGEM MATEMÁTICA

A modelagem matemática e a simulação do processo de hidrólise enzimática do óleo de soja pela ação da enzima Lipozyme TL IM foi realizada com base no mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi Simplificado (PPBBS). Com base nesse mecanismo, foram avaliados 04 modelos conforme descritos no Cap. 5: sem inibição competitiva e com inibição dos ácidos graxos livres e do glicerol, os quais são capazes de prever as constantes de velocidades específicas de reação. Para a determinação das constantes de velocidade específicas (k), avaliou-se a capacidade do modelo matemático para prever os valores em termos de rendimento de ácidos graxos livres.

Na Tabela 6.5 são apresentados os valores dos parâmetros (constantes cinéticas – k) obtidos a partir de um ajuste de cada modelo aos dados experimentais. Ressaltar-se que no presente estudo foi determinado apenas um conjunto de parâmetros para as quatro razões molares água/óleo, para cada temperatura. Uma vez que, segundo a Equação de Arrhenius, a velocidade específica de reação deve ser influenciada apenas pela temperatura. Foi adotado este

procedimento para garantir um maior significado físico aos valores obtidos para os parâmetros ajustados. Na Tabela 6.6 são apresentados os parâmetros estatísticos, como: o coeficiente de determinação (R^2) e o critério corrigido de informação Akaike (AICc). Verificou-se, também, que os perfis de concentração obtidos para os acilgliceróis, água e glicerol foram de acordo com o esperado, sendo importante ressaltar que os resultados obtidos satisfazem o princípio de conservação de massa, o qual pode ser representado pela Equação 6.1.

$$\sum_{i=1}^6 m_i = constante, \quad (6.1)$$

em que: m_i é a massa dos componentes considerados na reação de hidrólise enzimática do óleo de soja (TAG, DAG, MAG, GLI, H₂O e AGL).

Baseado nos valores AICc, o modelo que melhor descreve os dados experimentais, para todos os ensaios, foi o Modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem a inibição competitiva. Esse resultado indica que, tanto a inibição pelos ácidos graxos livre, glicerol, bem como a ação simultânea destes, não é uma inibição significativa para as condições operacionais testadas. Logo, acredita-se que o glicerol não age como inibidor conforme mencionado no item 6.2, mas pode estar migrando para a fase água.

Na Figura 6.9 – 6.12 são apresentadas a curva experimental dos ácidos graxos livres, bem como as curvas simuladas dos acilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos livres utilizando o modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, para as razões molares de 9:1, 20:1, 46:1 e 60:1, respectivamente.

Normalmente, a simulação e/ou dados experimentais de um processo, em sistema fechado e batelada, descrito por um mecanismo reacional composto por uma série de reações consecutivas, exhibe pontos de máximo para os compostos intermediários. Em particular, para a reação de hidrólise de óleos vegetais o di e o monoacilglicerol poderiam apresentar estes pontos. No entanto, isto não foi observado, provavelmente, devido ao baixo rendimento da reação em ácidos graxos livres, os quais são formados a partir da hidrólise de todos os acilgliceróis (TAG, DAG, MAG). Considerando a validade do modelo matemático, acredita-se que nas condições operacionais em que foram realizados os experimentos, a enzima foi capaz de produzir ácidos graxos livres principalmente a partir do triacilglicerol (composto majoritário no óleo vegetal em $t = 0$), ou seja, a produção de AGL a partir da hidrólise de DAG e MAG, que são formados pela hidrólise do TAG, não foi eficiente.

Tabela 6. 5. Valores dos coeficientes de velocidades específicas calculados pelo modelo matemático

Parâmetros	Temperaturas											
	40°C				52°C				64°C			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
k_1 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	9801	1,098 10 ⁴	9301	4,688 10 ⁴	1,139 10 ⁴	9,742 10 ⁴	6,374 10 ¹¹	5,892 10 ⁴	1,100 10 ⁴	9,693 10 ⁵	1,764 10 ⁵	2,707 10 ⁴
k_2 (h ⁻¹)	91,80	204,5	844,3	4,927 10 ⁹	5014	140,9	2,308 10 ⁵	29,16	4749	2,961 10 ⁶	1639	1,093 10 ⁶
k_3 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	2390	5773	1,380 10 ⁴	6,094 10 ⁹	2,696 10 ⁵	3825	78,15	1881	2,098 10 ⁵	1,120 10 ⁷	2148	1,474 10 ⁶
k_4 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	8,277 10 ⁴	177,0	2,833 10 ⁴	1,524 10 ¹⁰	1,584 10 ⁵	696,4	3,368 10 ⁷	794,4	7,040 10 ⁴	3,6,9 10 ⁴	1,411 10 ⁶	1466
k_5 (h ⁻¹)	1,254 10 ⁻¹	1,952 10 ⁴	3,782 10 ⁻²	2,61 3 10 ¹⁴	2,174 10 ⁻¹	2486	5,612 10 ⁻²	1,969 10 ⁴	5,179 10 ⁻²	4219	3,987 10 ⁷	1,079 10 ⁵
k_6 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	3,985 10 ⁻¹⁰	1,009 10 ⁴	6,581 10 ⁻²	1,488 10 ¹⁸	1,617	2,322 10 ⁴	2,477 10 ⁻¹	4,482 10 ⁵	1,978	3982	2,331 10 ⁸	6307
k_7 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	3,565 10 ⁴	4,807 10 ⁴	4,418 10 ⁴	8,215 10 ⁹	465,1	1,876 10 ⁶	1,010 10 ¹⁸	5,100 10 ⁸	5832	1,148 10 ⁵	2,680 10 ¹¹	7,154 10 ⁴
k_8 (h ⁻¹)	6,390 10 ⁹	1023	8,628	340,0	7,649 10 ⁵	1,866 10 ⁴	6,333 10 ⁴	5,425 10 ¹¹	5,163 10 ⁴	1108	13,90	2,452 10 ⁵
k_9 (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)	2,204 10 ⁷	8,303 10 ⁵	2,607 10 ⁴	6,913 10 ⁷	1,942 10 ⁸	67,03	370,0	4,141 10 ¹²	1841	3,837 10 ⁹	2,232	9,402 10 ⁶
k_{10} (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)		4,355 10 ⁴	161,1	5,832 10 ⁶		1,960 10 ⁸	1,029 10 ⁻¹	1150		1,471 10 ⁸	104,7	2,702 10 ⁵
k_{11} (h ⁻¹)		8,136 10 ⁻²	461,6	5,854 10 ⁻¹		131,4	4332	1,371 10 ¹²		48,13	2632	1,300 10 ¹²
k_{12} (mL mol ⁻¹ h ⁻¹)				3,405 10 ⁵				1,458 10 ⁶				3,949 10 ⁴
k_{13} (h ⁻¹)				1,829 10 ¹⁰				8,742 10 ⁻¹				9,836 10 ⁻¹

M1, M2 M3 e M4 correspondem, respectivamente ao: Modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva; Modelo 2 – Mecanismo PPBBS com inibição por AGL; Modelo 3 – Mecanismo PPBBS com inibição por GLI; e Modelo 4 – Mecanismo PPBBS com inibição por AGL e GLI. k_1 , k_4 , k_7 , k_{10} e k_{12} correspondem as constantes da velocidade específica de adsorção da enzima entre a interface aquosa enzima-substrato; k_2 , k_5 , k_8 , k_{11} e k_{13} às constantes de velocidade específica de dessorção da enzima entre a interface aquosa enzima-substrato; k_3 , k_6 , e k_9 às constantes de velocidade específicas das reações.

Tabela 6. 6. Valores dos coeficientes de determinação (R^2) e do critério corrigido de informação Akaike (AICc) estimados pelos modelos aos dados experimentais da hidrólise enzimática do óleo de soja, sob diferentes temperaturas.

Parâmetros	Temperatura											
	40°C				52°C				64°C			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
AICc	-351,0	-282,7	-276,59	-268,0	-333,6	-255,3	-268,9	-249,5	-349,6	-253,1	-284,0	-273,4
R² em RM 9:1	0,988	0,977	0,996	0,998	0,993	0,994	0,990	0,993	0,990	0,996	0,987	0,995
R² em RM 20:1	0,985	0,978	0,983	0,992	0,996	0,998	0,982	0,997	0,997	0,996	0,998	0,993
R² em RM 46:1	0,993	0,993	0,953	0,969	0,992	0,995	0,973	0,995	0,992	0,994	0,985	0,995
R² em RM 60:1	0,997	0,996	0,974	0,983	0,989	0,996	0,978	0,994	0,993	0,994	0,986	0,995

RM corresponde a Razão molar água/óleo. M1, M2 M3 e M4 correspondem, respectivamente ao: Modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva; Modelo 2 – Mecanismo PPBBS com inibição por AGL; Modelo 3 – Mecanismo PPBBS com inibição por GLI; e Modelo 4 – Mecanismo PPBBS com inibição por AGL e GLI.

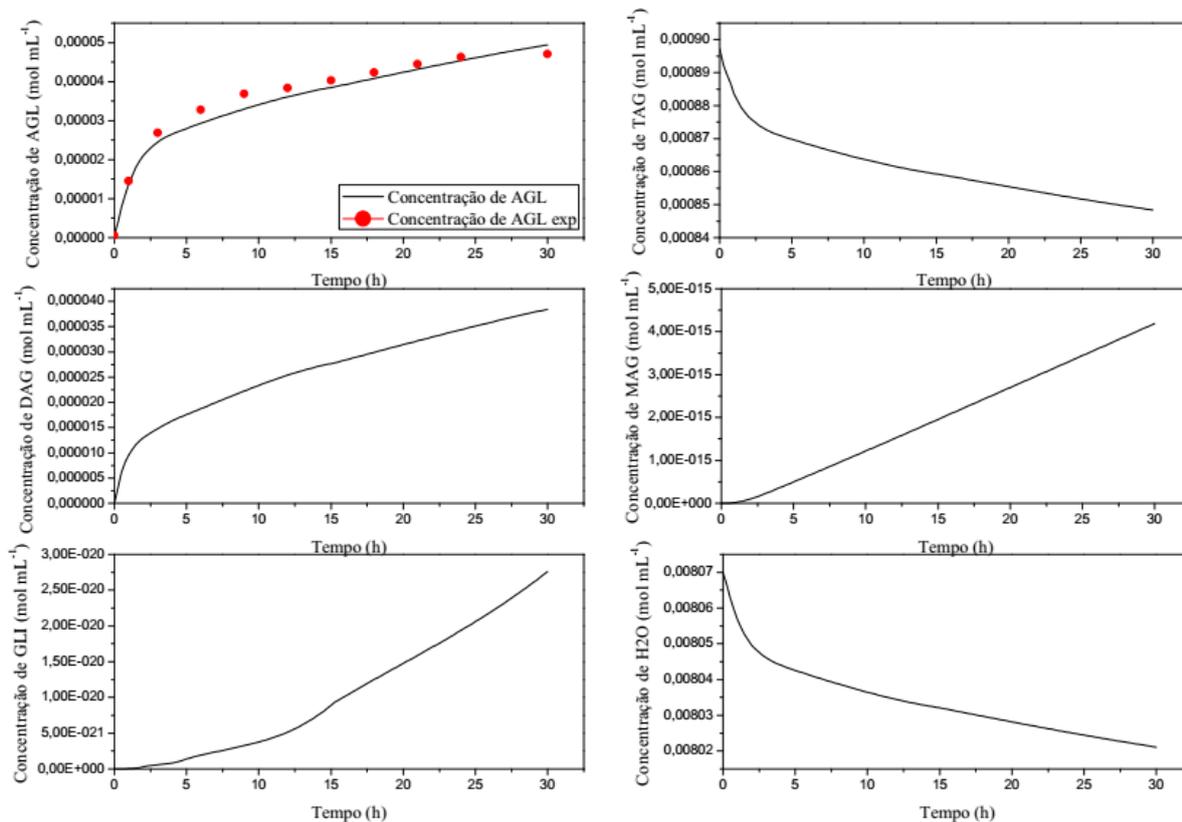


Figura 6. 9. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40 °C, razão molar A/O 9:1

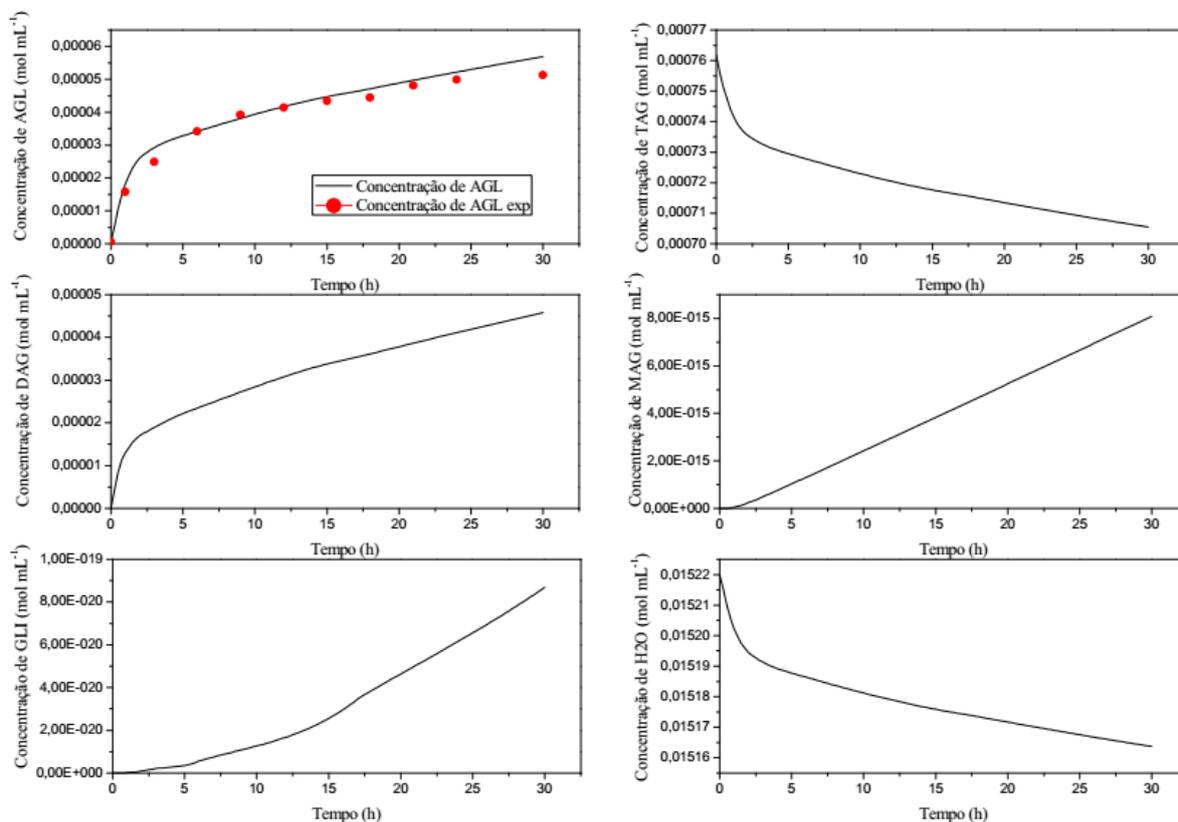


Figura 6. 10. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 20:1

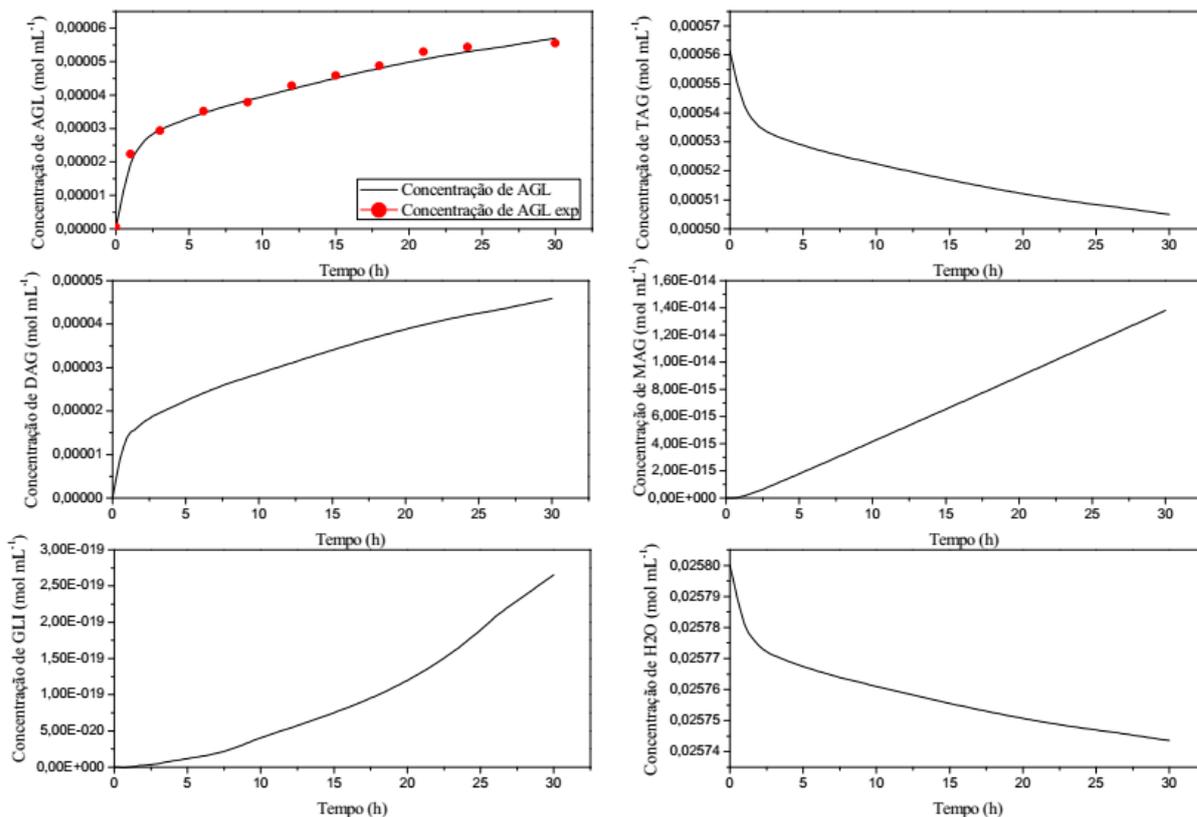


Figura 6. 11. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 46:1

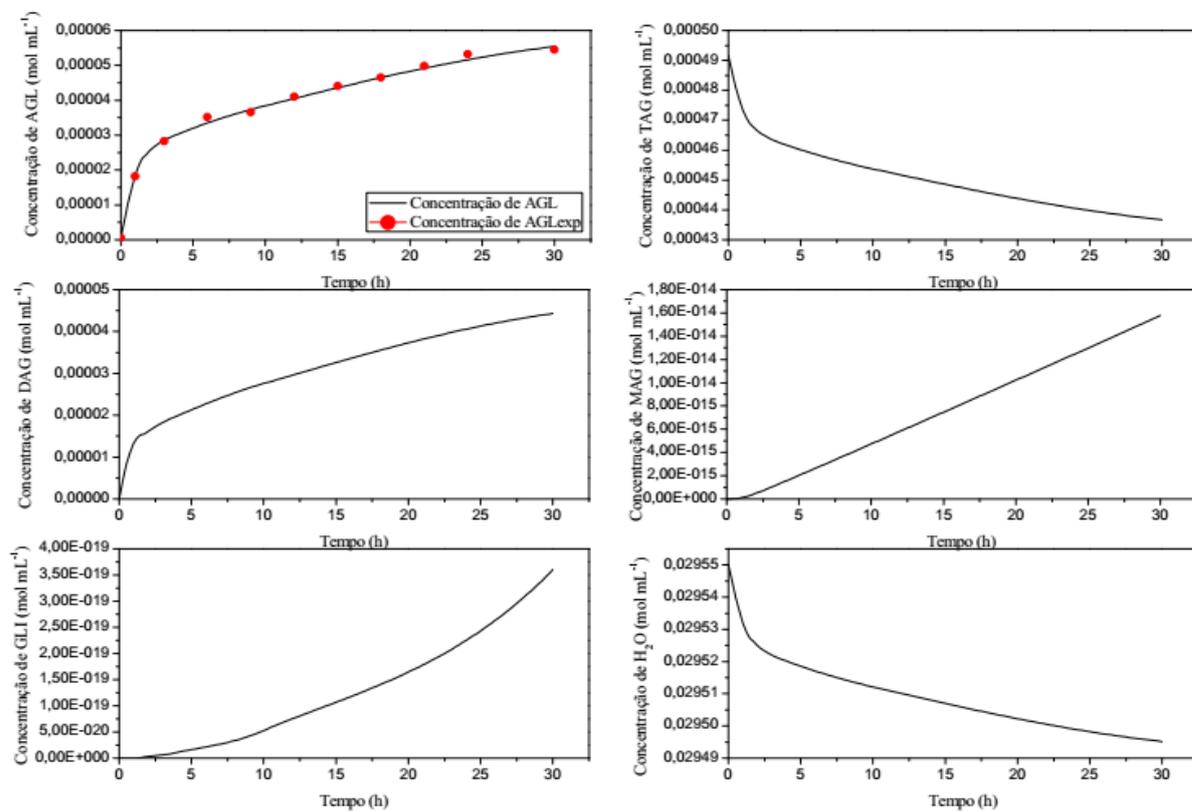


Figura 6. 12. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 40°C, razão molar A/O 60:1

Na Figura 6.13 – 6.16 são apresentadas a curva experimental dos ácidos graxos livres, bem como as curvas simuladas dos acilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos livres utilizando o modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, para as razões molares de 9:1, 20:1, 46:1 e 60:1, respectivamente. De forma análoga, foi observado que em 52°C, os perfis de diacilgliceróis e monoacilgliceróis não apresentaram picos de máximos e posterior decréscimo (formação e consumo). Esse fato também se repete para os perfis simulados para a temperatura de 64°C (Figuras 6.17 – 6.20). Nas Figuras 6.17 – 6.20 são apresentadas a curva experimental dos ácidos graxos livres, bem como as curvas simuladas dos acilgliceróis, água, glicerol e ácidos graxos livres utilizando o modelo 1 – Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, para as razões molares de 9:1, 20:1, 46:1 e 60:1, respectivamente.

Com base nas Figuras (6.9 – 6.20) observou-se uma variação nos valores de concentrações para os perfis simulados de monoacilgliceróis e glicerol no tempo de equilíbrio – 30 h. Dessa forma, na Tabela 6.7 são apresentadas as concentrações simuladas para estes compostos (MAG e GLI) nas diferentes temperaturas (40, 52 e 64°C) e razões molares avaliadas.

Tabela 6. 7. Concentrações simuladas dos componentes (monoacilgliceróis e glicerol) (mol mL^{-1}) com base no Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição

Razão Molar água/óleo	Monoacilgliceróis			Glicerol		
	Temperatura (°C)			Temperatura (°C)		
	40	52	64	40	52	64
9:1	$4,19 \cdot 10^{-15}$	$3,96 \cdot 10^{-06}$	$4,85 \cdot 10^{-06}$	$2,76 \cdot 10^{-20}$	$6,65 \cdot 10^{-09}$	$3,08 \cdot 10^{-11}$
20:1	$8,09 \cdot 10^{-15}$	$7,54 \cdot 10^{-06}$	$9,21 \cdot 10^{-06}$	$8,69 \cdot 10^{-20}$	$1,41 \cdot 10^{-08}$	$1,20 \cdot 10^{-10}$
46:1	$1,38 \cdot 10^{-14}$	$1,27 \cdot 10^{-05}$	$1,55 \cdot 10^{-05}$	$2,62 \cdot 10^{-19}$	$2,99 \cdot 10^{-08}$	$4,34 \cdot 10^{-10}$
60:1	$1,58 \cdot 10^{-14}$	$1,45 \cdot 10^{-05}$	$1,76 \cdot 10^{-05}$	$3,60 \cdot 10^{-19}$	$3,77 \cdot 10^{-08}$	$6,34 \cdot 10^{-10}$

Ao observar as simulações dos perfis de concentrações de monoacilgliceróis e glicerol, nas temperaturas de 40 e 52 C, observou-se um aumento das concentrações destes na ordem de 10^9 (aprox) para os monoacilgliceróis, e de 10^{11} para o glicerol (para as quatro razões molares estudadas). Estendendo essa comparação para a faixa de temperatura de 52 – 64°C, também, observou-se que houve variação, sendo essa apenas para os perfis de concentração do glicerol,

o quais diminuindo na ordem de 10^{-2} . Os perfis de concentração dos monoacilgliceróis não apresentaram diferença significativa para variação dessa temperatura (52 – 64°C). A partir disso, concluiu-se que tanto a temperatura de 52°C como a de 64°C promovem um aumento das concentrações dos ácidos graxos livres (experimental), bem como uma maior formação de monoacilgliceróis (simulados). Contudo a temperatura de 64°C pode ser considerada melhor devido a menor formação de glicerol.

De forma semelhante, comparou-se as diferentes razões molares água/óleo com os perfis de concentração dos monoacilgliceróis e glicerol. Observou-se por meio dessas que houve um aumento da concentração de monoacilgliceróis para as razões molares de 9:1 e 20:1, sendo este um fator de 2 (para as três temperaturas estudadas). Em seguida este reduziu para 1,7 para as razões molares 20:1 – 46:1, e aproximou-se de 1,15 para as razões molares de 46:1 - 60:1. Houve também um aumento para o perfil de concentrações do glicerol. A medida que aumentou a razão molar (9 – 20:1), houve um acréscimo da concentração com fator de 3, e novamente até a razão molar de 46:1 (para a temperatura de 40°C). Para as temperaturas de 52 e 64°C, os fatores de variação do perfil de concentração do glicerol foi de 2 e 4, respectivamente. Nesse contexto, conclui-se a razão molar água/óleo promoveu um aumento no perfil das concentrações de monoacilgliceróis, bem como para o glicerol.

Em suma, pode-se observar que os perfis simulados para as concentrações dos monoacilgliceróis e glicerol apresentaram alterações ao variar tanto a razão molar água/óleo, como também a temperatura. Isso indicando que ao manipular estas condições pode-se elevar não só rendimento em ácidos graxos livres, mas também o percentual em monoacilgliceróis.

De modo geral, acredita-se que o modelo matemático empregando o mecanismo de PPBBS possibilita também prever resultados manipulando outras condições como a razão mássica enzima-substrato. Pois ao manipular esta condição elevando sua concentração, eleva-se também o rendimento da reação. Logo, o modelo pode auxiliar na minimização do custo operacional em relação a quantidade de enzimas adicionada no processo.

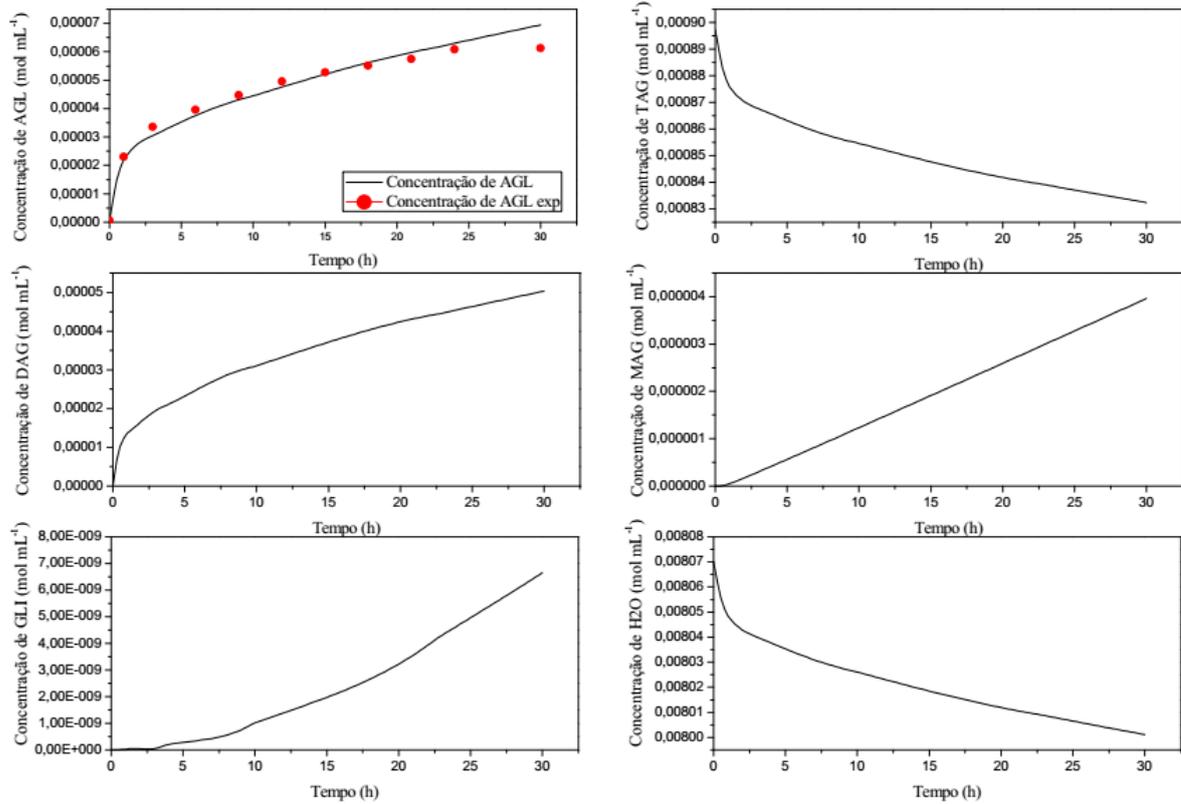


Figura 6. 13. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 9:1

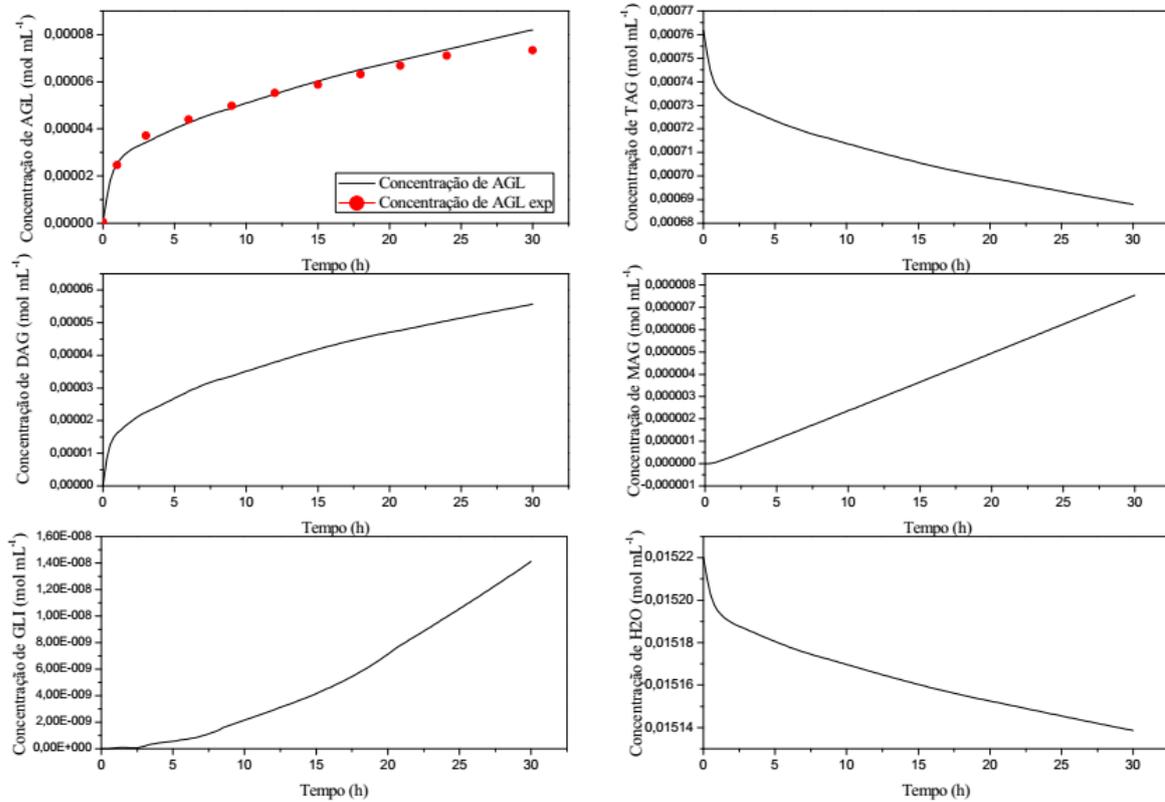


Figura 6. 14. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 20:1

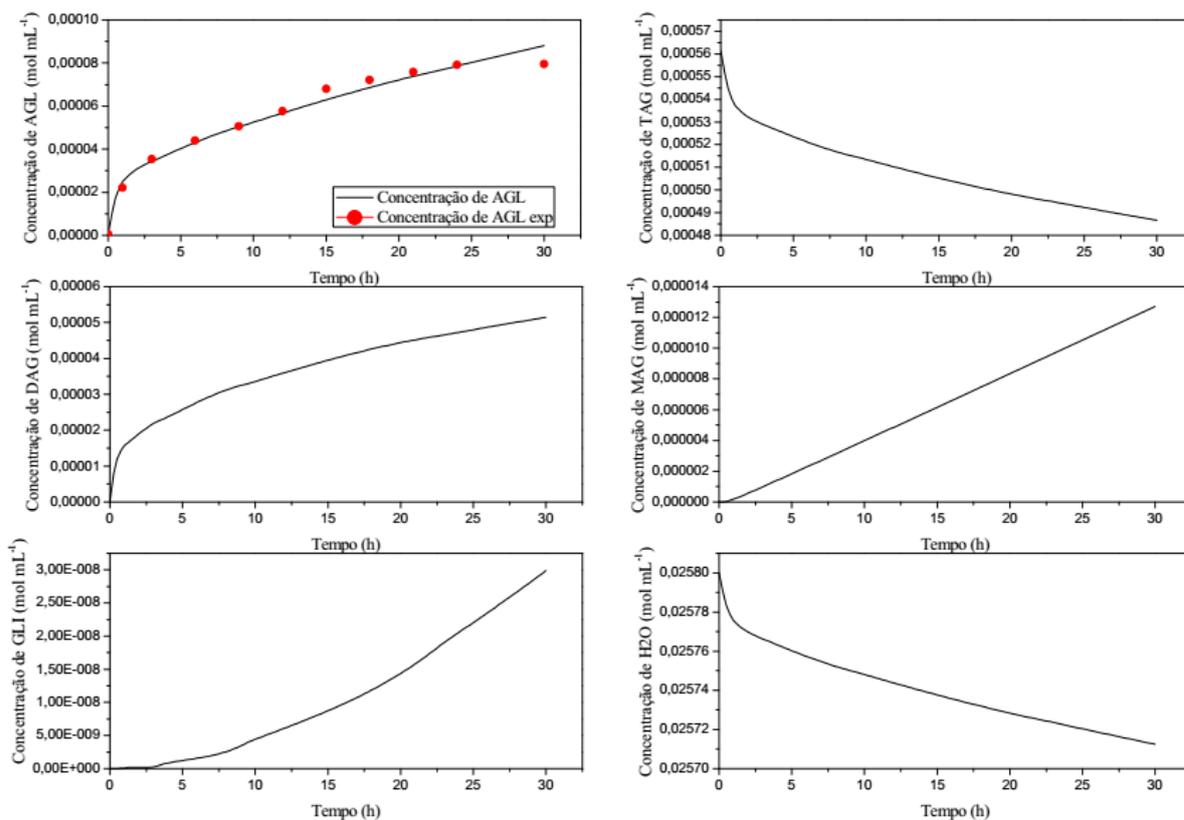


Figura 6. 15. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 46:1

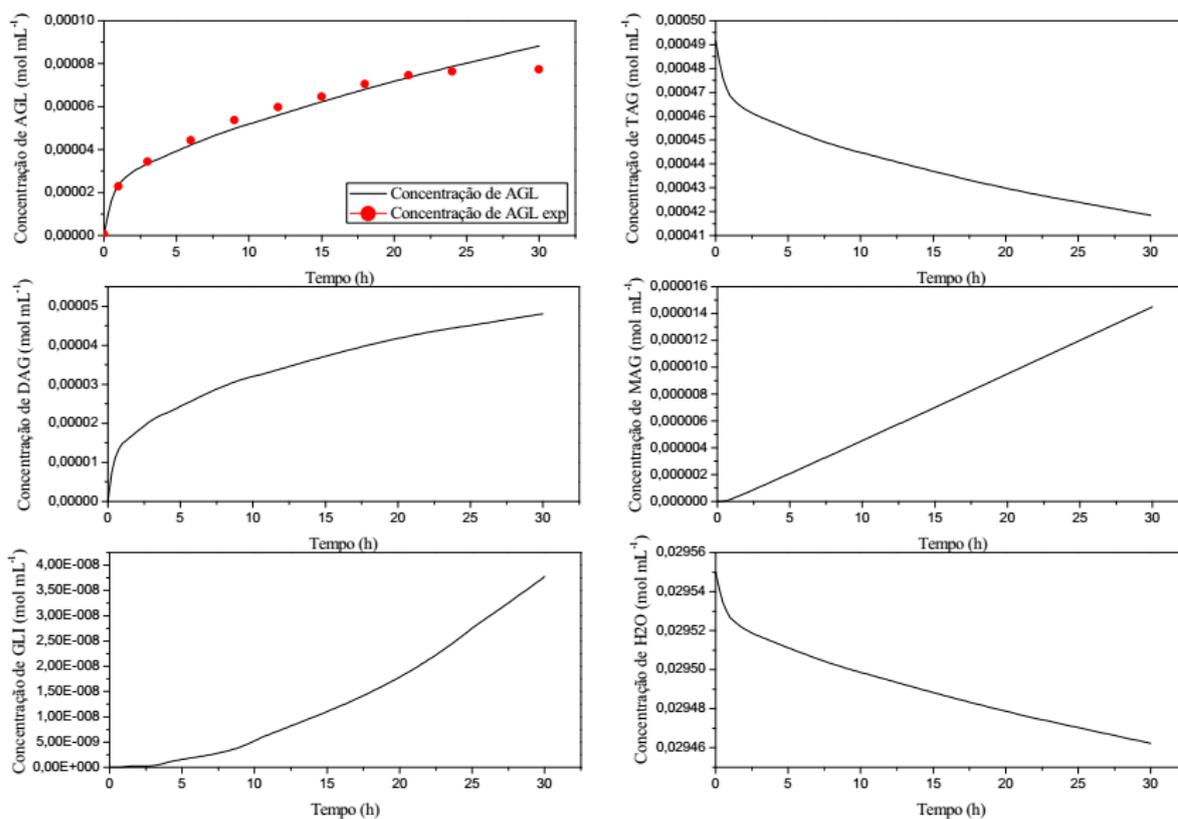


Figura 6. 16. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 52°C, razão molar A/O 60:1:

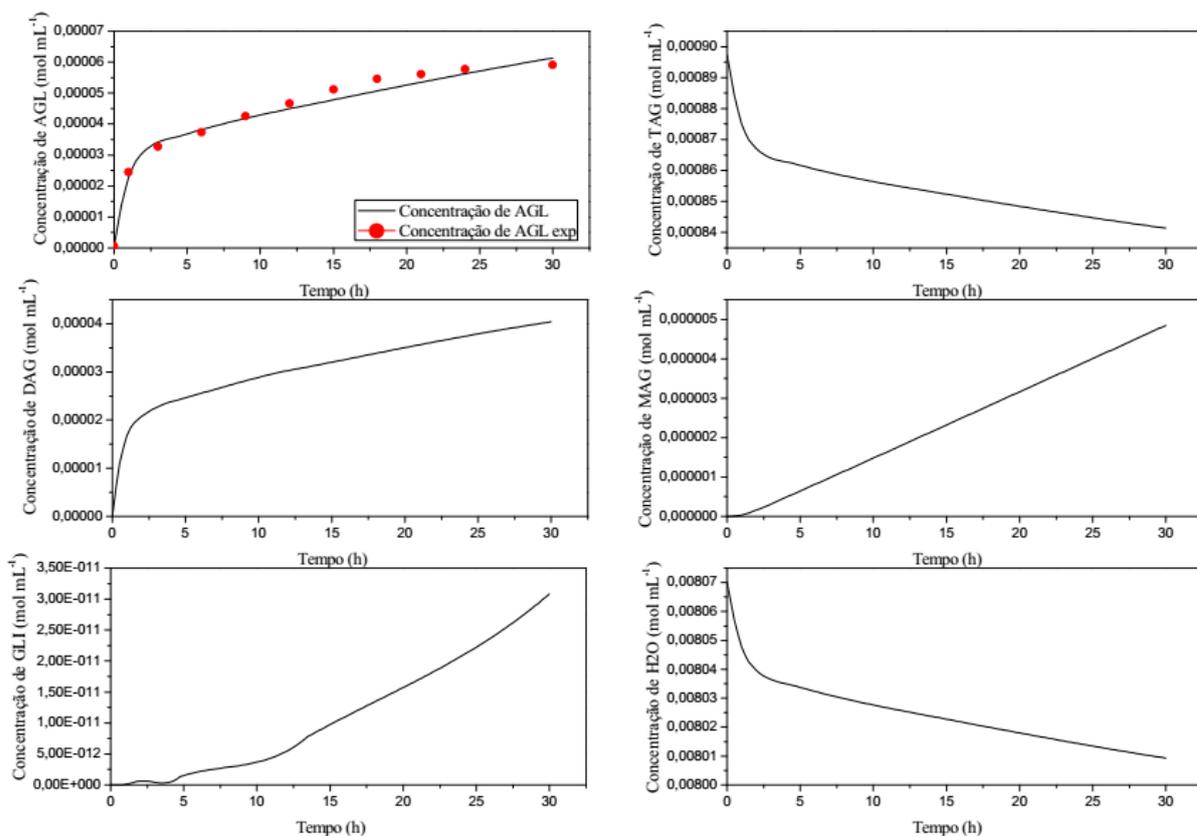


Figura 6. 17. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 9:1.

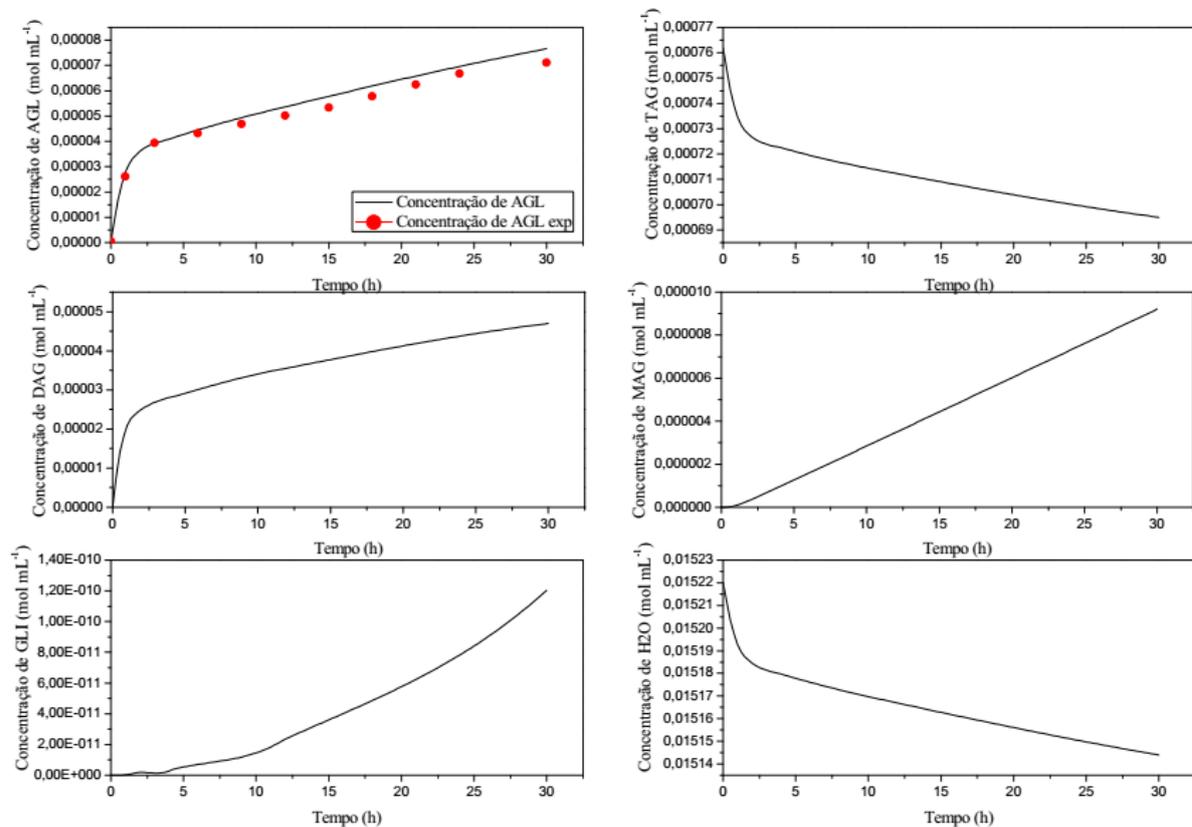


Figura 6. 18. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 20:1.

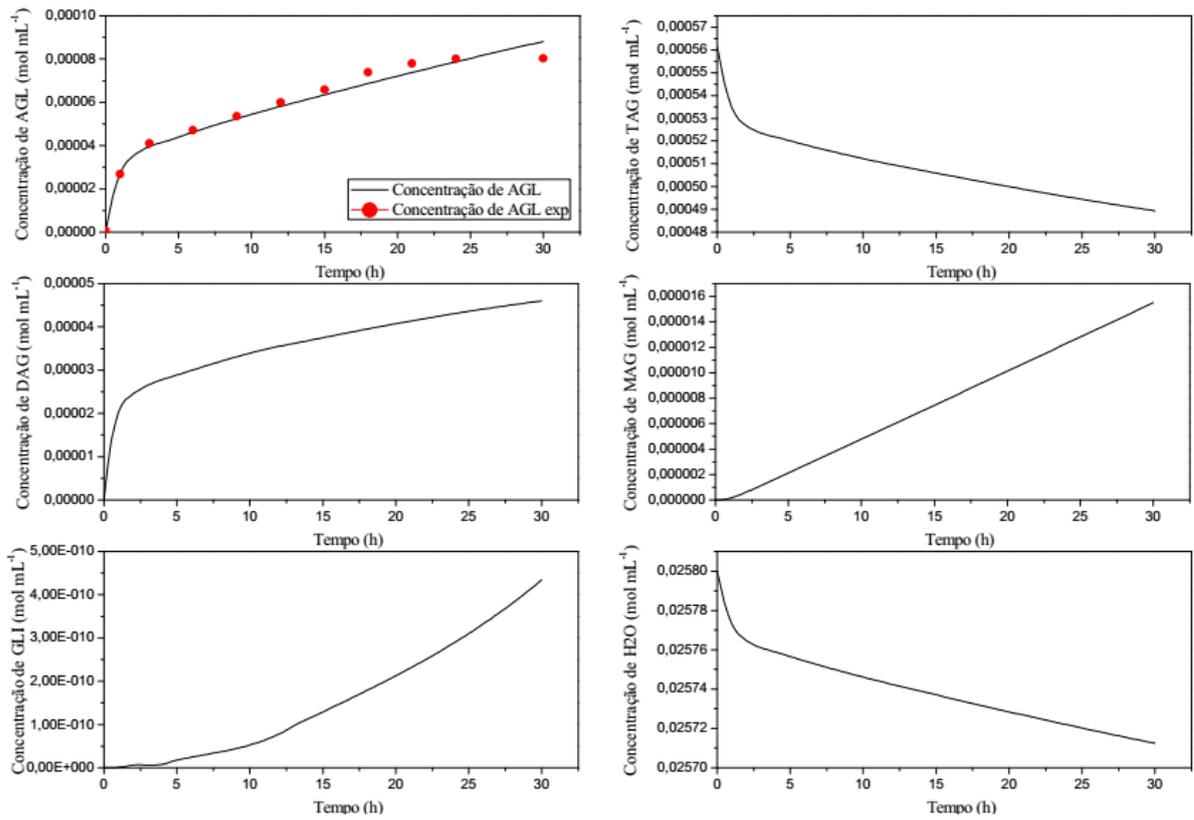


Figura 6. 19. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 46:1.

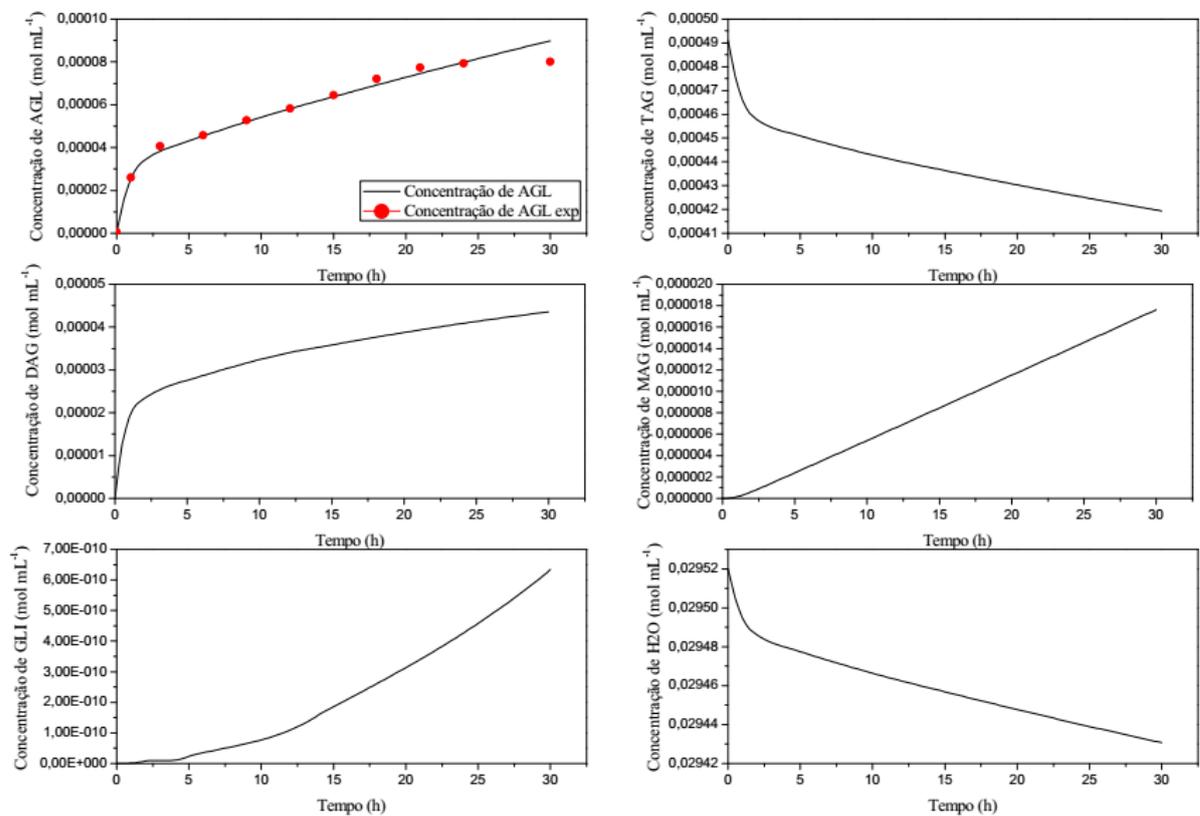


Figura 6. 20. Cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja simuladas a partir do Modelo 1 - Mecanismo PPBBS sem inibição competitiva para a temperatura de 64°C, razão molar A/O 60:1.

7. CONCLUSÃO

O efeito das condições operacionais, razão molar água/óleo e a temperatura, permitiram avaliar a cinética da hidrólise enzimática do óleo de soja sob a ação da Lipozyme TL IM. Observou-se que as razões molares água/óleo de 46:1 e 60:1, apresentaram os melhores rendimentos em ácidos graxos livres nas temperaturas de 52 e 64°C, para as condições operacionais de 250 rpm e dosagem de enzima 1% (em relação a massa de óleo), sendo esses próximos de 77% em 30 h de reação. Os melhores resultados para as taxas iniciais de reação foram visualizados na temperatura mais elevada (64°C) para as razões de 46 e 60:1, sob estas condições operacionais. Concluiu-se que a cinética da hidrólise enzimática, para o presente estudo, é favorecida pela temperatura em conjunto com as razões molares com maior teor de água. Logo, ambos os fatores têm mostrando um efeito positivo sobre o rendimento da reação.

A atividade enzimática da Lipozyme TL IM apresentou um decréscimo para as cinéticas avaliadas. Acredita-se que essa diminuição da atividade não está relacionada com o solvente (hexano) utilizado para lavagem das enzimas, visto que houve uma diminuição de apenas 3% em relação a enzima virgem. Dentre os fatores que influenciam a atividade enzimática, como: pH, temperatura, velocidade de agitação e adsorção do glicerol na superfície da enzima, acredita-se que este último possa ter maior influência na perda de atividade enzimática da Lipozyme TL IM para o presente trabalho.

O modelo matemático embasado no mecanismo de Pingue-Pongue Bi Bi permitiu determinar conjuntos de coeficientes de velocidades específicas de reação para os diferentes modelos empregados, com 9, 11 e 13 parâmetros. A modelagem matemática das cinéticas da hidrólise enzimática do óleo de soja, possibilitou a visualização do perfil de concentração de TAG, DAG, MAG, AGL, GLI e H₂O, bem como o comportamento destes componentes na reação. Os parâmetros de AICc apontou que o modelo 1 – mecanismo PPBBS sem inibição competitiva foi o que melhor descreveu os dados experimentais. Em geral, os modelos demonstraram capacidade preditiva e, portanto, podem ser ferramenta útil para otimização de processos e compreensão fenomenológica dos mecanismos na hidrólise enzimática de óleos vegetais com enzimas imobilizadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEWALE, P.; DUMONT, M. J.; NGADI, M. **Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic assisted methanolysis of waste lard for biodiesel production.** Chemical Engineering Journal, v. 284, 158-165, 2016.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. **Biodiesel production from Acrocomia aculeata acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts.** Fuel, v. 135, p. 315-321, 2014.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. **Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase.** Process Biochemistry, v.42, 951-960, 2007.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY; **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists` Society, Champaign, USA, A.O.C.S. 2004.**
- ANVISA. **Resolução RDC nº 270, 2005.**
- AVELAR, M. H.; CASSIMIRO, D. M.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C.; DE CASTRO, H. F., MENDES, A. A. **Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds.** Industrial crops and products, v.44, 452-458, 2013.
- AWADALLAK, J. A.; VOLL, F.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; CARDOZO-FILHO, L.; SILVA, E. D. **Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 20, p. 1002-1007, 2013.
- BARNEBEY, H. L.; BROWN, A. C. **Continuous fat splitting plants using the colgateemery process.** J Am Oil Chem Soc, v. 25, p.95-99, 1948.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. D.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos.** Quim. Nova, v. 30, n 2, 409-414, 2007.
- BASRI, M., KASSIM, M. A., MOHAMAD, R., & ARIFF, A. B. **Optimization and kinetic study on the synthesis of palm oil ester using Lipozyme TL IM.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 85, 214-219, 2013
- BELL, G.; HALLING, P. J.; MOORE, B. D.; PARTRIDGE, J.; REES, D. G. **Biocatalyst behaviour low-water systems.** Elsevier Science Reviews, v. 13, 1995.
- BLANCO, S. M.; SANTOS, J. S.; FELTES, M. M. C.; DORS, G.; LICODIEDOFF, S.; LERIN, L. A.; FURIGO, A. **Optimization of diacylglycerol production by glycerolysis of fish oil catalyzed by Lipozyme TL IM with Tween 65.** Bioprocess and biosystems engineering, v.38, 2379-2388, 2013.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado in Imobilização de Enzimas sua Estabilização;** Castro, H. F.; Zanin, G. M.; Moraes, F. F.; Sá-Pereira, .1ª ed., Inteciência: Rio de Janeiro, 2008, cap. 6.

- BORNADEL, A.; ÅKERMAN, C. O.; ADLERCREUTZ, P.; HATTI-KAUL, R.; BORG, N. **Kinetic modeling of lipase-catalyzed esterification reaction between oleic acid and trimethylolpropane: A simplified model for multi-substrate multi-product ping-pong mechanisms.** *Biotechnology progress*, v.29, 1422-1429, 2013.
- BOUSQUET-DUBOUCH, M. P.; GRABER, M.; SOUSA, N.; LAMARE, S.; LEGOY, M. D. **Alcoholysis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in a gas/solid system obeys a Ping Pong Bi Bi mechanism with competitive inhibition by the alcohol substrate and water.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 155, 90-99, 2001.
- CARVALHO, N. B., DE OLIVEIRA SILVA, M. A., FRICKS, A. T., FRANCESCHI, E., DARIVA, C., ZANIN, G. M., ... & SOARES, C. M. F. **Evaluation of activity of *Bacillus* lipase (free and immobilized) treated with compressed propane.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, 130-135, 2014.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases.** *Quim. Nova*, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.
- CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos. **Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação.** *Quim. Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.
- CASTRO, H. F. de.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V. **Alternativa Potencial para Aproveitamento do Glicerol Gerado na Produção de Biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação.** *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.
- CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. d'A.; SILVA, P. R.; RAMOS, A. P.; ARANDA, D. A. G.; FREIRE, D. M. G. **Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification.** *Enzyme Research*, v. 2011, 2011.
- CHEIRSILP, B.; KAEWTHONG, W.; H-KITTIKUN. A. **Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 35, p. 71-80, 2007.
- CHEONG, L. Z; TAN, C. P.; LONG, K.; YUSSOF, M. S. A.; ARIFIN, N.; LO, S. K.; LAI, O. M. **Production of a diacylglycerol-enriched pal plien using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology.** *Food Chemistry*, v. 105, p. 1614-1622, 2007.
- CHEN, J.P.; WANG, H.Y. **Improved properties of bilirubin oxidase by entrapment in alginate-silicate sol-gel matrix.** *Biotechnologies Techniques*, v. 12, p. 851-853, 1998.
- CHEW, Y. H.; CHUA, L. S.; CHENG, K. K.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. A.; LEE, C. T. **Kinetic study on the hydrolysis of palm olein using immobilized lipase.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 516-520, 2008.
- CHOONG, T. S. Y.; YEOH, C. M.; PHUAH, E. T.; SIEW, W. L.; LEE, Y. Y.; TANG, T. K.; ABDULLAH, L. C. **Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using Lipozyme TLIM in solvent-free system.** *PloS one*, v.13, 2018.

- CHU, B. S.; BAHARIN, B. S.; QUEK, S. Y. **Factors affecting pre-concentration of tocopherols and tocotrienols from palm fatty acid distillate by lipase-catalysed hydrolysis.** Food Chemistry, v. 79, p. 55-59, 2002.
- COELHO, A. D.; SANTOS, K. C.; DOMINGUES, R. C. C.; MENDES, A. A. **Produção de concentrados de ácidos graxos por hidrólise de óleos vegetais mediada por lipase.** Quim. Nova, v.36, n.8, p 1164-1169, 2013.
- COSTA, V. E. U.; AMORI, H. L. N. **Emprego de Lipase como Agentes de Resolução Cinética de Enantiômeros em Síntese Orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente.** Quim. Nova, v. 22, p. 863-873, 1999.
- DABDOUB, M.; BROZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. **Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria.** Quim Nova, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.
- DIECKELMANN, G.; HEINZ, H. J. **The basics of industrial oleochemistry.** Peter Pomp GmbH, Essen, 1988.
- DOS SANTOS, N. B. L.; REZENDE, M. J. C. **Produção de Monoacilgliceróis: Rotas e catalisadores.** Revista virtual química, v. 4, n. 2, p. 118-129, 2012.
- EMBRAPA. **Soja em números** (Safrá de 2016/2017). Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acessado em: 17 de ago de 2017.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. **Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids.** World J. Microbiol. Biotechnol, v. 23, p. 1725–1731, 2007.
- FOCKING, A. M. **Estudo da Hidrólise do Óleo de Soja Catalisada pela Enzima Lipozyme TL IM.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017.
- FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering.** Original U.S.Edition, 3 ed, 2004.
- FRIEDRICH, J. P.; LIST, G. R. **Characterization of Soybean Oil Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Hexano.** J. Agric. Chem., v. 30, p. 192-193, 1982.
- GHOTRA, B. S.; DYAL, S. D.; NARINE, S. S. **Lipid shortenings: a review.** Food Research International, v. 35, p. 1015-1048, 2002.
- GIOIELLI, L. A. **Óleos e Gorduras Vegetais: Composição e Tecnologia.** Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 211-232, 1996.
- GOFFERJE, G.; STÄBLER, A.; HERFELLNER, T.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; FLÖTER, E. **Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude Jatropha oil by immobilized lipase from Rhizomucor miehei.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.107, 1-7, 2014.

- GOG, A.; ROMAN, M.; TOSA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. **Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives.** *Renewable Energy*, v. 39, p.10-16, 2012.
- GONÇALVES, K.; SUTILI, F.; LEITE, S.; DE SOUZA, R. O. M. A.; LEAL, I. **Palm oil hydrolysis catalyzed by lipases under ultrasound irradiation—the use of experimental design as a tool for variables evaluation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, v.19, 232–236, 2012.
- HAIGH, K. F., SAHA, B., VLADISAVLJEVIĆ, G. T., & REYNOLDS, J. C. **Kinetics of the pre-treatment of used cooking oil using Novozyme 435 for biodiesel production.** *Procedia Engineering*, 42, 1106-1113, 2012.
- HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. **Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM.** *Bioresource technology*, v.99, 277-286, 2008.
- HU, Y.; TANG, S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. **Immobilization of Burkholderia cepacia lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15.** *Process biochemistry*, 47(12), 2291-2299, 2012.
- HURVITCH, C. M.; TSAI, C. L. **Bias of the corrected AIC criterion for underfitted regression and time series models,** *Biometrika*, v. 78, n. 3, p. 499-509, 1991.
- JAEGER, KE.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. **Bacterial Biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases.** *Annu. Rev. Microbial*, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais.** *Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista*, p.17-56, 2009.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569, 2012.
- KHOR, G. K., SIM, J. H., KAMARUDDIN, A. H., & UZIR, M. H. **Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification.** *Bioresource technology*, v.101, 6558-6561, 2010.
- KRUGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva.** Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia de Alimentos, UFSC – *Campus de Florianópolis*, 2010.
- LASCARAY, L. **Industrial fat splitting.** *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 29, n. 9, p. 362-366, 1952.
- LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering.** ISBN, 3ed, 1999.
- LI, Y.; DU, W.; DAI, L.; LIU, D. **Kinetic study on free lipase NS81006-catalyzed biodiesel production from soybean oil.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 121, 22-27, 2015.

- LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, v.3, 1-43, 2001.
- LU, J; CHEN, Y; WANG, F; TAN, T. **Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp* 99-125 in organic solvent system**. Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic, v. 56, p. 122-125, 2009.
- MACRAE A R.; **Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats**. J Am Oil Chem Soc 60:291–294, 1983.
- MELLO, B. T. F.; RODRIGUES, G. M.; SILVA, C. **Hidrólise enzimática do óleo de crambe assistida por ultrassom**. Exacta, v.8, n.1, p. 77-85, 2015.
- MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. de L. C.; CASTRO, H. F. de. **Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalente attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis**. Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic, v. 68, p. 109-115, 2011.
- MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. da; LIMA, V. M. G. de; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. de M. **Lipase microbianas: Produção, propriedade e aplicações biotecnológicas**. Semina, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011.
- MOQUIN, P. H. L.; TEMELLI, F. **Kinetic modeling of hydrolysis of canola oil in supercritical media**. Journal of Supercritical Fluids, v. 45, p. 94-101, 2008.
- NARWAL, S. K.; GUPTA, R. **Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase**. Biotechnology letters, v.35, p.4, 479-490, 2013.
- NELDER J. A., MEAD R. **A simplex method for function minimization**, The Computer Journal, v. 7, p. 308-315, 1965.
- NELSON, L. D.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. Ed: p. 189-234, 2014.
- NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. **Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase**. Process Biochemistry, v. 39, p. 13-20, 2003.
- NORIN, M.; HAEFFNER, F.; HULT, K.; EDHOLM, O. **Molecular Dynamics Simulations of na Enzyme Surrounded by Water, or a Hydrophobic Solvent**. Biophysical J., v. 67, p. 548-559, 1994.
- OLIVEIRA, L. G. de; MANTOVANI, S. M. **Transformações Biológicas: Contribuições e perspectivas**. Quim. Nova, v. 37, n. 3, p. 742-756, 2009.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. **Purificação Parcial e Caracterização Bioquímica de Lipase Extracelular Produzida por Nova Linhagem de *Rhizopus sp***. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.
- PHUAH, ET.; LAI, OM.; CHOONG, T. SY.; TAN, CP.; LO, SK. **Kinetic study on partical hydrolysis of palm oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase**. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 78, p.91-97, 2012.

- PINHEIRO, R. C.; SOARES, C. M.; DOS SANTOS, O. A.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. **Influence of gelation time on the morphological and physico-chemical properties of the sol–gel entrapped lipase.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52, 27-33, 2008.
- POURZOLFAGHAR, H.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W.; AROUA, M. K. **A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production.** *Renewable and Sustainable Energy Review*, v. 61, p. 245-257, 2016.
- PUPO, M. M. S.; ALMEIDA, A. R.; MAIA, W. A.; RAMOS, A. L. D. **Produção de biodiesel via hidroesterificação utilizando catalisadores ácidos.** Dissertação de Mestrado em Eng. Quím. Sergipe: UFS, 2011.
- PURWANTO, M. G. M.; MARETHA, M. V.; WAHYUDI, M.; GOELTOM, M. T. **Whole cell hydrolysis of sardine (*Sardinella lemuru*) oil waste using *mucor circinelloides* NRRL 1405 immobilized in poly-urethane foam.** *Procedia Chemistry*, v.14, 256-262, 2015.
- RAMOS, L. P.; KOTHE, V.; CÉSAR-OLIVEIRA, M. A. F.; MUNIZ-WYPYCH, A. S.; NAKAGAKI, S.; KRIEGER, N.; WYPYCH, F.; CORDEIRO, C. S. **Biodiesel: Matérias-Primas, Tecnologias de Produção e Propriedades Combustíveis.** *Revista Virtual Química*, v. 9, n. 1, p. 317-369., 2017.
- RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. **Tecnologias de Produção de Biodiesel.** *Revista Virtual de Química*, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.
- RAIZER, E., MOLINARI, D., REINEHR, T. O., FETSCH, V. T., AWADALLAK, J. A., DA SILVA, C., & DA SILVA, E. A. **Produção de Ácidos Graxos Livres através de Hidrólise Enzimática do Óleo de Girassol em Ultrassom.** *Revista Tecnológica*, 63-71, 2015.
- RASPE, D. T.; CARDOZO FILHO, L.; DA SILVA, C. **Effect of additives and process variables on enzymatic hydrolysis of macauba kernel oil (*Acrocomia aculeata*).** *International Journal of Chemical Engineering*, v.2013, 2013.
- RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. **Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil.** *Process Biochemistry*, v. 46, p. 682–688, 2011.
- ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. **The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor.** *Process Biochemistry*, v. 36, p. 947-953, 2001.
- ROSENBROCK, H. H. **Some general implicit processes for the numerical solution of differential equations,** *The Computer Journal* 5(4): 329-330, 1963.
- SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H. F. **Pseudomonas fluorescens lipase immobilization on polysiloxane–polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52, 49-57, 2008.
- SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. **Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids oversolid acid catalysts.** *Applied Catalysis A: General*, v. 391, 427-435, 2011.

- SHARMA, A.; CHAURASIA, S.; DALAI, A. K. **Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production.** *Catalysis Today*, v. 207, p. 93-100, 2013.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, C. U. **Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipase.** *Biotechnology Advances*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVEIRA, B. I. da. **Produção de Biodiesel: Análise e Projeto de Reatores Químicos.** Biblioteca24h, 2011.
- SOUZA, R. L.; FARIA, E. L. P.; FIGUEIREDO, R. T.; FREITAS, L. S.; IGLESIAS, M.; METTEDI, S.; ZANIN, G. M.; SANTOS, O. A. A.; COUTINHO, J. A. P.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. **Protic ionic liquid as additive on lipase immobilization using sílica sol-gel.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 141-150, 2013.
- SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte.** *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4.* São Paulo: Blucher, 2016.
- TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; CHUA, L. P. L. **Conversion waste cooking oil to biodiesel via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification.** *Energy and Fuels*, v. 24, 2010.
- TAPANES, N. de la C.; ARANDA, D. A. G.; PEREZ, R. S.; CRUZ, Y. R. **Biodiesel no Brasil: matérias primas e tecnologias de produção.** *Acta Scientiae & Technice*, v. 1, p. 119-125, 2013.
- TAVARES, F. SILVA, E. A.; PINZAN, F.; CANEVESI, R.; MILINSK, M. C.; SCHEUFELE, F. B.; BORBA, C. E. **Hydrolysis of crambe oil by enzymatic catalysis: an evaluation of operational conditions.** *Biocatalysis and Biotransformations*, 2018.
- TRENTINI, C. P.; RASPE, D. T.; DA SILVA, C. **Obtenção de Ácidos Graxos Livres do Óleo de Macaúba (Acrocomia Aculeata) em Sistema Livre de Solvente Orgânico.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v.35, 15-24, 2014.
- VOLL, F. A. P. **Produção e Separação de Diacilglicerol a partir do Triacilglicerol do Óleo de Palma.** Tese de doutorado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá – UEM, 2011.
- VOLL, F.; KRÜGER, L. R.; CASTILHOS, F. de; CARDOZO FILHO, L.; CABRAL, V.; NINOW, J.; CORAZZA, M. L. **Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil.** *Biochemical Engineer Journal*, v. 56, p. 107-115, 2011.
- VOLL, J. C.; BRITO, M. N. **Metabolismo e Características Nutricionais do Óleo 1,3-Diacilglicerol.** *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 3, n. 1, p. 121-126, 2010.
- WANG, Y.; ZHAO, M.; OU, S.; SONG, K.; HAN, X. **Preparation of diacylglycerol-enriched palm olein by phospholipase A1-catalyzed partial hydrolysis.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.111, 652–662, (2009a).

- WANG, Y.; ZHAO, M.; OU, S.; XIE, L.; TANG, S. **Preparation of a diacylglycerol-enriched soybean oil by phospholipase A1 catalyzed hydrolysis.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.56, 165–172, (2009b).
- WANG, Y.; ZHAO, M.; SONG, K.; WANG, L.; TANG, S.; RILEY, W. W. **Partial hydrolysis of soybean oil by phospholipase A1 (Lecitase Ultra).** Food chemistry, v.121, 1066-1072, 2010.
- WARSHHELL, A.; LEVITT, M. **Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme.** J. Mol. Biol, v. 103, p.227-249, 1976.
- WATANABE, Y.; NAGAO, T.; NISHIDA, Y.; TAKAGI, Y.; SHIMADA, Y. **Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification.** J Am Oil Chem Soc; 84:1015–21, 2007.
- XU, Y.; DU, W.; ZENG, J.; LIU, D. **Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 22, n. 1, p. 45-48, 2004.
- YADAV, G. D.; DEVI, K. M. **Immobilized Lipase-Catalysed Esterification and Transesterification Reactions in Non-Aqueous media for the Synthesis of Tetrahydrofurfuryl butyrate: Comparison and kinetic modeling.** Chemical Engineering Science, v.59, p. 373-383, 2004.
- YANG, T.; FRUEKILDE, MB. XU, X. **Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification.** J Am Oil Chem Soc 80: 881-887, 2003
- YANG, T.; REBSDORF, M.; ENGELRUD, U.; XU, X. **Monoacylglycerol synthesis via enzymatic glycerolysis using a simple and eficiente reaction system.** J Food Lipid 12: 299-312, 2005
- YASUNAGA, K.; GLINSMANN, W. H.; SEO, Y.; KATSURAGI, Y.; KOBAYASHI, S.; FLICKINGER, B.; KENNEPOHL, E. **Safety aspects regarding the consumption of high-dose dietary diacylglycerol oil in men and women in double-blind controlled trial in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil.** Food and Chemical toxicology, v. 42, p. 1419-1429, 2004.
- YOU, L. L.; BAHARIN, B. S. **Effects of Enzimatic Hydrolysis on Crude Palm Olein by Lipase from *Candida Rugosa*.** J. Food Lipids, v. 13, p. 73-87, 2006.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. **The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media.** J. Biological Chemistry, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.
- ZAREJOUSHEGHANI, F.; KARIMINIA, H. R.; KHORASHEH, F. **Kinetic modelling of enzymatic biodiesel production from castor oil: Temperature dependence of the Ping Pong parameters.** The Canadian Journal of Chemical Engineering, v.94, 512-517, 2016.
- ZENEVICZ, M. C. P.; JACQUES, A.; FURIGO JR, A. F.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, D. **Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system.** Industrial Crops and Product, v. 80, p. 235-241, 2016.

ZHONG, N., LI, L., XU, X., CHEONG, L.-Z., ZHAO, X., & LI, B. **Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis.** *Food Chemistry*, 122(1), 2011.