

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - DOUTORADO**

GEORGE FERNANDO FINCO

**PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA
REAÇÃO DE GLICERÓLISE CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA**

TOLEDO

2023

GEORGE FERNANDO FINCO

**PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA
REAÇÃO DE GLICERÓLISE CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de “Doutor em Engenharia Química” – Área de Concentração: Engenharia Química.

Orientador: Fernando Palú
Coorientador: Edson Antônio da Silva

TOLEDO
2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Finco, George Fernando

Produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise catalisada por lipase imobilizada / George Fernando Finco; orientador Fernando Palú; coorientador Edson Antônio da Silva. -- Toledo, 2023. 158 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2023.

1. Glicerólise enzimática imobilizada. 2. Lipase líquida . 3. Monoacilglicerol. 4. Modelagem cinética. I. Palú, Fernando, orient. II. Silva, Edson Antônio da, coorient. III. Título.

GEORGE FERNANDO FINCO

**PRODUÇÃO DE MONOGLICERÍDEOS E DIGLICERÍDEOS A PARTIR DA
REAÇÃO DE GLICERÓLISE CATALISADA POR LIPASE IMOBILIZADA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de “Doutor em Engenharia Química” – Área de Concentração: Engenharia Química.

Aprovado em: 28 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Karina Graziella Fiametti Colombo
UTFPR - Toledo

Dr^a Keiti Lopes Maestre
Colégio Estadual São Pedro

Dr^a Márcia Regina Fagundes Klen
UNIOESTE - Toledo

Dr^a Maria Luiza Fernandes Rodrigues
UNIOESTE - Toledo

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo acompanhar a produção de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) a partir do óleo de oliva, utilizando Tween 80 como surfactante, butanol como co-surfactante e enzima *Lipozyme TL 100L* como biocatalisador, imobilizada em suporte *Spectrogel tipo C*, para obter-se agentes emulsificantes de maior valor agregado. Realizaram-se os testes preliminares em doze pontos de microemulsões que tiveram estabilidade para a glicerólise, o ponto que apresentou maior eficiência de conversão dos triacilgliceróis (TAG) foi submetido a um planejamento fatorial 2^2 . Adotou-se tal metodologia da produção de DAG e encontraram-se fatores de conversão de, aproximadamente, 95% de TAG em MAG e DAG. A fim de otimizar a metodologia, com o auxílio modelo matemático Box-Behnken, elaborou-se um modelo matemático com os resultados do planejamento e obteve-se um valor teórico de 97% de rendimento com a utilização de 7,95% (m/m) de enzima a 36°C. Para tal, reproduziram-se os pontos teóricos e obteve-se experimentalmente o ponto ótimo nas condições de razão molar glicerol:óleo 2:1, 36°C, 8% (m/m) de enzima e num tempo de reação de 120 minutos e apresentaram uma eficiência de conversão de, aproximadamente, 97% em MAG e DAG. Otimizou-se a técnica de adsorção da mesma forma que a glicerólise enzimática e utilizaram-se as condições ótimas para o processo de adsorção, obtendo-se um ponto máximo teórico de 96 U g⁻¹ de atividade obtida e, na prática, obteve-se 93 U g⁻¹ de valor médio. Portanto, as condições teóricas e experimentais tiveram resultados elevados e tais condições estabeleceram melhora na conversão. A atividade enzimática também seguiu o mesmo parâmetro, ou seja, aumentou com a aplicação do ponto teórico.

Palavras-chave: Glicerólise enzimática imobilizada; azeite de oliva; MAG, DAG e TAG; lipase; biocatalisador.

ABSTRACT

The present work aimed to monitor the production of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) from olive oil, using Tween 80 as surfactant, butanol as co-surfactant and *Lipozyme TL 100L* enzyme as biocatalyst, immobilized on support *Spectrogel type C* to obtain emulsifying agents with higher added value. The stability of the micros that had stability to glycerolysis that presented greater efficiency of conversion of triacyllons (TAG) was carried out. The points for a glycerolysis were submitted to factorial planning 2^2 . This methodology was adopted for the production of DAG, and these conversion factors of approximately 95% of TAG in MAG and DAG were found. In order to optimize the methodology, with the help of the Box-Behnken mathematical model, a mathematical model was elaborated with the planning results and a theoretical value of 97% of performance with the use of 7.95% (m/m) of enzyme at 35.97°C. For this, the theoretical and experimental points were reproduced, and the optimum point was obtained under the conditions of glycerol: oil molar ratio 2:1, 36°C, 7.95% (m/m) of enzyme and in a reaction time of reaction 120 minutes, and a conversion efficiency of approximately 97% in MAG and DAG. The adsorption was optimized in the same enzymatic way as the glycerolysis conditions and used as optimal for the adsorption process, obtaining a theoretical maximum of 96 U g⁻¹ of activity or practical 93 U g⁻¹ of average value. Therefore, the experimental results had similar results when compared with theoretical results, and such conditions were established in the conversion. Enzyme activity is also compatible with the same parameter, or increased by applying the theoretical point.

Key-words: Immobilized enzymatic glycerolysis; olive oil; MAG, DAG and TAG.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

MAG	Monoacilgliceróis
DAG	Diacilgliceróis
TAG	Triacilgliceróis
AG	Acilgliceróis
MO	Microemulsões
R ²	Coefficiente de determinação
O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
v	Volume
c	Concentração
m	Massa
min	Minuto
ANOVA	Análise de variância
DCCR	Delineamento do composto central rotacional
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
gENZ gSUP ⁻¹	Gramas de enzima / gramas de suporte
HLB	Hidrofílicos-lipofílicos
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
PD	Padrão
AP PD	Área de pico do padrão
C PD	Concentração do padrão

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural dos ácidos linolênico, linoleico e oleico.	17
Figura 2 – Reação de glicerólise de um TAG para formação de MAG e DAG.	18
Figura 3 – Tipos de MO.	25
Figura 4 – Fórmula estrutural do Polisorbato 20.	27
Figura 5 – Estrutura do Tween 80 (Polissorbato 80).	29
Figura 6 – Mecanismo reacional da quebra de TAG.	32
Figura 7 – Tipos de interações entre enzima e suporte.	38
Figura 8 – Estrutura da Montmorilonita, principal componente das bentonitas.	42
Figura 9 – Fluxograma de processo de glicerólise enzimática imobilizada.	52
Figura 10 – Quantificações e otimização das condições de processo.	53
Figura 11 – Reator encamisado acoplado à banho termostático.	62
Figura 12 – Amostras acondicionadas para posterior leitura.	63
Figura 13 – CLAE Ultimate 3000 utilizado nas corridas cromatográficas.	71
Figura 14 – Coluna cromatográfica C18 Phenomenex modelo 00G-4252-E0.	72
Figura 15 – Espectros de FTIR.	78
Figura 16 – Espectros de FTIR nas reações de glicerólise.	79
Figura 17 – Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão.	81
Figura 18 – Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura.	82
Figura 19 – Tentativas de microemulsões malsucedidas / bem-sucedidas.	85
Figura 20 – Comparação da eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG da enzima livre e da enzima imobilizada (%).	91
Figura 21 – Comparação da eficiência da conversão de TAG em MAG e DAG das enzimas livres e imobilizadas.	92
Figura 22 – Cromatograma área de pico x tempo da Amostra 14 (Razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C).	93
Figura 23 – Diagrama de dispersão das eficiências para enzimas imobilizadas.	98
Figura 24 – Diagrama de dispersão das eficiências para enzimas livres.	99
Figura 25 – Diagrama de Pareto do DCCR 22 da adsorção.	103
Figura 26 – Superfície de contorno do DCCR 2 ² da adsorção.	104
Figura 27 – Superfície resposta do DCCR 2 ² da adsorção.	104
Figura 28 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2 ²	108
Figura 29 – Superfície de contorno do DCCR 2 ²	109

Figura 30 – Superfície resposta do DCCR 2 ²	109
Figura 31 – Cromatograma do ponto central, sistema a 35°C e 7,5% de enzima – Área de pico x Tempo de corrida.	113
Figura 32 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2 ²	114
Figura 33 – Superfície de contorno do DCCR 2 ²	115
Figura 34 – Gráfico de superfície de resposta do DCCR 2 ²	115
Figura 35 – Cromatograma do ponto ótimo, sistema a 36°C e 7,95% de enzima – Área de pico x Tempo de corrida.	118
Figura 36 – Gráfico de comparação da conversão em função atividade enzimática.. ..	119
Figura 37 – Gráfico da dispersão em função da atividade enzimática.	119
Figura 38 – Cinética da glicerólise do óleo de oliva (7,4% de glicerol, 10% de azeite de oliva, 5% de água e 7,95% de enzima, 36°C).	121
Figura 39 – Cromatograma com padrões de MAG, DAG e TAG.....	152
Figura 40 – Curva de calibração do 1-Linoleoyl-rac-glycerol.....	152
Figura 41 – Curva de calibração do 1-Oleoyl-rac-glycerol.	153
Figura 42 – Curva de calibração do 1-Monopalmitol-rac-glycerol.	153
Figura 43 – Curva de calibração do Dilinoleoyl-rac-glycerol.....	154
Figura 44 – Curva de calibração do Glyceryl trioleate.....	154
Figura 45 – Curva de calibração do Glyceryl trilinoleate.	155
Figura 46 – Cromatograma, sistema a 35°C e 11,02% de enzima.....	157
Figura 47 – Cromatograma, sistema a 40°C e 10% de enzima.....	157
Figura 48 – Cromatograma, sistema a 42°C e 7,5% de enzima.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do azeite de oliva extra virgem.....	21
Tabela 2 – Relação de setores, aplicações e produtos obtidos por lipases.	33
Tabela 3 – Estudos com a <i>Lipozyme TL 100L</i> e condições ótimas.....	35
Tabela 4 – Estudos da glicerólise enzimática com diversos suportes.....	45
Tabela 5 – Variáveis utilizadas no planejamento experimental 2 ²	59
Tabela 6 – Decodificação das variáveis do planejamento 2 ²	60
Tabela 7 – Planejamento fatorial 2 ² com triplicata no ponto central.....	60
Tabela 8 – DCCR 2 ² do melhor ponto do planejamento 2 ³	64
Tabela 9 – Porcentagem dos padrões presentes no azeite de oliva.	75
Tabela 10 – Testes com as microemulsões e suas proporções.....	84
Tabela 11 – Cálculo de concentração de TAG das MO`s formadas.	86
Tabela 12 – Monitoramento do pH durante a glicerólise enzimática das enzimas livres	87
Tabela 13 – Controle do pH durante a glicerólise enzimática com a utilização das enzimas imobilizadas	88
Tabela 14 – Eficiência de conversão mássica para cada microemulsão formada com a enzima imobilizada.....	90
Tabela 15 – Eficiência de conversão mássica para cada microemulsão formada com a enzima livre.	90
Tabela 16 – Padrões utilizados, equação da reta e tempos de retenção.....	95
Tabela 17 – Área de pico de cada padrão para cada amostra imobilizada.....	95
Tabela 18 – Concentração de cada padrão pós-glicerólise enzimática imobilizada..	95
Tabela 19 – Área de pico de cada padrão para cada amostra livre.	96
Tabela 20 – Concentração de cada padrão pós-glicerólise enzimática livre.....	96
Tabela 21 – Resultados do planejamento fatorial 2 ² para o processo de adsorção por imobilização.....	100
Tabela 22 – ANOVA do DCCR 2 ² da imobilização da enzima pelo processo de adsorção.....	100
Tabela 23 – Tabela dos efeitos do DCCR 2 ² da imobilização da enzima por adsorção.	101
Tabela 24 – Triplicata do ponto ótimo do processo de adsorção.	105

Tabela 25 – Atividade enzimática obtida por meio do planejamento fatorial DCCR 2 ² (razão molar 2:1, 2 horas de reação).	106
Tabela 26 – ANOVA do delineamento DCCR 2 ²	107
Tabela 27 – Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2 ²	107
Tabela 28 – Atividade enzimática na triplicata no ponto ótimo.	110
Tabela 29 – Eficiência da reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 2 horas de reação) no planejamento DCCR 2 ²	111
Tabela 30 – ANOVA do delineamento DCCR 2 ²	112
Tabela 31 – Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2 ²	112
Tabela 32 – Eficiência da reação do ponto ótimo definido pelo modelo.	116
Tabela 33 – Estudos com a <i>Lipozyme TL 100L</i> e condições ótimas.	117
Tabela 34 – Valores estimados das constantes cinéticas de reação.	120
Tabela 35 – Eficiência da reutilização da enzima no ponto ótimo.	123
Tabela 36 – Área dos picos (Mriu) dos grupos AG's das MO's tratadas	156

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
1.2 JUSTIFICATIVA	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ÓLEOS E GORDURAS	17
2.1.1 Modificação de óleos e gorduras.....	18
2.2 AZEITE DE OLIVA	19
2.3 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS E SUAS APLICAÇÕES.....	22
2.4 MICROEMULSÕES	24
2.5 SURFACTANTE E CO-SURFACTANTE.....	27
2.6 LIPASES COMO BIOCATALISADORES	30
2.6.1 Estado da arte	34
2.6.1.1 Estado da arte quanto as pesquisas que empregaram a lipase Lipozyme TL 100L	34
2.7 MICROEMULSÕES COMBINADAS A LIPASES	35
2.8 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	36
2.9 ADSORÇÃO FÍSICA	38
2.10 SUPORTES PARA AS ENZIMAS	399
2.10.1 Argila como suportes de biocatalisadores	40
2.10.2 Argila Comercial <i>Spectrogel tipo C</i>	41
2.10.3 Ativação ácida das bentonitas.....	44
2.11 ESTUDOS COM IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA <i>LIPOZYME TL 100L</i> E ESTUDOS COM O SUPORTE <i>SPECTROGEL TIPO C</i>	45
2.12 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS.....	47
2.13 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO	49
2.14 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS	53
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA	54
3.2.1 Determinação da umidade e do índice de acidez do azeite de oliva.....	54

3.2.2 Perfis de ácidos graxos no azeite de oliva	55
3.2.3 Perfis de ácidos graxos na curva de calibração	56
3.3 TRATAMENTO DAS MICROEMULSÕES.....	56
3.4 TRATAMENTO DA ARGILA.....	57
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE PRÉ E PÓS IMOBILIZAÇÃO	57
3.5.1 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	58
3.5.2 Análises de Microscopia de Varredura (MEV).....	58
3.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	58
3.6 IMOBILIZAÇÃO DA <i>LIPOZYME TL 100L</i> POR ADSORÇÃO.....	58
3.6.1 Otimização do processo de adsorção	59
3.6.2 Planejamento experimental para o processo de adsorção.....	59
3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE.....	61
3.7.1 Glicerólise enzimática com a enzima livre e imobilizada	61
3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL GLICERÓLISE ENZIMÁTICA COM A ENZIMA IMOBILIZADA	63
3.8.1 Análise de Variância.....	64
3.9 REUTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS	65
3.10 CINÉTICA DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA	65
3.10.1 Determinação da cinética de reação	65
3.10.2 Estimação de parâmetros.....	69
3.11 DETERMINAÇÃO DE TAG, DAG E MAG	70
3.11.1 Determinação das curvas a partir dos padrões do azeite de oliva	70
3.11.2 Quantificação de MAG, DAG e TAG	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA	73
4.1.1 Determinação da umidade	73
4.1.2 Determinação do Índice de Acidez do azeite de oliva	74
4.1.3 Perfil dos Ácidos graxos do azeite de oliva	74
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE DE ARGILA.....	75
4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com FTIR.....	75
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	80
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	81
4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS MICROEMULSÕES DAS ENZIMAS LIVRES	83

4.4 CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DAS MICROEMULSÕES	86
4.5 RESULTADOS DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DAS MO UTILIZANDO ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS	87
4.5.1 Eficiência de conversão pela área de pico	89
4.5.2 Eficiência de conversão pela curva de calibração	94
4.5.3 Equivalência entre os métodos de eficiência de conversão	98
4.6 PLANEJAMENTO FATORIAL DA IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO.....	99
4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS EXPERIMENTOS DE GLICERÓLISE COM A ENZIMA IMOBILIZADA	105
4.7.1 Atividade enzimática do ponto ótimo	110
4.8 RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE	110
4.8.1 Otimização da conversão da reação de glicerólise	115
4.9 CINÉTICA DE REAÇÃO POR PING-PONG BI-BI	120
4.9.1 Correlação entre os modelos de MAG, DAG e TAG	122
4.10 REUTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS	123
4.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
5 CONCLUSÕES	125
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
APÊNDICE.....	151

1 INTRODUÇÃO

Gorduras e óleos vegetais também são chamados de gliceróis, glicerídeos e lipídeos. São alimentos que fornecem energia ao organismo por terem elevado valor calórico, aproximadamente 9 calorias por grama de gordura. Além disso, fornecem ácidos graxos essenciais, transportadores de vitaminas lipossolúveis e estão presentes na formação da membrana celular das células. Por esses motivos, devem ser inseridos na dieta e consumos dentro dos parâmetros metabólicos de cada indivíduo (NELSON; COX, 2018).

Estruturalmente, são formados por uma cadeia carbônica, que, em uma extremidade, é ligada a um radical saturado (gorduras) ou insaturado (óleos). E a sua estrutura pode ser dividida de duas formas, como ácidos graxos simples (acilgliceróis diversos) e lipídios complexos. Lipídios são os elementos presentes nos alimentos em que são solúveis em solventes orgânicos, tais como: éter de petróleo, éter etílico, benzeno, clorofórmio, acetona e álcoois e insolúveis em água. Os solventes apolares são eficientes na extração da fração lipídica neutra que incluem os triacilgliceróis, monoacilgliceróis e diacilgliceróis (TAG, MAG e DAG, respectivamente) (CAMPBELL-PLATT, 2015).

Quando consumidos em excesso, podem causar sobrepeso, problemas cardíacos, respiratórios, nos rins, osteoporose, surgimento de doenças autoimunes, envelhecimento precoce, entre outros. Nesse contexto, quanto menos complexo for o acilglicerol a ser ingerido, mais fácil ele vai ser quebrado e mais benefícios trarão à saúde, portanto a modificação dos óleos e gorduras surge fortemente nas indústrias, especificamente TAG, rearranjando suas cadeias carbônicas no intuito de convertê-lo em MAG e DAG. Os MAG e DAG são formados por meio de reação de esterificação que utiliza o glicerol combinado com uma ou duas moléculas de ácidos graxos, também conhecida como glicerólise (ZENEVICZ, 2015).

A reação de glicerólise é caracterizada por condições normais por um processo que demanda elevadas temperaturas e grandes tempos de reação, para que aconteça a conversão de TAG, contudo obtém-se fatores de conversão na faixa de 90% (FORESTI; FERREIRA, 2007; SILVA, 2015). No intuito de otimizar o método, une-se a mesma fonte de TAG em um sistema microemulsionado, emprega-se um biocatalisador, normalmente uma lipase, e promove a reação. Tal metodologia, que

foi empregada neste trabalho, é conhecida como glicerólise enzimática, um sistema com altas taxas de conversão e tempo de reação baixos (MARTÍNEZ et al., 2016).

A principal dificuldade da glicerólise enzimática convencional é a reutilização da enzima, ou seja, toda reação deve empregar uma nova quantidade de enzima, gerando maiores gastos durante a reação. Assim, aplica-se como alternativa a utilização de um suporte onde a enzima há de ser adsorvida para que a catálise ocorra e, então, permitam-se testes de reutilização da mesma enzima em novas glicerólises enzimáticas (FEDERSEL et al., 2021). Além disso, pode-se avaliar a atividade enzimática e uma possível melhora na conversão de TAG.

É importante sempre otimizar as condições reacionais para a produção de MAG e DAG, pois buscam-se as melhores taxas de conversão e, assim, poder afirmar que, nas condições ótimas das variáveis, obtiveram-se as maiores conversões de MAG e TAG possíveis para o processo. Para tal, planejamentos fatoriais e modelagens matemáticas foram utilizadas e testadas experimentalmente para garantir que esses objetivos fossem alcançados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir MAG e DAG a partir de da reação de glicerólise do azeite de oliva TAG, através da otimização do método de adsorção na imobilização da enzima *Lipozyme TL 100L*, empregando como suporte a argila *Spectrogel tipo C*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar a imobilização da enzima *Lipozyme TL 100L* pelo processo de adsorção empregando como suporte a argila *Spectrogel tipo C* (Variáveis independentes no planejamento e variáveis resposta);
- Caracterizar as propriedades morfológicas e estruturais do suporte e do biocatalisador;
- Preparar microemulsões estáveis em diferentes concentrações (surfactante/co-surfactante, água, óleo);

- Avaliar o desempenho do catalisador na reação de glicerólise das microemulsões preparadas em meios biocatalisados;
- Otimizar a produção MAG e DAG em termos de rendimento (variáveis avaliadas no planejamento);
- Determinar os pontos ótimos da reação de glicerólise enzimática por meio de planejamentos fatoriais 2^2 e demais parâmetros estatísticos necessários como o delineamento de composto central rotacional e validação do modelo;
- Realizar a modelagem matemática de reação da glicerólise enzimática no ponto ótimo de reação.

1.2 JUSTIFICATIVA

Com base na literatura, nota-se um vasto potencial na aplicação de lipases em processos de glicerólise enzimática imobilizada, uma vez que tal processo utiliza condições amenas de temperatura, pressão e pH neutro, há a possibilidade de reutilização do mesmo biocatalisador em mais de uma reação. Quando comparada à glicerólise convencional, os custos de processo são relativamente menores, requer longos tempos reacionais e altas temperaturas para que a catálise se complete, ou obtenha-se índices de conversão satisfatórios acima de 90% (FORESTI; FERREIRA, 2007; SILVA, 2015; NICHOLSON, 2021). Portanto, o estudo da aplicabilidade de biocatalisadores vem sendo cada vez mais estudado e merece atenção, especialmente em sua faixa de aplicação em termos de escala e matrizes da reação.

Nesse contexto, essa enzima pode ser utilizada de forma livre ou imobilizada e a principal diferença entre os métodos seria a separação do biocatalisador e seu reuso, ou seja, quando se tem a enzima de forma imobilizada, é possível a sua aplicação em mais de uma reação de glicerólise, além disso a enzima na forma livre se perde com o produto formado, não podendo separá-la no final da reação, portanto a cada reação deve-se adicionar nova quantidade de enzima (FEDERSEL et al., 2021). Isso promove uma maior conversão de TAG em MAG e DAG, aumentando a eficiência de reação e, conseqüentemente, tornando as condições de processo mais viáveis. No geral, o uso de suportes com enzimas adsorvidas na superfície favorece a interação entre as partes, tornando o biocatalisador mais estável física (pH e temperatura) e quimicamente (solventes e ação de inibidores). Essa estabilidade

possibilita o reuso do biocatalisador em novas reações (MENDES et al., 2011; MOLINARI, 2020).

Existem diversas fontes de produção de lipases (cuja atividade depende da sua fonte de extração), como das de origem animal, vegetal e microbiana. A extração das lipases, normalmente, é feita com a utilização de solventes tamponados em meio com pH controlado para cada tipo de enzima, sendo necessário buscar condições ótimas da performance da enzima (VESCOVI, 2012). A escolha da lipase *Lipozyme TL 100L* deu-se pois apresentou bons resultados na reação de glicerólise enzimática, além de que a combinação com o suporte de argila *Spectrogel Tipo C* nunca fora estudada antes, uma vez que esse suporte também é bastante aplicado em combinação às lipases, mas nunca em uma reação de glicerólise enzimática, visando sempre otimizar as conversões da reação em questão (FIAMETTI, 2012; VESCOVI, 2012; TAVARES, 2018; MOLINARI, 2020).

Dessa forma, a presente pesquisa buscou, numa primeira etapa, avaliar as variáveis de processo de imobilização por adsorção: pH e cinética da reação com foco na atividade enzimática. Numa segunda etapa, avaliou-se a aplicação do biocatalisador na síntese de MAG e DAG na reação de glicerólise do azeite de oliva. Sabe-se que a maioria dos lipídeos tem alto teor de TAG e, portanto, aplicou-se esse critério para a seleção do azeite de oliva, que, além de ter tal característica, apresenta elevada pureza. Além do mais, na composição do azeite de oliva têm grande quantidade de ácido oleico que é o principal ácido empregado com as lipases.

Assim, utilizou-se um lipase comercial como biocatalisador e argila como suporte para a enzima, a fim de determinar quais as melhores condições de processo na conversão de TAG e, ao analisar a bibliografia atual, o *Spectrogel tipo C* (Suporte) é muito utilizado na imobilização de enzimas. Porém, na busca realizada na literatura, não encontrou-se nenhum trabalho que tenha adotado a *Lipozyme TL100* na reação de glicerólise enzimática. Portanto, é importante avaliar a viabilidade da tecnologia proposta para a produção de MAG e DAG, principalmente em determinar condições que maximizem a produção do MAG e DAG e obter informações importantes para o projeto de reatores em escala industrial.

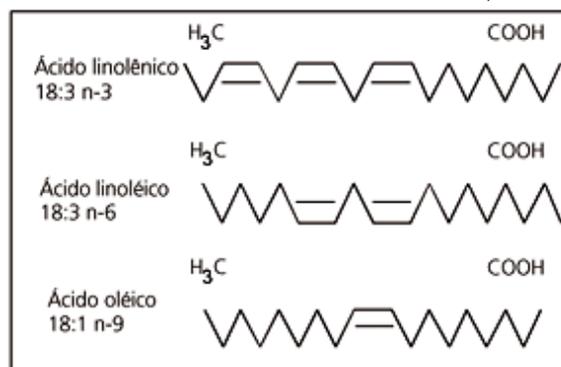
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo tem por objetivo apresentar informações presentes na literatura e relevantes ao desenvolvimento do projeto de pesquisa, dentre elas: óleos e gorduras, produção de DAG e MAG, métodos de imobilização da enzima e reação de glicerólise enzimática para obter DAG e MAG.

2.1 ÓLEOS E GORDURAS

Gorduras e óleos podem ser chamados, também, de gliceróis, glicerídeos e lipídeos, possuem funções importantes para organismos de seres vivos, pois são um dos depósitos principais de energia, e têm grande importância na alimentação humana, pois possuem propriedades funcionais, nutricionais e organolépticas. É essencial para que o metabolismo dos seres humanos ocorra de forma plena, visto que contribui para a formação de ácidos graxos essenciais que são extremamente necessários para a formação de estruturas das prostaglandinas e membranas celulares, são responsáveis, também, por serem transportadoras de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K (MAGALHÃES, 2022), que são fontes de ácidos graxos oleico, linolênico e linoleico, que podem ser observadas nas suas estruturas na Figura 01 (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

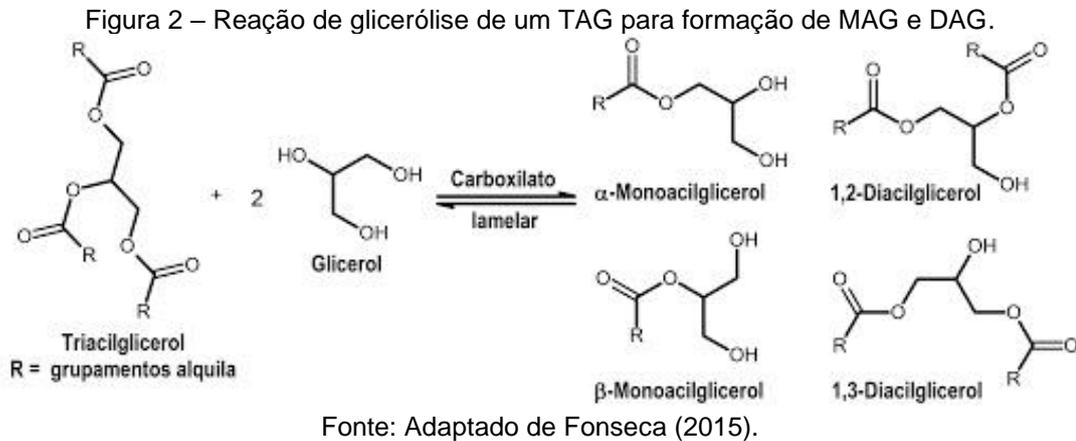
Figura 1 – Fórmula estrutural dos ácidos linolênico, linoleico e oleico.



Fonte: Garófolo e Petrilli (2006).

Os lipídios podem variar sua estrutura de duas formas, como ácidos graxos simples, acilgliceróis diversos e lipídios complexos, representados por ceras que são as formas sólidas, vitaminas lipossolúveis fosfolipídios, esteróis, lipoproteínas (proteínas com afinidade por gordura), fosfolipídios e vitaminas lipossolúveis. Os

triacilgliceróis estão presentes na composição de gorduras animais e vegetais, esta molécula é constituída por uma molécula de glicerol que se une as três moléculas de algum ácido graxo, o que pode ser observado na Figura 02 (FONSECA, 2015).



2.1.1 Modificação de óleos e gorduras

Óleos e gorduras têm uma importância fundamental para a nutrição do indivíduo, pois possuem efeitos metabólicos e fisiológicos, com isso fornece energia e ácidos graxos, que são essenciais para a manutenção do ser humano. Contudo, deve-se ingerir com responsabilidade, pois em excesso pode causar prejuízos à saúde, ocasionando doenças, como problemas cardíacos e obesidade, devido a isso, o consumidor vem buscando formas mais saudáveis de produtos nos últimos anos, que tenham propriedades nutricionais maiores (COLLAÇO et al., 2021).

Juntamente com grande demanda do mercado, o desenvolvimento de tecnologias vem buscando modificações para óleos e gorduras, criando, assim, produtos que tenham características adequadas para determinada aplicação. Atualmente, vem-se desenvolvendo métodos enzimáticos ou químicos para a alteração dos ácidos graxos em moléculas de glicerol, que se formam em triacilgliceróis (TAG) e lipídeos estruturados, isso, para a indústria alimentícia, é de grande importância, geram-se gorduras e óleos com o valor nutricional elevado, suprindo, assim, a nova demanda do mercado alimentício (CAO, 2013; RODRIGUES, 2019).

Óleos e gorduras alterados em sua composição físico-química formam estruturas mais simples, podendo ser aplicados de formas diferentes, visto que, em compostos complexos, há a possibilidade de quebrar suas estruturas em mais

simples, tendo aplicações diversas, um exemplo é a alteração da composição de oleaginosas, com propósito de produção de AG simples para ser utilizada em indústrias farmacêuticas, automotivas e alimentícias. Busca-se, também, a aplicabilidade de fontes limpas de óleos e gorduras, com isso obtém fontes renováveis para aumentar essa faixa de aplicação (FOCKING, 2017; HARWOOD et.al., 2017).

Nesse contexto, as indústrias, nos últimos anos, têm criado variados processos para otimizar a composição de produtos e subprodutos que são formados a partir de TAG. Dentre eles, os que buscam escalas maiores de aplicação são: a reversão da ligação éster (hidrólise), a modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação) e a reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do TAG (interesterificação). Na interesterificação, os AG livres são realocados entre as ligações éster, com isso criando-se estruturas novas, mais estável quimicamente. Já na hidrogenação, ocorrem modificações químicas nos AG livres, as ligações éster permanecem inalteradas, mas os AG livres são remodelados por saturação, por mudança na posição das ligações duplas ou por isomerização espacial. Na hidrólise de gorduras e óleos, acontecem a quebra de ligações químicas entre uma molécula de água e uma molécula de TAG, o que irá produzir, por meio dessa reação, glicerol e AG livres (FERREIRA et al., 2021).

2.2 AZEITE DE OLIVA

A *Olea europaea* (Oliveira) é da família Oleaceae, seu cultivo é mundial, apresenta frutos que possui finalidade dupla, azeitonas para consumo e a extração do azeite de oliva, seu uso é datado desde os tempos antigos da humanidade, em sua grande maioria na culinária e para o uso medicinal. Seu cultivo possui grande desenvolvimento no Mediterrâneo, com extensão de área a outros países, como Austrália, China e vários países da América do Sul. Seu cultivo no Brasil teve início há alguns séculos e em relação à importação, o Brasil se encontra em segundo lugar, em relação ao azeite de oliva e para azeitonas de mesa se coloca em quarto lugar mundialmente (FOSSATTI, 2017).

O azeite de oliva possui vários benefícios para a saúde e é rico em ácido oleico (monoinsaturado), o que lhe confere grande vantagem em relação a outros óleos vegetais disponíveis no mercado, que têm predominância a grande quantidade de AG polinsaturados, que, por sua vez, tem maior predisposição de oxidação, com isso se

tornando instáveis se comparados ao azeite de oliva (PACETTA, 2013). No processo de extração do azeite de oliva, usa-se a oliva verde, pois é a fase de maturação que produz menor quantidade de ácidos graxos saturados. No processo de maturação da semente, os ácidos graxos saturados diminuem e a produção de insaturados aumenta, por esse motivo é utilizada a oliva verde para a extração do azeite (ALVEZ et al., 2018).

Os azeites de oliva extra virgem são formados por meio de prensagem a frio da oliva, processo realizado pela força física, através dele o azeite conserva seus componentes originais da oliva e podemos citar os polifenóis que definem o odor do azeite. Azeites de oliva que não são virgens nem extra virgens, utilizam solventes para a extração do azeite, acarretando, assim, na perda da boa qualidade dos compostos fenólicos (RAMALHO; SUAREZ, 2012).

Segundo a classificação, o azeite de oliva poderá ser: extra virgem, que é o de melhor qualidade, seu grau de acidez é inferior a 0,8%, o mais indicado para consumo e manutenção da saúde humana; virgem, utilizado, principalmente, para uso culinário, sua acidez está entre 0,81% e 2%. O azeite virgem lampante, que é produzido somente das azeitonas e não é refinado, seu consumo é impróprio, utiliza-se com adição de outros óleos para, posteriormente, utilizá-lo no consumo, seu teor de acidez é de, aproximadamente, 3,3%; refinado, que pode vir a sofrer alterações químicas, perdendo, assim, a sua palatabilidade e suas características de melhor qualidade. O teor de acidez se aproxima a 0,5% e sua aplicabilidade é industrial, sendo misturado a outros azeites para que chegue a 1,5% de teor de acidez final inferior; por fim, o azeite composto, que é a mistura do azeite de oliva lampante (15%) com o óleo de soja (85%), sua qualidade é inferior comparado aos outros, sendo o mais vendido (GONÇALVES et al., 2015).

O azeite de oliva extra virgem é quimicamente composto por uma fração saponificável de 99%, sendo constituído de glicosídeos, AG livres, fosfolipídeos, triacilgliceróis. Destes 99%, os AG monoinsaturados correspondem a 73-76% e o restante da porcentagem se dá a AG saturados (13-15%) e poliinsaturados (9-11%). A fração insaponificável, representada por 1%, é formada por pigmentos, álcoois, tocoferóis, esteróis e hidrocarbonetos. O ácido oleico apresenta 74% dos glicerídeos presentes no azeite de oliva, sendo o produto comercial onde há a maior quantidade deste ácido (NASCIMENTO; AARESTRUP, 2017).

A relação da composição dos compostos fenólicos presentes na oliva e sua concentração no processo de extração do azeite irá determinar a sua qualidade, isso depende de dois fatores importantes: as condições geográficas e a forma de cultivo em que a oliva está submetida. Isso irá determinar o grau de amadurecimento da planta, que causa modificações químicas em sua composição e produto. Há outros fatores que devem ser levados a sério no cultivo, tais como: como foi realizada a irrigação, tecnologia utilizada para a extração do azeite e o seu modo de armazenamento (GOUVINHAS et al., 2015).

A composição de óleos e gorduras comestíveis são elaboradas por duas frações, a parte insaponificável (sem glicerol) e a parte saponificável (com glicerol). A fração sem glicerol tem diversos compostos fenólicos, embora em quantidades baixas, mas asseguram as características especiais do azeite e com muitas propriedades antioxidantes. A fração saponificável caracteriza 99% da sua composição, com, aproximadamente, 95~98% de TAG, os ésteres de ácidos graxos e glicerol (KNOTHE et al., 2006; DIAS et al., 2017).

A composição do azeite de oliva, em relação à parte que contém o glicerol, possui diversos ácido graxos (Tabela 01), sendo os principais o palmítico, linoleico e oleico. São definidos como AG, respectivamente, o MAG e DAG e, em grande parte, são TAG, os últimos são acometidos por modificações químicas para que se obtenha os primeiros. Em relação à porção que contém glicerol, sua composição é de ésteres etílicos e metílicos, ceras, álcoois, esteróis, hidrocarbonetos, dialcoois triterpenicos, AG livres, bem como contaminantes, fenóis e metais que são encontrados em concentrações baixas, mas têm certa importância, pois mantêm as características do azeite de oliva (RUÍZ-GUTIÉRREZ; PÉREZ-CAMINO; 2002; NDIAYE, 2004).

Tabela 1 – Composição química do azeite de oliva extra virgem.

Ácidos Graxos Livres	Quantidade (%)
Ácido palmítico (C16:0)	8,78 ± 0,04
Ácido palmitoléico (C16:1)	0,50 ± 0,01
Ácido esteárico (C18:0)	2,86 ± 0,05
Ácido oleico (C18:1)	75,70 ± 0,09
Ácido linoleico (C18:2)	11,72 ± 0,01
Ácido linolênico (C18:3)	0,38 ± 0,01
Ácido araquídico (C20:0)	0,32 ± 0,01
Ácido gadoleico (C20:1)	0,25 ± 0,01
Ácido behênico (C22:0)	0,12 ± 0,01

Fonte: Adaptado de Ndiaye (2004).

2.3 MONOACILGLICERÓIS E DIACILGLICERÓIS E SUAS APLICAÇÕES

Os monoacilgliceróis são formados por meio de reação de esterificação através do glicerol combinado com uma molécula de ácido graxo. Os MAG são classificados como GRAS (*Generally Recognized as safe*) pela FDA (*Food and Drugs Administration-USA*), sua aplicação é muito ampla na indústria alimentícia, como condicionantes e estabilizantes para panificação, margarinas, doces, molhos e na indústria farmacêutica e cosmética é utilizado para melhorar o aspecto da consistência de loções e cremes. Na indústria farmacêutica, é empregado em emplastos como emolientes (ZENEVICZ, 2015).

Emulsificantes não iônicos possuem uma parte hidrofóbica (frequentemente um AG) e uma parte hidrofílica (radicais livres de glicerol), têm como característica ser monoésteres anfifílicos, sendo assim, se comparado a lipídeos, são compostos com maior polaridade do que os lipídeos simples (FRANZOL; REZENDE, 2015). Forças intermoleculares fazem com que se tenha maior afinidade com a água, nas hidrofóbicas, ocorre por meio da força de *Van der Waals*, nas hidrofílicas, no radical hidroxila, ocorre ligações de hidrogênio do radical hidroxila na região polar com as moléculas de água (ATKINS; JONES, 2018).

A aplicação dos MAG também pode ser utilizada para a emulsificação e estabilização de sorvetes. Como já dito, também é utilizado para a panificação, em que sua função é o reforço para a estrutura do glúten e, conseqüentemente, a prolongação do produto. Outra utilização é para a clarificação de bebidas, facilitando, assim, a dispersão. Dito isso, a sua aplicação é muito extensa, sendo de grande interesse em relação aos MAG que contêm ácido oleico, pois se apresentam com grande potencial de ser antidiabético e antioxidante (FELTES, 2011).

As enzimas imobilizadas são empregadas para a síntese destes emulsificantes, a aplicação da imobilização de enzimas se torna uma vantagem, pois pode-se reutilizar em reações posteriores, quando necessário, e antes da reutilização faz-se uma purificação desses biocatalizadores. Com isso, torna-se vantajoso para as indústrias essa aplicação, pois sabe-se que as empresas visam à economia de maneira que consigam manter os resultados e isso lhes dá essa opção (BARBOSA et al., 2015).

Correia et al. (2011) usaram óleo refinado de bagaço de azeitona como TAG e a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano. Os autores realizaram a glicerólise enzimática sem utilizar surfactantes, a 30°C, em um período de 24 horas. Com isso, conseguiram uma conversão de 18% de DAG e 32% de MAG e o polímero funcionou como suporte para a enzima imobilizada.

Os diacilgliceróis (DAG) são ésteres de glicerol que apresentam dois grupos de hidroxila esterificados por AG e podem aparecer em duas formas de equação química, 1,3-DAG e 1,2 (2,3) -DAG. Os diacilgliceróis são utilizados como óleo de cozinha, pois contêm qualidades nutricionais e um teor de 80%, pelo menos em sua forma 1,3-DAG, assim como o MAG pode ser aplicado na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. Com isso, tais compostos se fazem presentes de forma natural em gorduras e óleos, com níveis menores se comparados ao TAG, são amplamente empregados em produtos químicos na indústria moderna (ZEENEVICZ, 2015).

A indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética utiliza os DAG como ligantes e emulsificantes, assim como os MAG. Eles possuem propriedades ligantes, estabilizantes e emolientes. MAG e os DAG são de grande importância por terem essas características, em uma glicerólise enzimática e glicerólise são os produtos mais importantes que são obtidos. Além disso, têm aprovação pela FDA (*United States Food and Drug Administration*), podendo ser utilizados em produtos farmacêuticos e em alimentos como emulsificantes (JUNIOR, 2017).

Os DAG são favoráveis para a diminuição de doenças relacionadas à obesidade e redução de gordura corporal, podemos citar, em especial, o 1,3 DAG, que tem ação no combate ao colesterol, isso ocorre devido a sua metabolização diferente em relação aos TAG (MATSUO; TOKIMITSU, 2001). No entanto, estudos relacionados à produção de DAG são direcionados ao desenvolvimento enriquecido de molhos, chocolates, óleo de cozinha e também para produtos direcionados aos fatores citados acima (CABRAL, 2014).

Como mencionado, a síntese de MAG e DAG pode ser conduzida de várias formas, contudo, em indústrias, acontece a glicerólise do TAG, frequentemente em elevadas temperaturas (acima de 200°C), com a presença de catalisadores químicos. Regularmente, é obtido uma mistura constituída por 10% de TAG, 40% de DAG e 50% de MAG. Usualmente, no processo industrial, não se emprega enzimas, devido ao custo elevado, pois a compra das enzimas faz com que agregue um alto valor aos produtos. Outro motivo é por ser uma proteína muito sensível e específica, se exposta

a temperaturas baixas, ela inativa e, em temperaturas elevadas, desnatura e, por consequência, inviabiliza sua reutilização e aumenta os custos de produção (SILVA, 2017a).

A reação de glicerólise enzimática tem como característica a migração de grupos acila de TAG para o glicerol, que resulta em DAG e MAG, a proporção para a que ocorra a reação entre TAG e glicerol é de 2:1, em que 3 mols de MAG se formam, mas podem ser formadas DAG em quantidades significativas. O glicerol em excesso beneficia a formação de MAG, entretanto podem causar problemas relacionados à transferência de massa, em níveis elevados. Caso isso ocorra, é utilizado solventes para se evitar que as fases se separem (SILVA, 2017a).

Além disso, há diversos estudos que estão empregando, como, por exemplo, no trabalho de Zanatta et al. (2017), em que os autores promoveram a hidrólise enzimática (com diversas lipases de origem vegetal e animal) de lipídeos presentes em efluentes variando-se o pH do meio, temperatura do sistema e concentração de lipase envolvida no processo, obtendo-se a quebra desses lipídeos em compostos menos complexos.

As enzimas, no geral, promovem a diminuição do valor energético da reação, podendo ser utilizadas em temperatura ambiente em alguns casos, entretanto a glicerólise convencional deve manter a 200°C e, conseqüentemente, eleva os gastos. A enzima, por possuir uma atividade mais seletiva, favorece a formação de produtos mais puros e com uma menor geração de resíduos, devido a isso se tem um produto com qualidade (SANTOS et al., 2013).

2.4 MICROEMULSÕES

As microemulsões são agrupamentos geralmente esféricos, são denominadas como sistemas estáveis termodinamicamente, transparentes e isotrópicos, o que resulta da junção entre dois líquidos imiscíveis. Geralmente formados de água e óleo, que se estabilizam pela presença de compostos tensoativos que podem interagir tanto com substâncias polares quanto apolares, assim podem promover a conexão entre a água e o óleo (SANTOS, 2017).

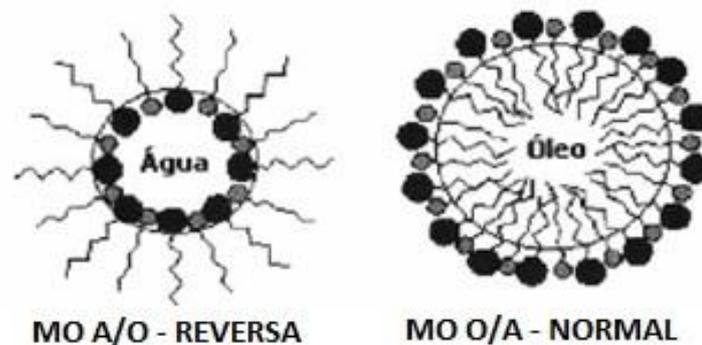
Quando essa junção se faz por meio de óleo e água, são denominadas de normal (O/A), quando ocorre entre água e óleo, são chamadas de reversa (A/O), conforme ilustrado na Figura 03. O surfactante é utilizado para que ocorra a

estabilização destes dois compostos com polaridades diferentes e faz com que ocorra a diminuição da tensão superficial e a absorção de forma ampla na mistura. As MO variam o seu tamanho em 50 a 500 nm, com viscosidade baixa, turbidez não detectada e muito estável.

A estabilidade da emulsão pode ser avaliada a partir de testes de estresse físico e térmico, as amostras são submetidas a altas temperaturas para que não ocorra a separação das fases se mantendo limpas, e/ou com agitação em Vortex com a mesma finalidade. As microemulsões podem ser aplicadas em reações de catálise, são capazes de viabilizar procedimentos eletroanalíticos em amostras de óleos vegetais, na área de alimentos, como emulsificantes, aumento de estabilidade de nutrientes, além de aumentar a eficiência dos conservantes alimentícios, promovem uma otimização de métodos analíticos (SILVA et al., 2015).

Dependendo da metodologia utilizada, faz-se uso de testes de durabilidade de refrigeradores, o mais importante é fazer com que a MO não perca suas características no decorrer dos testes. A organização das micelas está em monocamadas, com o grupo apolar direcionado ao óleo e o polar direcionado à água inversamente ao óleo. As micelas suportam mudanças bruscas de temperatura e físicas, isso faz delas estáveis. Com isso, tornam-se sistemas bastante utilizados, principalmente na glicerólise enzimática, que necessita de micelas juntamente com um surfactante/co-surfactante para realizar o encaixe chave-fechadura (KHAN; SINGH; SEN, 2016).

Figura 3 – Tipos de MO.



Fonte: Carvalho e Cabral (2000).

A constância da emulsão tem importância para a indústria por estar ligada diretamente à resistência em relação às alterações das propriedades e de onde está

inserida ao longo do tempo, com isso deve-se estar estável quando a fase dispersa não sofrer modificação evidente. O sistema micelar estável está ligado a alguns fatores, que são cremação, floculação, sedimentação e rompimento da emulsão, e estão relacionados à pressão, estresse, agitação e variação da temperatura. Sendo assim, refere-se a um sistema dinâmico, porém se deve ao aumento da área interfacial, termodinamicamente instável, com energia necessária para a obtenção de uma MO, frequentemente energia mecânica (LIMA, 2015).

Podemos observar, na Figura 03 (micelas reversas A/O), que ocorre a formação de uma espécie de núcleo central polar. Identifica-se que estes grupos são determinados por expor um número de agregação (massa molecular) e diâmetro definido, com uma estrutura de modo relativo ordenado. É necessário conhecer a relação molar surfactante/água para se definir o diâmetro da micela reversa, para que ocorra a formação da MO e, como consequência, a estabilidade do sistema (GUAN et al., 2015).

Formadas as micelas, adiciona-se o biocatalisador e glicerol, um exemplo são as reações de glicerólise enzimática. A estabilidade do biocatalisador é modificada pelo tipo de micela formada, tal como as O/A, como a faixa de pH e temperatura são maiores. Ademais, a solubilidade e a área superficial tendem a aumentar, com isso facilita-se o encaixe chave-fechadura da interface do óleo com a enzima. Essas etapas são importantes para que ocorra o aumento da eficiência enzimática de conversão de TAG em MAG e DAG (GAO et al., 2015; ZHANG et al., 2017b). Como as fases oleosas e aquosas têm concentrações similares, podendo, assim, formar-se uma micela bicontínua, isto é, as duas micelas em um mesmo sistema, que é capaz de ser observado em um microscópio eletrônico, pois o diâmetro é na escala de nanômetros (JIAN et al., 2001; RAMÍREZ et al., 2016).

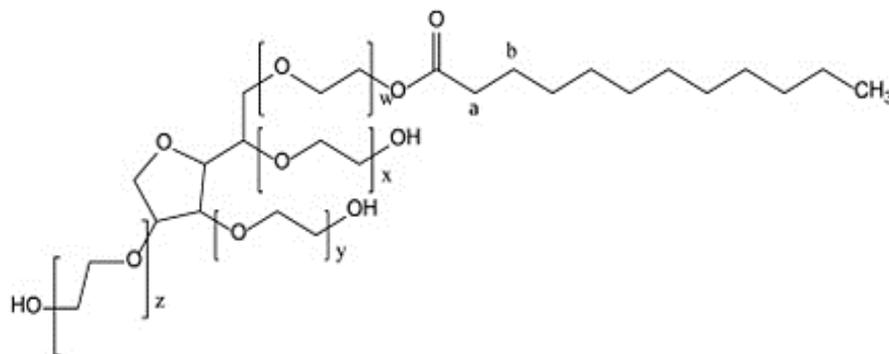
Atualmente, existem estudos realizados sobre a aplicação de MO reversas para glicerólise enzimática de óleos de fritura residual, com isso os resíduos são empregados como fonte de TAG para realização da síntese de MAG e DAG, por meio da emulsão. A utilização da MO reversa, pois, a fase predominante no processo de formação dessas microemulsões é oleosa, portanto, forma-se de forma espontânea tais tipos de micelas. Em mecanismo, a água fica no meio da micela e é estabilizada por óleo em volta, assim aumenta-se a área de contato da microemulsão com o catalisador, o que aumenta a eficiência de reação (CHEN et al., 2020).

2.5 SURFACTANTE E CO-SURFACTANTE

Com o propósito de possibilitar o aumento da área de interface do sistema água/glicerol/óleo, faz-se a aplicação de surfactantes, que também eleva a velocidade de catálise do meio quando o biocatalisador é adicionado no sistema. Com isso, a catálise dos TAG e a formação de sistemas micelares estão diretamente ligados ao surfactante, acarretando, assim, a ligação na eficiência de conversão (HAYES, 2017). Os principais surfactantes utilizados são os polisorbatos, conhecidos como Tween 20, 60, 80, Arlacel 60 e 80.

Na Figura 04, é apresentada a estrutura do surfactante Polisorbato 20, classificada como anfifílica, por possuir uma calda apolar (lipofílica) e uma cabeça polar (hidrofílica). A parte hidrofílica pode ser dipolar, aniônica, catiônica ou não carregada. Possuem como principais características solubilidades distintas em duas regiões. Refere-se a um agente que diminui a tensão superficial de uma mistura. Com isso, deste grupo de compostos obtém-se uma importante propriedade: de forma ordenada, ocorre a formação de um filme molecular, que irá reduzir a tensão superficial e interfacial (DJEKIC et al., 2012).

Figura 4 – Fórmula estrutural do Polisorbato 20.



Fonte: Lei et al. (2013).

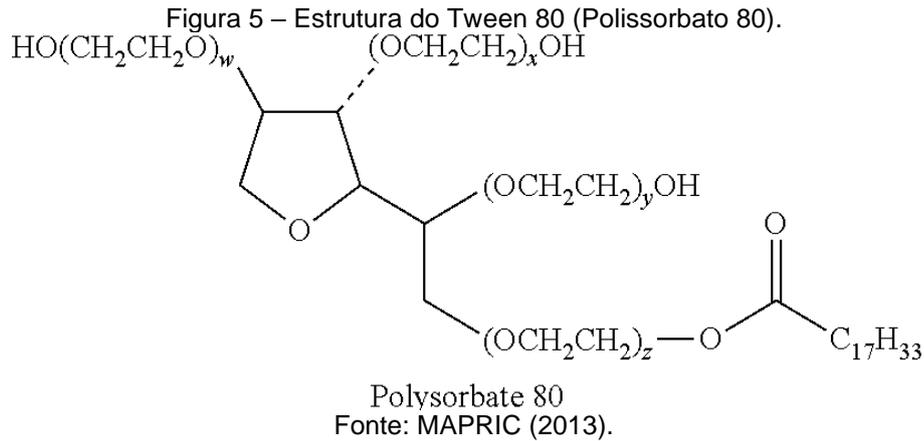
A recuperação química industrial de óleos pode ser realizada por meio da aplicação de surfactantes, dentre eles, podemos citar a área petrolífera, contudo é necessária uma quantidade abundante de surfactante para a recuperação destes óleos, pois esses resíduos possuem uma quantidade elevada de números de carbono. São utilizados surfactantes hidrofóbicos que necessitam ser ramificados com o objetivo de formação de MO com viscosidade moderada/baixa, podendo aumentar a interação do óleo com os surfactantes. Porém, esse processo normalmente é

realizado com solventes em elevadas pressões e temperaturas, e isso pode levar a desnaturação e inativação das enzimas, acarretando por consequência a redução de rendimento (LU et al., 2014).

Para a eficiência de um surfactante, tem-se a concentração crítica, que é definida na fase aquosa pela solubilidade do surfactante. Esse valor se dá quando ocorre a ruptura de porções conhecidas em água de determinados surfactantes, sempre controlando a tensão interfacial e superficial, localiza-se valores de tensão em função da quantidade de surfactantes presentes no meio. O surfactante é mais eficiente quando apresentar baixos valores de concentração micelar crítica (ARAÚJO, 2016).

Os surfactantes são capazes de se ligarem a moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas, o que lhes confere a característica de serem anfipática ou anfifílica, esta ramificação equivale a uma região alifática e a uma polarização em uma segunda região molecular, em que é classificada conforme a sua carga elétrica no segmento polar. Os compostos alifáticos são divididos em: não-iônicos, catiônicos e aniônicos. Em meio ao líquido heterogêneo óleo e água, polaridades que são equivalentes vão se combinar, o óleo, que foi solubilizado na água, vai atrair-se pelo segmento apolar dos surfactantes, assim forma-se um grupo tridimensional esférico que é chamado de lamelas (BRASILEIRO, 2018). O uso dos surfactantes está empregado em vários processos industriais, biológicos, domésticos e atuam como agente molhante, emulsificantes, agente de suspensão, lubrificantes, dispersão de fases dentre outras funções (FELIPE; DIAS, 2017).

O polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) se destaca entre os surfactantes e é conhecido como Tween 80, podemos observá-lo na Figura 05. É formado por ésteres de sorbitan etoxilados, conforme seu grau de etoxilação e o tipo de ácido graxo de origem, sendo uma linha de compostos iônicos e possui peso molecular de 1310 g mol^{-1} , podendo ser obtidos com balanços diferentes hidrofílicos-lipofílicos (HLB). As características principais são: tensoativos hidrofílicos (alto equilíbrio hidrofílico); solúveis ou dispersáveis em água; cadeia apolar de polioxietileno (particularidade das diversas famílias do Tween). Na indústria farmacêutica, tem ampla aplicabilidade na produção de cremes e loções. Na indústria alimentícia, por ser um composto com toxicidade elevada, é mais restrito à sua utilização, por ser um ramo novo em estudos, não se encontram muitos estudos bibliográficos (MAPRIC, 2013).



Os biosurfactantes, obtidos de fontes microbiológicas, possuem as mesmas características do surfactante e dispõem de alta propriedade emulsificante, que, frequentemente, é referente a subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos, diminuem também tensão superficial e interfacial. Suas vantagens em comparação aos surfactantes sintéticos estão relacionadas à biodegradabilidade, possuem maior estabilidade em relação ao pH, salinidade e temperatura, apresentam também níveis menores de toxicidade. Biosurfactantes podem ser aplicados de forma similar aos surfactantes convencionais, podendo ser utilizados em reações de hidrólise, utilizando ou não enzimas, estabilizando microemulsões e emulsões, por exemplo (ARAÚJO, 2016). Ademais, favorece as questões ambientais, visto que forma-se produtos limpos que são compostos biodegradáveis e não geram danos ao meio ambiente.

Em relação à estrutura, os surfactantes são semelhantes, em relação à parte hidrofílica e lipofílica, geralmente sendo iônicos ou neutros, estruturados com polímeros ou AG pequenos, com destaque para os fosfolipídeos, glicolipídeos, surfactantes poliméricos e particulados e os lipopeptídeos. Quando necessário, faz-se a utilização de co-surfactantes a fim de aumentar a área superficial da amostra e capacitar a estabilização do sistema que receberá a reação de glicerólise enzimática (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os co-surfactantes agem na redução da tensão interfacial adicional que ocorre entre óleo e água, que é fundamental para a formação e a estabilidade termodinâmica, física e química das MO. Também é essencial para a fluidez do filme interfacial que é produzido pelo surfactante, isso faz com que não ocorra uma elevação brusca da viscosidade do meio micelar. Os co-surfactantes indispensáveis são os álcoois com

cadeia de dois a dez carbonos, por possuir cadeia apolar com porção polar e induzir as fases oleosas e aquosas (SILVA et al., 2015).

Eles são responsáveis por ajudar na redução da tensão interfacial do sistema, que é necessária para a formação e estabilidade das microemulsões e promovem a fluidificação do filme interfacial, que é formado pelo surfactante e impede a elevação significativa do sistema. Normalmente, utiliza-se um álcool que é capaz de influenciar a solubilidade das fases aquosa e oleosa, pois estruturalmente participa entre ambas as fases. Ademais, com a repulsão das cargas de grupos polares nos surfactantes, impede a existência de um empacotamento eficiente, uma vez que a tensão superficial não está suficientemente reduzida, então a possibilidade de adição de um co-surfactante reduz essa tensão do sistema quase a zero, forma essa camada interfacial mais estável e aumenta a estabilidade das microemulsões (SILVA et al., 2015). Portanto, no sistema de microemulsões, podemos utilizar diferentes tipos de catalisadores, dentre eles podemos citar os biocatalisadores (lipases), que são proteínas com atividade catalítica.

2.6 LIPASES COMO BIOCATALISADORES

Por definição, os catalisadores são definidos como as substâncias capazes de acelerar a velocidade de processamento de uma determinada reação, sem sofrer alterações, ou seja, não é consumido durante o processo. Por sua vez, os biocatalisadores são catalisadores biológicos e biodegradáveis. Essas reações acontecem de forma mais rápida, pois os catalisadores aumentam a velocidade de reação e encontram um caminho reacional com menor energia de ativação (SKOOG, et al., 2014). Podemos citar, como exemplo, a reação de hidrólise enzimática do TAG, na qual as enzimas agem como biocatalisador e têm o papel de diminuir a energia de ativação na conversão em MAG e DAG.

A lipase, que é uma enzima digestiva produzida principalmente no pâncreas e tem como função quebrar a gordura da alimentação em moléculas menores, tem grande vantagem se comparada a catalisadores químicos, por ser um biocatalisador que possui especificidade. As catálises do processo não produzem subprodutos indesejáveis, sua toxicidade é nula, biodegradável, podendo ser manipulada em condições brandas de pressão e temperatura, diminuindo os custos do processo

quando comparado a catalisadores químicos. As lipases são enantiosseletivas e regioseletivas (SKOOG, et al., 2014; JUNIOR, 2017).

Na catálise química de conversão de TAG em MAG e DAG, é necessário o uso de elevadas temperaturas, conseqüentemente, formam-se subprodutos indesejáveis e contaminantes, diferentemente do que ocorre com o uso de biocatalisadores, esse processo demanda um alto custo para a realização do processo (JUNIOR, 2018). No trabalho de Webb (1992), o autor relata que a codificação e a classificação das enzimas estão em concordância com a catalise que são promovidas por elas, como relatado em seu livro de recomendações do *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB).

Entre os procedimentos que possuem um interesse maior, evidencia-se a interesterificação e síntese de lipídeos por meio das lipases, por estas enzimas se manterem estáveis em solventes orgânicos, conversão excelente de reagente em produto, extensa especificidade pelo substrato (CAO et al., 2016). As lipases têm preferência por cadeias carbônicas e/ou insaturações específicas. As lipases enantiosseletivas possuem a predisposição por diferenciação de enantiômeros em uma mistura racêmica de substrato. Lipases que são regioseletivas fazem a catálise do grupo funcional de moléculas de substrato. Por isso, elas são as enzimas mais utilizadas nas indústrias de alimentos, farmacêutica e oleoquímica (JUNIOR, 2018). Portanto, tem se destacado na literatura processos enzimáticos que substituam os catalisadores químicos por esses biocatalisadores (ZHONG et al., 2010; JUNIOR, 2013; RAIZER, 2015; JUNIOR, 2017; CHENG et al., 2022).

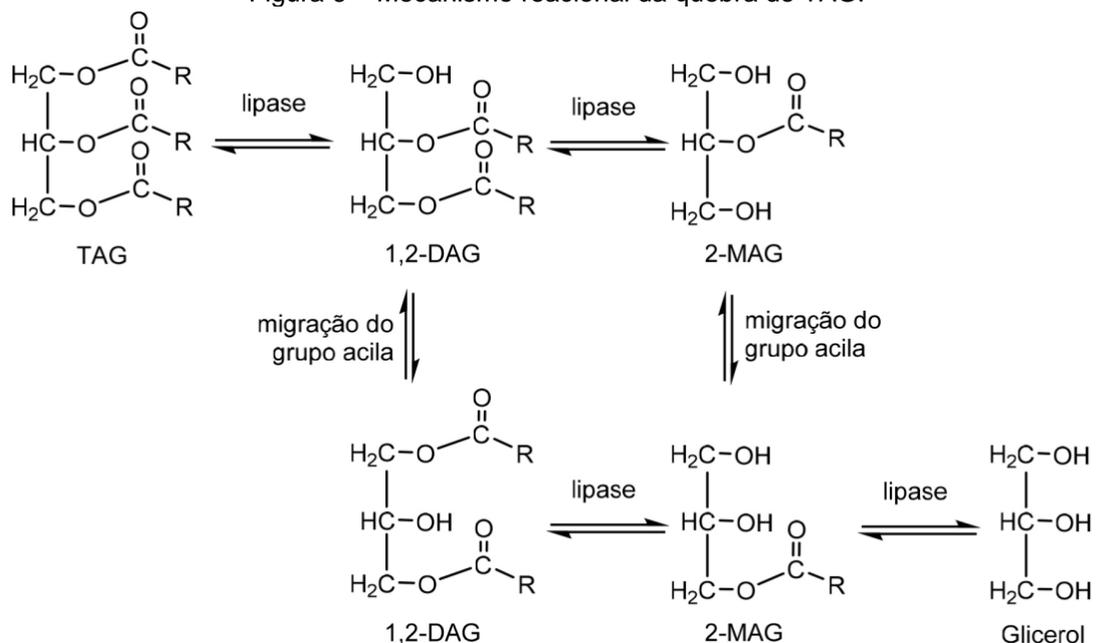
As lipases podem ser secretadas na natureza por microorganismos, tecidos vegetais e animais, sendo que, na área industrial, as mais utilizadas são as microbianas, pois estas enzimas possuem grande especificidade com relação ao substrato e propriedades catalíticas diversificadas. Organismos que são capazes de produzir lipases podem ser encontrados em vários ambientes, podemos citar resíduos de plantas e alimentos, ambiente marinho, solos com contaminação, resíduos de óleos vegetais e, com isso, a natureza tem um potencial extremo para a produção de lipases, que poderão ser reutilizadas posteriormente para novas aplicações (CORTEZ et al., 2017).

Porém, as lipases são produzidas, principalmente, por microorganismos, visto que podem ser produzidas por várias fontes, vegetal, animal, bem como microbiológica, devido a isso torna-se fácil o controle da sua produção em processos

fermentativos, reduzindo, assim, os gastos para obtenção (GOLANI et al., 2016). As lipases estão sendo utilizadas como catalisadores nas reações de hidrólise várias fontes de TAG, como, por exemplo, a andiroba, girassol, oliva e até mesmo casca de coco verde (CABRAL, 2014; ARAÚJO, 2016; SILVA, 2017b). Desse modo, as lipases melhoram a qualidade palatável dos alimentos, possuem elevada especificidade na síntese orgânica, são capazes de alterar compostos estáveis em solventes orgânicos e são independentes em relação a cofatores. Devido a todos esses benefícios, as indústrias de lipases estão em crescimento no mercado e, como consequência, estão desenvolvendo novas tecnologias para a área industrial (YEOH et al., 2009).

A massa molecular das lipases pode variar de acordo com a sua origem (19 a 45 kDa). Essas enzimas atuam em uma faixa de pH entre 4,0 a 9,0, com temperatura variando até 70 °C. A ativação interfacial é presente na maioria das lipases, o ambiente dielétrico é modificado quando se tem a presença de um grande volume de agregado lipídico, com isso os resíduos cheios de proteína relacionam-se com o substrato lipídico fortemente e menos com a água (CORTEZ et al., 2017). O mecanismo reacional das lipases atua em acelerar a quebra do TAG e síntese de novos grupos funcionais, especificamente os MAG e DAG (CORTEZ et al., 2017). Esse mecanismo pode ser observado na Figura 06.

Figura 6 – Mecanismo reacional da quebra de TAG.



Fonte: Adaptado de Li et al. (2010).

Existem vários tipos de lipases comerciais e cada uma com uma atividade específica. Dentre elas destacam-se as lipases Lipozyme RM IM, TL IM, TL 100L, Novozym 435 (SANTIN et al., 2015). Assim, para cada aplicação, é necessário realizar estudos para encontrar as condições que favorecem sua performance bioquímica. Estão presentes nas indústrias farmacêuticas, alimentícia, automobilística e indústria química.

Nas indústrias, as lipases são empregadas em larga escala, como aditivo em detergentes. Para aprimorar a detergência, combina-se mais de um tipo de enzima, dentre elas celulasas, amilases e proteases. O comércio gira em torno de 450 milhões de dólares ao ano com a utilização destes biocatalisadores para aplicação de detergentes. Por serem biodegradáveis, não produzem resíduos nocivos, com isso o impacto ambiental é baixo. Sua aplicação é bastante vasta, como por exemplo para tratamento de efluentes, degradação de óleos e gorduras, síntese farmacêutica, análises laboratoriais, indústrias alimentícias, entre outras aplicações que podem ser observadas na Tabela 02 (FREIRE; CASTILHO, 2008; ISLAM et al., 2016).

Tabela 2 – Relação de setores, aplicações e produtos obtidos por lipases.

INDÚSTRIA	APLICAÇÃO	PRODUTO
Alimentício	Processamento de carnes e peixes; Transesterificação de óleos; Melhorar aroma e remover excesso de gorduras; Síntese de ésteres; Hidrólise da gordura do leite.	Produtos embutidos; Manteiga de cacau; Maionese, molhos e cremes; Ésteres e emulsificantes; Agentes aromatizantes; para produtos lácticos.
Químico	Transesterificação de óleos vegetais Síntese de ésteres.	Biodiesel; Ésteres.
Médico	Dosagem de triglicerídeos no sangue.	Kit diagnóstico.
Cosmético	Remoção de lipídeos, hidratação e clareamento de manchas.	Cosméticos em geral.

Fonte: Adaptado de Freire e Castilho (2008).

Um parâmetro que tem grande importância e deve ser analisado é a atividade enzimática de hidrólise, que faz o monitoramento da enzima em ação em determinada reação. Pode-se realizar a titulação em NaOH da amostra em um sistema emulsionado para se determinar a atividade enzimática, método realizado neste trabalho.

Outra maneira para determinar é pela quantificação do produto em tempos de reação diferentes, por meio da colorimetria, faz-se análise cinética em tempo pré-

determinado, em que, para indicar a atividade, utiliza-se adição de iodo como indicador. Uma unidade (1U) de atividade enzimática é a quantidade de enzima que desencadeia uma reação de hidrólise do substrato liberando formação de um micromol de produto por minuto (JONSSON et al., 2007; MOURA et al., 2007; FERREIRA et al., 2013).

2.6.1 Estado da arte

2.6.1.1 Estado da arte quanto as pesquisas que empregaram a lipase *Lipozyme TL 100L*

O fungo *Thermomyces lanuginosus* é responsável pela síntese da enzima Lipozyme TL 100L (Novozymes), que é uma lipase 1,3 específica, seu acondicionamento deve ser feito a 0-10°C e obtém seu ponto ótimo de reação abaixo de 50°C e acima de 20°C, a faixa de pH em que atua é de 7 a 10, com atividade de 100 KLUg⁻¹, líquida, possui eficiência em reações de catálise, interesterificação, transesterificação e reações de hidrólise em geral (STREM, 2017). Na Tabela 03, pode-se observar os estudos mais recentes que envolvem a reação de glicerólise, tal qual suas condições ótimas de processo.

Tabela 3 – Estudos com a *Lipozyme TL 100L* e condições ótimas.

PESQUISA	CONDIÇÕES DE PROCESSO	REFERÊNCIA
Explorando as características estruturais e catalíticas de enzimas lipase imobilizadas em g-C ₃ N ₄ : Uma nova plataforma para reações biocatalíticas e fotocatalíticas.	Imobilizada no polímero g-C ₃ N ₄ por imobilização covalente; Imobilização de 79,4% a 91,7%.	SIMSEK, SALOGLU, 2021.
Esterificação e transesterificação simultâneas de óleo de semente de fênix residual com alto teor de ácidos graxos livres usando um catalisador de lipase livre para preparar biodiesel.	Enzima não imobilizada; Fator de conversão de biodiesel 93,8% ± 0.5%.	ZHOU et al., 2021.
Modificação estrutural enzimática de monogalactosildiacilgliceróis para potencial modulação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo.	Imobilizada no polímero Lewatit VP OC 1600; Imobilização por adsorção e ligação covalente; Fator de conversão do composto em análise de 27,1 a 54,6%;	ROH et al., 2022.
Estudo cinético da glicerólise de azeite de oliva catalisada por lipase líquida usando <i>Lipozyme TL 100L</i> .	Enzima não imobilizada; Fator de conversão de TAG em MAG e DAG de 98%; trabalhadas em 35°C, 7.5 vol% e 2h de reação;	FINCO et al., 2022.
Produção enzimática de biodiesel a partir de óleo de alperujo em CO ₂ supercrítico.	Enzima não imobilizada; Fator de conversão de biodiesel superior a 96%; variou o tempo de reação de 1h a 24h.	QUINTANA-GÓMEZ et al., 2021.

Fonte: O autor.

Verifica-se, através de revisão da literatura apresentada pela Tabela 03, que o interesse pela aplicabilidade da *Lipozyme TL 100L* é grande, visto que essa enzima apresenta elevados valores de conversão nas mais diversas reações enzimáticas, conforme apresentado. Diante disso, nota-se que um estudo aprofundado sobre esse biocatalisador é importante para monitorar e avaliar as condições de processo no objetivo de otimizá-las para que possa ser aplicada em mais áreas de interesse. Isto posto, o presente estudo visa compreender as variáveis de processo para que a reprodutibilidade das técnicas aqui empregadas sejam úteis em pesquisas futuras.

2.7 MICROEMULSÕES COMBINADAS A LIPASES

As reações que envolvem óleo e água, que ocorrem na presença de biocatalisadores, podem ser favorecidas quando na presença de microemulsões. A área interfacial do sistema micelar é maior se comparado ao substrato sozinho (sem surfactante e a água), permitindo, assim, a ação da lipase sobre as moléculas de ésteres e ácidos graxos presentes. Com isso, aumenta-se a área para que ocorra um número maior de ligações “chaves-fechaduras” para ocorrer a catálise mais rapidamente. Aliás, sistemas micelares têm a capacidade de dissolver compostos

hidrofóbicos e hidrofílicos em concentrações variadas, permitindo a interação de ambas as polaridades, isso se deve à estrutura dos TAG ser com cadeia apolar e ponta polar (MORE et al., 2017).

Reações com elevados rendimentos são obtidos, pois se altera o equilíbrio termodinâmico das reações de catálise, transferindo para que se forme produtos com ajustamento da quantidade de água no sistema. Pode ocorrer a alteração natural das constantes de equilíbrio das reações enzimáticas com a utilização de sistemas reversos e podem ser utilizados sistemas micelares reversos, com reações catalisadas por várias enzimas (DJEKIC; PRIMORAC, 2008).

Freqüentemente, devido à ambientação térmica, as lipases necessitam de uma ativação interfacial para aprimorar sua atividade catalítica, como a maioria das enzimas. Há diversas hipóteses em relação ao que seria essa ativação enzimática, uma das mais aceitas é a de que uma mudança ocorre de forma induzida pela interface da micela, com isso ocorre o encaixe perfeito entre o sistema micelar e a enzima, o papel da enzima é atuar no papel catalítico. Estas hipóteses são feitas tendo como base experimentos realizados, tratando-se de um composto novo, as hipóteses são fundamentais para sabermos qual será o comportamento enzimático colocando-as a prova para serem testadas, um exemplo são os testes em temperatura ambiente que foi aplicada no trabalho e a ativação por estufa em enzimas no estado sólido (ZAAK et al., 2017).

2.8 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Os estudos de imobilização enzimática começaram no início do século passado, ao analisar uma solução biológica com atividade invertásica, usando carvão ativado como suporte, que, após a lavagem da amostra, a solução mantinha suas propriedades de hidrolisar sacarose (NELSON; GRIFFIN, 1916; CASTRO et. al., 2004). Os estudos sobre imobilização enzimática tiveram um aumento significativo na década de 1960 e, em 1971, ocorreu a primeira conferência em Engenharia Enzimática e estabeleceu-se a terminologia de enzima imobilizada nas amostras com biocatalisadores interligados, química ou fisicamente, a suportes insolúveis ou em espaços físicos delimitados (BON; PEREIRA, 1999).

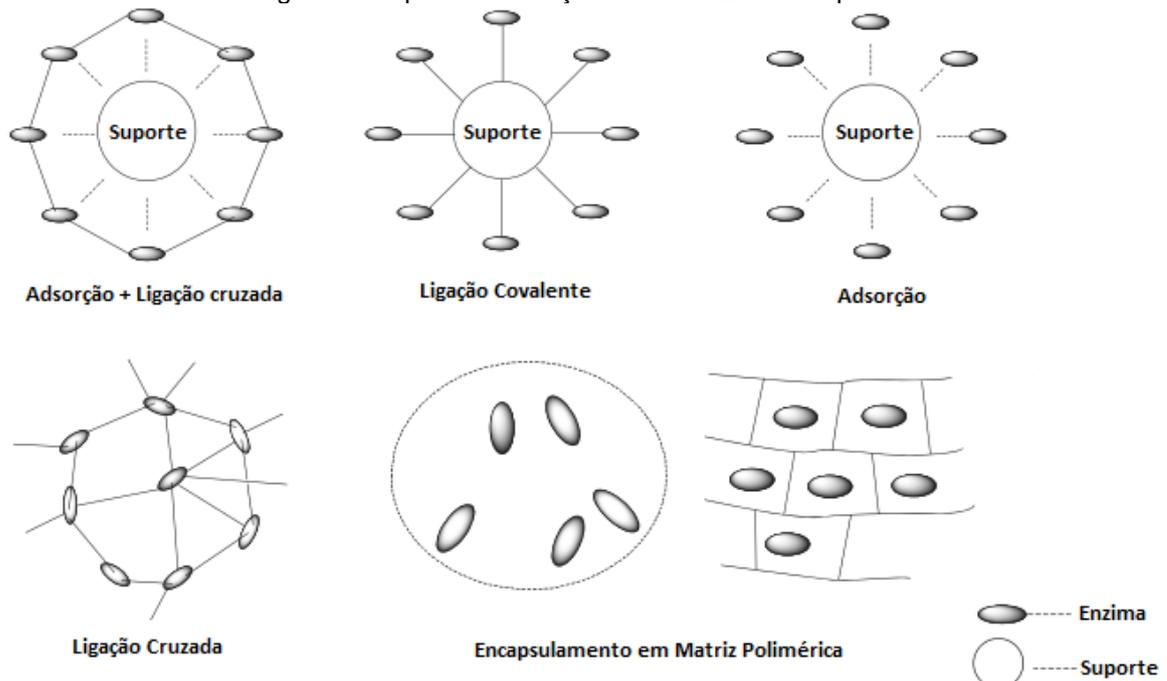
Um fator interessante da imobilização refere-se à possibilidade de reutilização da enzima, monitorando a estabilidade e vida útil, além de uma possível aplicação em

aumento de escala de processo. Tais fatores corroboram para a diminuição de custos e a obtenção de produtos puros (SINHA et al., 2012; TERRASAN et al., 2019). Tal processo consiste em reter a enzima em um suporte, ou nos poros ou na superfície e, após a reação, forma-se um complexo que mantém as características físicas e atividade biológica da enzima (MATOS et al., 2011; CAI et al., 2016). Isso acontece devido às ligações de hidrogênio e às formações dos complexos na superfície do material, que também levam ao aumento da estabilidade térmica, pela dificuldade de vibração da enzima. Além de que, no microambiente formado na superfície do suporte, pode ocorrer a mudança do pH ótimo da enzima, justamente por essas alterações nas características do sistema, portanto pode-se alterar a faixa de pH que a enzima é capaz de atuar (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; REETZ, 2002).

Para que ocorra a imobilização, deve-se levar em consideração os tipos de interações existentes entre suporte e enzima. Dentre os métodos, envolve-se tanto processos físicos (adsorção) quanto químicos (DATTA et al., 2013). Os métodos de adsorção têm como princípio as interações não covalentes ou retenção mecânica, como microencapsulação entre as partes do sistema (BABICZ et al., 2010). Enquanto isso, nos métodos químicos, formam-se ligações covalentes ou ligações cruzadas entre enzima e suporte. A ligação cruzada acontece quando há a utilização de um agente de ligação em que uma enzima se liga a outra, promovendo a autoreticulação das enzimas (VILLENUEVE et al., 2000; MATEO et al., 2007).

Ressalta-se que, em cada pesquisa, deve-se levar em consideração as condições do processo para aumentar a estabilidade do sistema, no intuito de buscar a maior conversão possível da reação, visto que não há um método universal de imobilização em que o procedimento se aplique de forma eficaz para qualquer sistema enzimático (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; MOHAMED et al., 2015). Nesse contexto, é importante analisar qual é o tipo de adsorção a ser empregada no sistema, de acordo com a natureza da interação enzima-suporte, visando a maior eficácia e estabilidade do sistema (Figura 07).

Figura 7 – Tipos de interações entre enzima e suporte.



Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2012).

2.9 ADSORÇÃO FÍSICA

A adsorção física é a forma de imobilização mais comum e de ampla aplicação, pois é feita pelo simples contato entre enzima e suporte, além de obter uma eficácia de conversão bastante elevada, cumprindo sua função de formar um microsistema reacionário (BORNSCHEUER, 2003; TERRASAN et al., 2019). O processo consiste na escolha de um suporte sólido, poroso e inerte, em que a enzima a ser imobilizada é adsorvida na superfície e/ou nos poros do suporte, por meio das baixas energias de ligação. Essas energias referem-se às interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo, *Van der Waals* e até mesmo interações eletrostáticas (VILLENEUVE et al., 2000; DATTA et al., 2013). Os parâmetros a serem considerados na adsorção física são a área superficial de contato entre enzima e suporte, as propriedades morfológicas, a temperatura do meio e o pH do meio (POPPE et al., 2015).

Ao analisar a literatura, as lipases tendem adquirir uma conformação aberta ao sofrer ativação interfacial. Logo, quando ocorre o processo de imobilização em suportes hidrofóbicos, muito provavelmente assume-se essa conformação de forma ativa. Tal informação é importante, já que a estabilização das moléculas de lipase em conformação aberta acarreta uma espécie de hiperativação do sistema e, por

consequência, biocatalisadores extremamente estáveis e com uma faixa maior de condições experimentais (MATEO et al., 2000; HANEFELD et al., 2009; JESIONOWSKI et al., 2014; RUEDA et al., 2016).

A adsorção física refere-se a um método que, no geral, é de boa reprodutibilidade e, se conduzido de forma coerente com as condições de processo, proporcionará a criação de um biocatalisador de alto rendimento, pois é uma técnica que não altera significativamente a estrutura tridimensional da enzima, ou seja, mantém as características da enzima e aumenta o meio reacional para que ocorra a reação em questão, como, por exemplo, reações de esterificação, glicerólises e demais métodos que podem utilizar enzimas para elevar o rendimento e diminuir os custos de reação (POPPE et al., 2015).

As principais variáveis que afetam o processo de imobilização são pH, atividade enzimática e temperatura. Elas são de suma importância, pois o controle e monitoramento dessas variáveis irão controlar a estabilidade entre a enzima *Lipozyme TL 100L* e o suporte de argila *Spectrogel tipo C* para que a reação ocorra de forma otimizada e obtenha os maiores níveis de conversão possíveis. Sabe-se que o pH e a temperatura são variáveis que podem reduzir drasticamente a sua atividade catalítica quando fora das condições ótimas do biocatalisador. Além disso, o tempo de reação também é uma variável importante e deve ser considerado na relação de fator de conversão de TAG em MAG e DAG.

Nesta pesquisa, utilizou-se a combinação da *Lipozyme TL 100L* e da argila *Spectrogel tipo C* pois ambas apresentam excelentes resultados na parte da glicerólise enzimática de forma isolada. Porém, não há referências que analisam a combinação dos dois métodos com uma fonte de TAG para avaliar a produção de MAG e DAG. Nesse contexto, o presente estudo foi feito para otimizar o método, avaliando todas as variáveis de processo a fim de encontrar as melhores condições possíveis para a realização da reação.

2.10 SUPORTES PARA AS ENZIMAS

No intuito de obter-se um biocatalisador estável, insolúvel, ativo, reutilizável e de alto rendimento, a escolha do suporte onde ocorrerá a imobilização da enzima é fundamental. Vale ressaltar que não há um suporte que seja aplicável para todas as enzimas e todas as aplicações, ou seja, depende das variáveis do processo. Assim,

devem ser feitos estudos e testes preliminares entre suporte, enzima e reação a ser promovida, além de levar em consideração os custos do processo (TALBERT; GODDARD, 2012; SANTIN et al., 2014).

Deve-se considerar a composição química e estrutura física do material a ser escolhido, pois influenciam a capacidade de adsorção, além de reter as propriedades catalíticas das enzimas, portanto afeta a estabilidade e a atividade do biocatalisador (TALBERT; GODDARD, 2012). Além disso, deve apresentar estabilidade térmica e física, ter afinidade em proteínas, ser inerte, ter grupos funcionais reativos na correlação com as enzimas a ser adsorvidas nele, para que haja as reações químicas desejadas e possibilidade de reutilização do sistema (VILLENUEVE et al., 2000; HANEFELD et al., 2009; PALLA et al., 2011; TALBERT; GODDARD, 2012).

Os suportes são subdivididos em naturais sintéticos, hidrofóbicos, hidrofílicos, inorgânicos, orgânicos e híbridos. Destaca-se a utilização dos orgânicos e inorgânicos sintéticos que são amplamente empregados na imobilização de lipases (JUN et al., 2013). Alguns exemplos desses suportes que são empregados na literatura são: sílica, alumina, terra diatomácea, filmes poliméricos, polímeros hidrofóbicos, biopolímeros (celulose e quitosana), resinas, silicatos mesoporosos, argilas modificadas e, mais recentemente, materiais híbridos nanoestruturados e nanopartículas magnéticas, dentre outros (SALIS et al., 2009; BARBOSA et al., 2011; KAMEL et al., 2011; NETTO et al., 2013; DONG et al., 2014; SANTIN et al., 2017).

A aplicação desses suportes é válida, pois evita a inibição da enzima em relação a fatores externos, além de possibilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador para utilização futura, proporciona reações contínuas do sistema. Também têm por características melhorar a estabilidade física e térmica do sistema reacional, contudo, se a concentração de enzima variar no decorrer dos testes, essas propriedades passam a ter efeito negativo, com redução de estabilidade e, por consequência, redução da atividade de catálise e reacionária (FORESTI; FERREIRA, 2007).

2.10.1 Argila como suportes de biocatalisadores

Por definição, a argila é caracterizada por uma rocha com altos índices de partículas, também chamados cristais, com diâmetro de até 2 μm (COELHO et al., 2007). Apresentam áreas específicas acima de 1 m^2g^{-1} e encontra-se na natureza,

normalmente, em estado sólido (OLIVEIRA et al., 2017). Normalmente, ela tem, em sua composição, argilominerais e derivados, como a calcita, gipsita, aluminita, pirita, quartzo, dolomita e matéria orgânica, e dispõe da capacidade de troca de cátions na casa de 3 a 150 mEq/100g de argila (VILLENUEVE et al., 2000).

As estruturas cristalinas acima citadas são geradas por camadas tetraédricas de silício e octaédricas de alumínio, cujos vértices encontram-se átomos (ou íons) de oxigênio e íons hidroxila, que estão ao redor de pequenos cátions. Esses cátions apresentam certo grau de substituição isomórfica, que acarretam excesso de cargas elétricas negativas na superfície das argilas (MAIA, 2019). Tais conformações serão detalhadas mais adiante.

A classificação dos tipos de argila dá-se pelas semelhanças na composição estrutural cristalina e química de cada um. Sabe-se que existem, aproximadamente, 40 variações de argilominerais, com propriedades específicas e particulares que, conforme sua aplicabilidade, varia nos valores agregados, tanto em termos de obtenção quanto de produto (COELHO et al., 2007).

Apresentam características hidrofílicas, na maior parte dos casos, conseqüentemente facilita o seu uso como adsorvente em materiais hidrofílicos, polares e espécies orgânicas com cargas positivas. Todavia, nas condições adversas de reação, impede-se seu uso como adsorvente, fazendo-se necessário uma modificação química do meio para utilização de um surfactante catiônico que modificará as propriedades inorgânicas do material e possibilitando a adsorção do meio reacional com a argila. O exemplo citado de um surfactante é característico, visto que promove a troca iônica com os cátions inorgânicos e altera a natureza química do material, no caso hipotético, hidrofóbico para hidrofílico, e, assim, aperfeiçoa o meio para que aconteça a reação (OLIVEIRA et al., 2017).

2.10.2 Argila Comercial *Spectrogel tipo C*

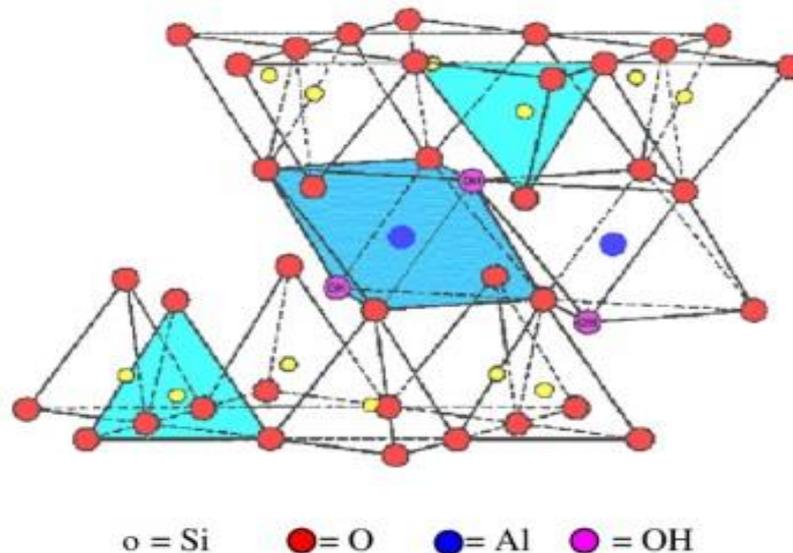
Uma das argilas de vasta aplicação como adsorvente, tanto como suporte em lipases e quanto em remoção de metais em reações de purificação, seria a variedade organofílica comercial *Spectrogel tipo C*. Ela apresenta alta afinidade por compostos orgânicos e é empregada, até mesmo, na remoção de compostos orgânicos derivados de petróleo (MAIA, 2019). A adsorção das argilas do tipo II, como a *Spectrogel tipo C*, caracteriza-se por uma metodologia bastante complexa, já que apresenta uma área

específica e volume de poros relativamente pequenos que se expandem na presença de água livre (ZHU et al., 2015).

A *Spectrogel* é uma argila comercial do tipo das bentonitas. Tal nome foi concedido pela primeira vez na descoberta de Fort Benton, Wyoming-EUA (DARLEY; GRAY, 1988). Isso em razão da bentonita ser caracterizada como uma rocha formada por um argilomineral montmorilônico (esmerítico), derivado de um hidrosilicato de alumínio, constituído na descaracterização de um processo de vitrificação e seguida de uma alteração química do material vítreo supracitado. Tem origem a partir da combustão de um tufo, ou cinza vulcânica, em um ambiente alcalino e controlado em função de quantidade de água disponível no meio, com uma variação de cores abrangente, pela quantidade de água disposta, que varia nas tonalidades verde, vermelha, amarela, creme, rosácea, chocolate e cinza (ROSS; SHANNON, 1926; SILVA; FERREIRA, 2008).

As bentonitas têm na sua composição alto teor (aproximadamente 80%) de esmectitas (montmorilonita), possuem fórmula geral regida sob $M_x (Al_{4-x}Mg_x) Si_8O_{20} (OH)_4$, com partículas que variam em tamanho de 2 μm a 0,1 μm , no formato de lâminas/placas. Presente no grupo dos filossilicatos, suas placas estão condicionadas por estruturas compostas por folhas tetraédricas de sílica juntamente com uma folha central octaédrica constituídas de alumina e unidas entre si por átomos de oxigênio entre ambas as folhas, conforme demonstrada na Figura 08 (PAIVA et al., 2008a).

Figura 8 – Estrutura da Montmorilonita, principal componente das bentonitas.



Fonte: Adaptado de Bhattacharyya e Gupta (2008).

Analisando a Figura 08, percebe-se que o empilhamento entre as lâminas é conduzido por meio das forças polares, que são relativamente fracas, e pelas interações de *Van Der Waals*. Nota-se que, entre as lacunas, há a presença de galerias ou camadas intermediárias, que apresentam cátions livres trocáveis, como Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , que estão fixos eletrostaticamente e no objetivo de neutralizar as cargas negativas geradas por meio de substituições isomórficas que acontecem no reticulado, como, por exemplo, Al^{3+} por Mg^{2+} ou Fe^{2+} , ou Mg^{2+} por Li^+ . Ressalva-se que aproximadamente 80% dos cátions livres trocáveis na estrutura da montmorilonita estão presentes nas camadas subsequentes e cerca de 20% se encontram nas superfícies laterais da estrutura (PAIVA et al., 2008a).

Nessa vertente, a bentonita pode ser sódica, policatiônica ou cálcica, mas, quando caracterizada como sódica, expõe traço físico muito peculiar e é capaz de expandir seu volume quando em contato com a água, assim, gera géis tixotrópicos (DANTAS et al., 1984; SILVA; FERREIRA, 2008). Em termos de reação, as bentonitas em forma natural, sem tratamento prévio, dispõem carga negativa superficial, descrita como carga superficial negativa, que é a capacidade de trocar cátions relativamente elevados, tal qual sua área específica e propriedades de interpolação/intercalação com outros componentes por meio das camadas e dificuldade na interação com solventes e resistência a temperatura (SILVA; FERREIRA, 2008).

Consequentemente, são características de materiais muito importantes para reações industriais, já que são encontrados em abundância na natureza, abrangendo, assim, baixo custo de obtenção. E, em sua forma estrutural, apresentam características, geralmente, hidrofílicas e eficientes em adsorção de compostos orgânicos e inorgânicos, mediante tratamento prévio do meio reacional. Então, quando submetidas a tratamentos químicos prévios, como os sais quaternários, passam a apresentar características hidrofóbicas e organofílicas quando necessário. E, por causa desse caráter organofílico, tais argilas modificadas estão apresentando cada vez mais estudos priorizando o seu uso na adsorção e contenção de moléculas de interesse, como, por exemplo, resíduos industriais contaminantes, derivados de petróleo e até mesmo no revestimento de tanques de gasolina e de óleo em tratamentos de larga escala (BERTAGNOLLI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2014).

2.10.3 Ativação ácida das bentonitas

As argilas, normalmente, precisam de ativação química para aumentar as propriedades de adsorção. Nesse contexto, a ativação enzimática se faz necessária nos tratamentos e modificações desses argilominerais, no intuito de aperfeiçoar as condições de reação por meio de tratamentos inorgânicos conhecidos como ativação ácida (HUSSIN et al., 2011). Assim, a ativação ácida altera as estruturas cristalinas da argila e modificam a composição química e física das argilas, tornando-as um insumo de grande importância para as indústrias e pesquisas acadêmicas (PEREIRA NETO et al., 1993; FOLETTO et al., 2003).

O tratamento ácido tem como objetivo alterar os cátions livres que promovem a troca de íons H^+ e Al^{3+} , por exemplo, e demais cátions que se desprendem dos sítios tetraédricos e octaédricos, originais das estruturas das bentonitas, deixando grupos silicatos (SiO_4) intactos e propício para ligações mais estáveis. Esses se definem por sais estáveis suscetíveis a ataques ácidos e promovem redução dos teores de ferro e alumínio (BHATTACHARYYA; GUPTA, 2008; GOLE; GOGATE, 2014).

Normalmente, esse ataque gera alterações das propriedades estruturais das argilas e provoca o aumento da área específica que entrará em contato com a enzima, obtendo-se sólidos com altos níveis de porosidade e de estabilidade térmica, uma vez que esses ataques eliminam impurezas e resíduos de minerais das camadas externas, tornando o sistema mais propício a receber o biocatalisador. Essa mudança depende da combinação do ácido a ser utilizado com a composição da argila em questão, com relação aos tipos de cátions entre as camadas. Fatores como temperatura, pressão e tempo de ataque influenciam na eficácia do método e aumento do rendimento da reação (BHATTACHARYYA; GUPTA, 2008; HUSSIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Dentre os ácidos mais utilizados nesse tratamento, destacam-se o sulfúrico, clorídrico, acético, nítrico, oxálico, láctico e cítrico. Ressalva-se que os ácidos podem variar para cada aplicação a ser testada. Usualmente, trabalhos voltados à aplicação do ácido clorídrico ou sulfúrico (HCl e H_2SO_4 , respectivamente) destacam-se pela sua maior aplicabilidade e são amplamente utilizados nesses ataques de ativação ácida, pois demonstram grande compatibilidade nos parâmetros dos processos, seguidos de resultados pertinentes com relação à capacidade de adsorção (HUSSIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

2.11 ESTUDOS COM IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA *LIPOZYME TL 100L* E COM O SUPORTE *SPECTROGEL TIPO C*

Esses levantamentos foram feitos a partir dos periódicos publicados nos últimos tempos e analisando a aplicação da enzima *Lipozyme TL 100L* nas reações de catálise. Ademais, notou-se, nesses estudos, conforme Tabela 04, que a enzima é utilizada na forma livre e imobilizada e os suportes de imobilização são diversos. Ressalta-se que a combinação da *Lipozyme TL 100L* com o *Spectrogel tipo C* é inovadora e foi testada baseado no potencial individual de cada um em termos de conversão e efetividade de imobilização.

Tabela 4 – Estudos da glicerólise enzimática com diversos suportes.

TÍTULO DO ESTUDO	REAÇÃO AVALIADA	REFERÊNCIA
Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva.	Glicerólise enzimática livre com várias lipases, incluindo a <i>Lipozyme TL 100L</i> em sistema microemulsionado com o azeite de oliva como fonte de TAG.	KRUGER (2010)
Desenvolvimento de técnicas alternativas de fluídos pressurizados e ultrassom para produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva.	Glicerólise enzimática livre com várias lipases em sistema microemulsionado com o azeite de oliva como fonte de TAG.	FIAMETTI (2012)
Glicerólise enzimática livre com várias lipases em sistema microemulsionado com o azeite de oliva como fonte de tag.	Reação de esterificação para produção de biodiesel; Extração de lipases vegetais e imobilização em diversos suportes, incluindo argilas para tais reações.	VESCOVI (2012)
Uso de lipase vegetal a partir de sementes de mamona para a hidrólise enzimática de óleo de crambe.	Reação de hidrólise enzimática com lipase vegetal sem imobilização, extraída a partir do óleo de mamona e aplicada em óleo de crambe.	TAVARES (2018)
Imobilização de lipase de burkholderia cepacia em argila para aplicação na produção de ésteres etílicos.	Reação de esterificação; Testes de imobilização em diversos suportes, destacando-se excelentes conversões com a aplicação do <i>Spectrogel tipo C</i> , tanto por adsorção quanto ligação covalente.	MOLINARI (2020)
Estruturando lipídeos através da glicerólise.	Reação de glicerólise enzimática imobilizada no polímero Immobead 150, com lipases de origem vegetal.	NICHOLSON (2021)

Fonte: O autor.

No estudo de Yucel et al. (2011), a *Lipozyme TL 100L* imobilizada em uma matriz polimérica porosa, sintetizada a partir do estireno-divinilbenzeno, por adsorção e ligação covalente, foi empregada na produção de ésteres metílicos a partir do óleo de canola e obtiveram, aproximadamente, 92% de eficiência de conversão, utilizando

a adsorção e cerca de 85% de conversão na ligação covalente. Os autores consideraram que os resultados foram satisfatórios. Estudos de Zheng et al. (2018) analisaram a imobilização da mesma enzima adsorvida livre e por ligação covalente e sua aplicação em reações de esterificação metílica do óleo de soja usando como suporte a resina comercial NKA CLEA-TLL. Obtiveram elevadas taxas de conversão de ésteres (98%).

Já Matte et al. (2017) analisaram as propriedades do suporte Immobead 150 (suporte de resina) antes e depois da imobilização da *Lipozyme TL 100L*, imobilizadas por ligação covalente multiponto e adsorção. Os autores buscaram caracterizar o suporte e sua capacidade de interação com a enzima, chegando à conclusão de que o processo de imobilização não afetou a morfologia do suporte e que o mesmo pode ser reutilizado posteriormente. Neste estudo, observou-se que a interação do suporte tanto nos métodos de imobilização física (adsorção) quanto quimicamente (ligação covalente) não alterou significativamente a estrutura do biocatalisador. Obtiveram métodos eficazes de imobilização e rendimentos de 68% para o método de ligação covalente e 70% para o método de adsorção.

Segundo Molinari et al. (2018), as características físicas e morfológicas o *Spectrogel tipo C* fazem dele um excelente suporte para adsorção de enzimas e, segundo o trabalho, os autores obtiveram rendimento elevados de imobilização em termos de atividade enzimática, demonstrando que não é necessária a utilização de uma quantidade elevada de enzima para ter-se um método eficiente por adsorção. Os autores avaliaram a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* no suporte *Spectrogel tipo C* com foco na produção de ésteres metílicos, a qual será a presente pesquisa, com avaliação de uma possível aplicação para biocatalisador.

Lopes (2006) investigou o emprego de diferentes tipos suportes (argila Tonsil Terrana 580 FF, *Spectrogel tipo C* e PB e sílica amorfa Dioxil-RH) na imobilização de vários compostos, como corante do repolho roxo e lipases vegetais. O autor analisou temperatura, tempo, tipo de suporte, rotação e massa de polímero e nos traz que houve uma fixação homogênea da argila em sua superfície e a espessura da camada após o processo de adsorção e dessorção num regime em batelada, mostrando uma redução em torno de 50%. A adsorção, na qual se observa o quão “presa” a enzima fica ao suporte, tanto o *Spectrogel PB* quando *tipo C* são ótimas alternativas para reações que envolvem enzimas, pois sua fixação é extremamente elevada, tornando-se, assim, suportes com excelente potencial para imobilização de lipases.

2.12 GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS

A reação de glicerólise é utilizada para produzir MAG e DAG a partir da esterificação de glicerol com os TAG. Combina-se com o glicerol para a aplicação dos três ácidos graxos pelas três hidroxilas presentes na estrutura do mesmo (JUNIOR, 2013). As prováveis reações entre TAG, DAG, MAG, AGL e glicerol que envolve a ação de glicerólise enzimática são reações de I até VI.



As reações (I até VI) apresentadas anteriormente indicam que um mol de TAG reage com um mol de glicerol, formando, assim, um mol de MAG mais um mol de DAG (1); na reação (2), mostra a reação de um mol de DAG com glicerol que convertem a dois mols de DAG. Sendo DAG o produto de interesse e fazendo com que um mol de TAG reaja com um mol de MAG, forma-se, assim, dois mols de DAG (3). As reações seguintes nos mostram que existe a possibilidade de uso de excesso de alguns dos reagentes para favorecer a reação de interesse (KRISTENSEN et al., 2005).

A não utilização de catalisadores para a glicólise de TAG faz com que o rendimento seja baixo, sendo possível obter cerca de 30% a 50% de conversão de DAG e MAG com tempo de reação de, em média, uma semana, com isso não se torna compensatória para as indústrias. Como nem todas as reações diretas são tão favoráveis, isto é, apresentam baixos valores da constante de equilíbrio, assim as reações inversas acabam prevalecendo (formação de reagentes). Uma maneira de se evitar este inconveniente é o uso de estratégias que deslocam tal equilíbrio para o lado oposto da reação, como o uso de emulsificantes para produzir micelas reversas (KAZLAUKAS; BORNSCHEUER, 1998).

Bôas, Teixeira e Castro (2014), em seu trabalho, verificaram a razão molar de um TAG para controlar a produção de MAG em um sistema contínuo com um reator de leito fixo por um tempo de 10 dias, empacotado com lipase de *Burkholderia cepacia*

imobilizada em sílica-PVA, a 50°C, usando cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CGMS) para analisar a concentração de produto na saída do reator. Os autores usaram sistemas com razão molar de 1:3, 1:6, 1:9 e 1:12 e obtiveram a maior conversão de MAG: 33% de rendimento na razão molar 1:9. Deve-se ressaltar que esse rendimento ainda pode ser considerado baixo quando comparado aos resultados obtidos na produção de DAG, na faixa de 23,1%, utilizando biocatalisadores.

Muitos estudos são reportados na literatura e evidenciam a eficiência dos métodos que utilizam a reação de glicerólise de gorduras e óleos catalisada por lipases, podendo, assim, ser uma alternativa comercial e industrial na produção de MAG e DAG. A principal vantagem dessa rota de produção é a redução da energia e resíduos indesejados (HU et al., 2013; BLANCO, 2015; LAN et al., 2015; NITBANI et al., 2020).

Na reação de glicerólise, inicialmente, a molécula de glicerol se liga às enzimas formando um complexo, o que dificulta a interação entre o óleo e a enzima. Com isso, a reação tem certa diminuição em sua eficiência, visto que o glicerol faz com que ocorra a inibição da enzima, agindo no mesmo sítio ativo. Sendo assim, ao se impedir a interação, é necessário adicionar o glicerol no meio em quantidade menor, restringir a sua massa ou fazer a utilização de um solvente, fazendo com que o glicerol provoque homogeneização do meio (YANG et al., 2005; CHEW et al., 2008).

Para que ocorra a glicerólise enzimática, há duas condições. A primeira é de que tenha a interação óleo/glicerol e, em segundo, deve ocorrer a adsorção da enzima no sistema do biorreator. Logo, a interface sendo maior a quantidade de enzimas absorvidas será superior, com isso a energia de ativação será inferior e a velocidade da reação elevada (BALCÃO; MALCATA, 1998). Para isso, utilizam-se micelas para aumentar a área de contato entre as enzimas e o substrato. Em solventes apolares, as micelas promovem maior miscibilidade do glicerol, isso ocorre devido às características físico-químicas do complexo micelar e da interação com a área superficial onde acontece a quebra dos TAG e a formação dos DAG e MAG (MARTÍNEZ et al., 2018).

Esse processo enzimático é limpo e seguro, pois são utilizados biocatalisadores como reagentes do processo. A utilização dessa técnica apresenta baixos níveis de toxicidade e os resíduos podem ser descartados sem tratamento prévio. Desse modo, os produtos obtidos das reações de glicerólise enzimática, geram impurezas de

descarte fácil. Os solventes empregados na reação e os biocatalisadores removidos do processo, também possuem baixo impacto ambiental (PERKINS et al., 2016; CORTEZ et al., 2017).

Apesar disso, para a produção de MAG e DAG em via enzimática, buscam-se alternativas diferentes, como também técnicas que aperfeiçoem o processo todo, desde desenvolvimento de imobilizar a enzima no sistema micelar, fontes novas de enzimas, condições ideais de temperatura dos reagentes, aplicação de co-surfactantes e surfactantes que ampliem a miscibilidade dos reagentes, para aumentar o rendimento da reação (SANTOS, 2011; TITUS et al., 2015).

Na literatura, há diversos trabalhos que diversificam as condições enzimáticas de processo com a presença, ou não, dos solventes orgânicos para a produção de MAG em substratos diversos. Podemos citar, como exemplo, o trabalho de Tu et al. (2017), que avaliaram a glicerólise enzimática, como solvente o ácido sulfúrico e ácidos graxos como resíduo de qualidade baixa. A produção de MAG e DAG obtida foi de 30 a 60% de eficiência, respectivamente. Porém, ocorreu a diminuição de resíduos tóxicos (produtos químicos perigosos, como H_2SO_4 e metanol) durante o processo de glicerólise, o que se deve ao aumento da área interfacial de contato entre substrato e enzima e pode-se notar um declínio drástico em relação aos volumes de metanol e ácido sulfúrico que foram utilizados na reação convencional.

Vários estudos têm avaliado diferentes fontes para alterar estruturas de gorduras e óleos, com o propósito de obter compostos mais simples, com menor grau de toxicidade e com maior valor agregado, podendo, assim, ser aplicado em outros setores. Nesse caminho, associam-se estudos com enzimas dispersas em reação e estática em diversos suportes, dentre eles, encapsulamento e microencapsulamento em superfícies sólidas por adsorção física, covalente ou iônica e por ligação cruzada. O que importa é que esse suporte seja imóvel, estável fisicamente e que tenha superfície disponível para a enzima e tenha baixo custo (TACIN et al., 2014).

2.13 DETERMINAÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO

A cinética de qualquer reação pode ser alterada de acordo com a estabilidade do meio e, portanto, alterações no processo alteram a velocidade da reação. Os métodos que podem ser aplicados para determinar a ordem de reação são: determinação das velocidades iniciais, Burk-Plot, análise de Michaelis – Menten,

Haldane – Briggs e Ping-Pong Bi-Bi (PUNEKAR, 2018; PALFEY; SWITZER, 2022). A determinação das velocidades iniciais é o método mais utilizado e é muito confiável para estabelecer a ordem de reação do processo. Em diferentes quantidades de substratos e enzimas, é realizada a glicerólise enzimática, podendo, assim, determinar a velocidade da reação (v_0) para cada ensaio, por meio da diferença numérica da curva de decaimento representada em um gráfico de concentração do substrato em função do tempo (CABRAL, 2014).

Para a eficiência do método, todas as variáveis têm que ser constantes e mantidas no processo, a partir do momento em que a catálise se iniciou, não poderá ser alterada a quantidade de reagente utilizado. Essa técnica tem por objetivo não deixar que ocorra interferências de reações paralelas e, com isso, pode-se determinar a ordem da reação (zero, primeira ou segunda), focando em uma única variável (LEVENSPIEL, 2000).

Nesse caso, se a concentração (C) for maior do que o valor unitário, a reação tende a ser de ordem zero. Em contrapartida, se a reação for menor que um, verificam-se características de cinética de primeira ordem (SOUZA; FARIAS, 2008; SCHMAL, 2010). Contudo, existem as reações de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem, que são relações entre as reações de primeira ordem e de segunda ordens. Essas podem ser encontradas pelos seus coeficientes de determinação (SAUER, 2002).

2.14 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Como fundamentado até o momento, a produção de MAG e DAG em rotas comerciais são de grande importância pela aplicabilidade nas indústrias químicas, farmacêuticas, automobilísticas e alimentícia. Nesse sentido, traçar uma rota alternativa para a produção desses compostos é fundamental, sempre se baseando no fator de conversão de TAG e custos envolvidos no processo. Normalmente, emprega-se uma rota enzimática que eleva as taxas de conversão em temperaturas baixas e pressão ambiente, além de empregar um biocatalisador. Para tal, a escolha da enzima é de extrema importância, além de otimizar as condições de reação para obter os maiores resultados possíveis.

Vários estudos com a *Lipozyme TL 100L* utilizando óleos e gorduras como fonte de TAG nas reações de esterificação se mostraram com grande atividade catalítica. O uso de surfactantes e co-surfactantes é essencial para acelerar a reação

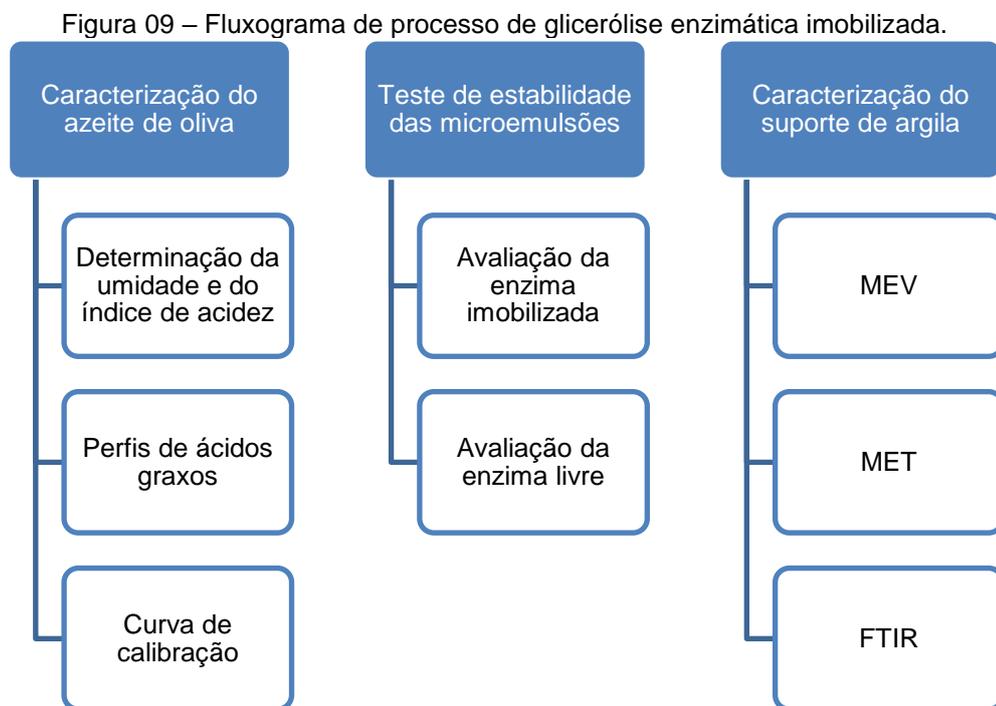
e aumentar a área superficial de contato entre a enzima e os substratos da reação. A aplicação do método em escala industrial requer avaliação da possibilidade de reutilização do biocatalisador e separação do meio reacional após a reação requerem estudos de imobilização da enzima.

Nota-se que, analisando a *Web of Science* e a plataforma *Scopus*, não se encontrou nenhum estudo voltado à reação de glicerólise enzimática que combine a aplicação da enzima *Lipozyme TL 100L*, como biocatalisador, adsorvida do suporte de argila *Spectrogel tipo C*, ou seja, refere-se a uma pesquisa inovadora e que se pode trazer descobertas interessantes na combinação e aplicação de ambos os compostos para a conversão de TAG em MAG e DAG por meio da glicerólise enzimática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

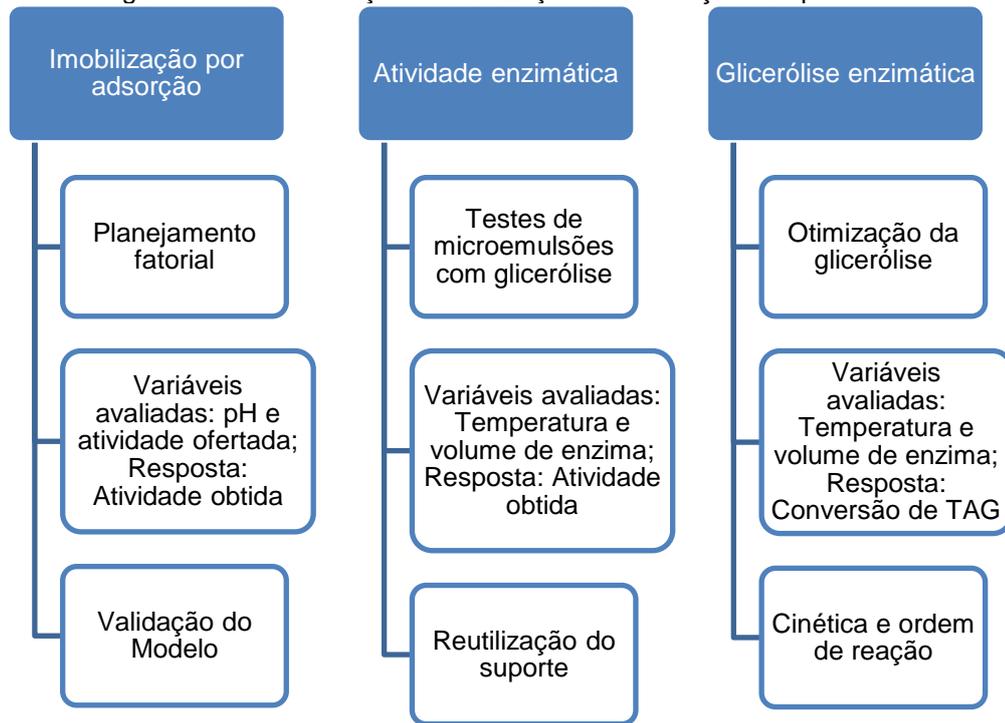
Os tópicos apresentados nesta seção descrevem as atividades e procedimentos experimentais realizados no decorrer desta pesquisa, com vistas a alcançar os objetivos específicos definidos na tese de doutorado. São apresentadas as técnicas adotadas para imobilização da enzima, síntese de MAG e DAG por glicerólise enzimática imobilizada, assim como os materiais, equipamentos, reagentes e demais aparatos utilizados para a realização desta pesquisa, sendo, também, apresentada a metodologia para síntese e avaliação quantitativa e qualitativa dos produtos da glicerólise enzimática.

As amostras e reações foram preparadas e realizadas em conjunto na Unioeste *Campus Cascavel* e UTFPR *Campus Medianeira* e a quantificação via leitura em CLAE na UTFPR *Campus Medianeira*. Nas Figuras 09 e 10, são apresentados dois fluxogramas das principais análises e ensaios realizados no desenvolvimento deste trabalho.



Fonte: O autor.

Figura 10 – Quantificações e otimização das condições de processo.



Fonte: O autor.

3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

A base da catálise desta pesquisa foi o substrato azeite de oliva extra virgem comercial marca Oliva de Los Andes Premium® – o qual apresenta 0,2 % de acidez, glicerol Alphatec grau P.A. 99,5% e, como surfactantes compostos da família dos polisorbatos, o Tween 80 P.S da Dinâmica.

Empregou-se a lipase comercial *Lipozyme TL 100L* da Novozymes, com o objetivo de agir sobre o sistema micelar, esta lipase tem formulação líquida, sendo produzida a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* e tem como ponto ótimo de reação a temperatura de 20°C a 50°C, pH de 7 a 10 e sua atividade inicial de 100 KLUg⁻¹, conforme o fabricante. Adicionou-se a enzima ao meio reacional durante 2 horas. Retirou-se os produtos e utilizou-se um filtro de seringa após o tempo pré-estabelecido na metodologia para remoção de impurezas (Item 3.7.1).

Como suporte da lipase do meio reacional, utilizou-se uma argila comercial do grupo das bentonitas, a *Spectrogel tipo C* da Spectrochem (granulometria de 0,655mm), pré-tratada com sal quaternário, o que a caracteriza como uma argila organofílica propícia para imobilização por adsorção. As análises cromatográficas das amostras foram com padrões de MAG, DAG e TAG, sendo eles: Ácido linoleico com

pureza de 97%; glicerol trilinoleico 98%; ácido oleico >99%; monopalmitico >99%; glicerol trioleico >99%; ácido dilinoleico 98%, todos da marca Sigma-Aldrich. A escolha destes padrões se deu por serem compostos comumente encontrados em maiores quantidades nos azeites de oliva disponíveis no mercado consumidor (STREAM, 2017).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA

O azeite de oliva foi caracterizado pela determinação da umidade, índice de acidez, perfis dos ácidos graxos, concentração de TAG, MAG e DAG.

3.2.1 Determinação da umidade e do índice de acidez do azeite de oliva

A análise da umidade do azeite de oliva foi feita por um titulador colorimétrico Karl Fischer, marca Methrom, modelo 899 Coulometer, por meio da simples titulação no equipamento supracitado (MOLINARI, 2018). Determinou-se o índice de acidez por um método descrito segundo Lutz (2008), pesou-se 2g da amostra de azeite de oliva em um Erlenmeyer de 125mL e adicionou-se 25mL de uma solução éter:etanol (2:1 m/m) e duas gotas do indicador fenolftaleína. Após isso, homogeneizou-se a amostra e titulou-se com solução padronizada de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ até a alteração colorimétrica para rósea. Então, calculou-se o índice de acidez pela Equação 01.

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{5,61 f v}{m} \quad (1)$$

Em que: v representa o volume (mL) de hidróxido de sódio gasto na titulação, f é seria o fator de correção da solução padronizada de hidróxido de sódio e m é a massa de azeite de oliva (g). Realizou-se a análise em triplicata. Para a determinação de ácidos graxos livres presente no azeite de oliva, utilizou-se uma triplicada de titulação com solução, também de hidróxido de sódio. Pesou-se 1g de azeite com duas soluções de fenolftaleína, diluiu-se em 15mL de uma solução de 1:1 etanol/éter. Titulou-se a solução com hidróxido de sódio 0,05mol L⁻¹, mediante agitação, até alteração da cor para rosa, e calculou-se a acidez do óleo segundo a Equação 02 (AWADALLAK et al., 2013).

$$Acidez (m\%) = 100 \cdot \frac{Vol \cdot M_{NaOH} \cdot PM_{AGL}}{ma} \quad (2)$$

Na equação acima, Vol é definido pelo volume (L) utilizado da solução de hidróxido de sódio na titulação; MNaOH é a molaridade da solução do titulante (mol L⁻¹); PMAGL traz a massa molar média (g mol⁻¹) dos ácidos graxos presentes no azeite; por fim, ma é a massa da amostra de azeite de oliva (g). Essa massa molar média foi calculada a partir da caracterização dos perfis nos principais triacilgliceróis presentes no azeite de oliva, pela caracterização por CLAE (FIAMETTI, 2010; FINCO, 2018).

3.2.2 Perfis de ácidos graxos no azeite de oliva

Para a determinação da composição dos ácidos graxos presentes no azeite de oliva, adaptou-se o método de derivatização de Hartman e Lago (1973). Pesou-se, em triplicata, 100 mg do azeite de oliva em tubo de ensaio, adicionou-se 4mL de solução de hidróxido de sódio em metanol 0,5 mol L⁻¹. Colocou-se os tubos em banho termostático com temperatura de 80 °C, onde permaneceu até a dissolução dos glóbulos de óleo. Após isso, resfriou-os em água corrente e acrescentou-se 5mL de reagente esterificante (dissolução de 2 g de cloreto de amônio em 60mL de metanol e 3mL de ácido sulfúrico).

Na sequência, o tubo foi resfriado novamente em água corrente, até chegar à temperatura ambiente e 5mL de metanol foram adicionados. Aqueceu-se o tubo novamente por 2 minutos, seguido de resfriamento em água corrente. Por fim, 5mL de solução saturada de cloreto de sódio foi adicionada e seguiu-se de agitação manual por 60 segundos. Adicionou-se 5mL de acetona:acetonitrila (1:1) aos tubos e manteve-se em repouso num refrigerador por duas horas. Transcorrido esse período, foram preparadas amostras diluindo-se, aproximadamente, 1 mg do sobrenadante em 0,8mL de acetona:acetonitrila (1:1).

Essas amostras foram utilizadas para determinação da composição do azeite de oliva em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE, Thermo Scientific Ultimate 3000, sob temperatura do forno da coluna de 35°C e temperatura do detector de 40°C, este com coluna C18 de 5µm e 100 Å da Phenomenex modelo 00G-4252-E0 de 250 x 4,6mm (Figura 13), o volume da injeção e 20µL, detector RI, fluxo de 1 mL.min⁻¹ com fase móvel de acetonitrila:acetona (1:1 m/m), grau CLAE da marca Dinamica, de forma

isocrática. Tal regulagem de equipamento foi a mesma da curva de calibração abordada em 3.10. Determinou-se a composição dos ácidos graxos de forma individual por meio da Equação 03, de acordo com os tempos de retenção obtidos pela de calibração.

$$\text{Ácido graxo } X (\%) = \frac{A_x}{A_t} \quad (3)$$

Em que: A_x é a área do pico que representa o ácido graxo x e A_t é a soma de todas as áreas obtidas no cromatograma.

3.2.3 Perfis de ácidos graxos na curva de calibração

Com o objetivo de caracterizar os triacilgliceróis das amostras de azeite de oliva, determinou-se os padrões de ácido linoleico 97%; glicerol trilinoleico 98%; ácido oleico >99%; monopalmítico >99%; glicerol trioleico >99%; e ácido dilinoleico 98%, todos da marca Sigma-Aldrich. Prepararam-se as amostras de, aproximadamente, 1 g azeite de oliva por meio de diluição de 1:10 em solução acetona:acetoneitrila (1:1). Após homogeneização da amostra, repousou-se por 24 horas e seguiu-se para quantificação em CLAE, mediante curva de calibração a ser abordada no 3.9. Os testes foram feitos em triplicata (KRUGER et al., 2011; FIAMETTI, 2012).

3.3 TRATAMENTO DAS MICROEMULSÕES

Para realizar a determinação das proporções de azeite de oliva, água, surfactante (Tween 80) e co-surfactante (glicerina e butanol) adequada para promover as microemulsões, realizou-se um conjunto de ensaios conforme ilustrado na Tabela 05. Com o intuito de identificar a condição que garanta a formação das microemulsões que possam ser utilizadas nos ensaios reacionais. Após realizar os testes com as diferentes razões mássicas: água, óleo, surfactante e co-surfactante, foi realizada a homogeneização destas amostras com o uso de um Vortex (Phoenix Luferco AP59), com a agitação constante por 90 segundos. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente por 48 horas (PESCARA, 2016).

A utilização do Tween 80 como surfactante e da glicerina como co-surfactante são dadas pela alta capacidade de estabilização com uma fonte de gordura, no caso

o triacilglicerol do azeite de oliva. Dadas às proporções dos reagentes, a estabilização é alta, não perdendo suas características físicas e estruturais em função da temperatura, além de promoverem a reação de glicerólise de forma efetiva e apresentarem uma ampliação considerável da área superficial para que haja uma reação enzimática na sequência (FIAMETTI, 2009; WANG et al., 2016). Portanto, é relevante para a pesquisa a obtenção de diferentes pontos estabilizados, buscando sempre a conversão máxima de TAG em MAG e DAG.

A avaliação das microemulsões foi de forma visual e selecionaram-se as amostras que apresentaram a formação de uma fase homogênea, translúcida e que se manteve estável após o período de 48 horas de descanso. Portanto, percebe-se um meio estabilizado e preparado para que aconteça a reação de glicerólise enzimática. Essas condições podem ser observadas em pesquisas que também fazem o uso de microemulsões para posteriores reações em biocatalisadores ou não (VALÉRIO, 2009; FIAMETTI, 2012; PESCARA, 2016).

3.4 TRATAMENTO DA ARGILA

Para a utilização da argila como suporte, foi feito um pré-tratamento ácido com a finalidade de retirar a matéria orgânica. Para esta finalidade, pesou-se 50 g de argila que foram imersas em, aproximadamente, 300mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10%. Tal abordagem fez-se necessária para eventual desobstrução dos canais estruturais da argila *Spectrogel tipo C*, que, normalmente, estão preenchidos por impurezas agregadas (carbonatos), conforme metodologia descrita por Molinari (2020). Em seguida, adicionou-se uma solução ácida (aproximadamente 300mL de ácido clorídrico a 2mol L^{-1}) por um período de 6 horas, e neutralizou-se o pH do meio (MOLINARI, 2020).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE PRÉ E PÓS IMOBILIZAÇÃO

A caracterização estrutural do suporte de argila *Spectrogel tipo C* antes e depois da imobilização empregou as técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Varredura (MEV) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (MOLINARI, 2018). As amostras analisadas correspondem ao ponto central do planejamento, descrito no tópico 3.6.

3.5.1 Análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram analisadas com um Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo JEM-1400. Os preparos das amostras de suporte constituíram na dispersão em álcool isopropílico. Após essa dispersão, seguiu-se para um banho de ultrassom por um período de uma hora, para que houvesse a máxima dispersão das partículas no meio. Depois, adicionou-se uma gota da solução a ser adsorvida, englobando as microemulsões dos principais pontos do planejamento fatorial, sobre uma grade de cobre (0,3 cm de diâmetro com 200 mesh). Tal grade foi coberta com um filme carbono acima de uma placa de Petri. Secaram-se as amostras em estufa por 30 minutos e inseriu-se no microscópio para avaliação da estrutura (MOLINARI, 2018; CARVALHO et al., 2018).

3.5.2 Análises de Microscopia de Varredura (MEV)

No intuito de determinar a estrutura da morfologia dos suportes, utilizou-se um microscópio Shimadzu SperScan SS-550. Tratou-se as amostras antes da obtenção das imagens e conduziu-se uma deposição de filme de ouro para avaliar a condutividade elétrica ao material.

3.5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para proporcionar as informações condizentes às interações entre amostra e suporte, realizou-se a leitura espectroscópica em um espectrofotômetro Bruker – Vertex 70 na faixa de comprimento de onda 3000 a 300 cm^{-1} . Como referência, utilizou-se o brometo de potássio, com 100% de transmitância. Analisou-se 0,004g das amostras pesadas e misturadas a 0,198g de KBr (FLEXOR et al., 2018).

3.6 IMOBILIZAÇÃO DA *LIPOZYME TL 100L* POR ADSORÇÃO

A imobilização da enzima foi realizada empregando-se o processo de adsorção, ou seja, nesta reação a enzima líquida foi colocada em contato com a argila que, se ligando, fixa aos sítios ativos do suporte.

3.6.1 Otimização do processo de adsorção

Realizaram-se os procedimentos de imobilização da lipase *Lipozyme TL 100L* em suporte de argila comercial *Spectrogel tipo C*, que é uma bentonita, pelo método de adsorção e com a aplicação de um planejamento fatorial 2^3 , com triplicata no ponto central.

3.6.2 Planejamento experimental para o processo de adsorção

As variáveis avaliadas no planejamento foram: pH e a atividade oferecida ao suporte da enzima e como variável resposta a atividade obtida após a imobilização como variável resposta, conforme ilustrado na Tabela 5. Essas variáveis foram definidas considerando a importância no processo com bases em alguns relatos da literatura (DIZGE et al., 2009; MENDES et al., 2011; YUCEL, 2012; MOLINARI et al., 2018).

Baseado em estudos e segundo Tran et al. (2012), Araki et al. (2018) adotaram o tempo de imobilização em 24 horas, bem como a temperatura de imobilização em 35°C, que foi a condição ótima de imobilização da *Lipozyme TL 100L* no trabalho de Aybastier e Demir (2010). Nessa condição, foram obtidos resultados de atividades superiores a 80% de eficiência em termos de atividade enzimática ofertada. Após o processo, realizou-se a lavagem do suporte com água destilada para a remoção da enzima e filtragem do produto por filtro de seringa. Posteriormente, determinou-se a atividade catalítica das enzimas imobilizadas, conforme descrito na sessão 3.8.

Tabela 5 – Variáveis utilizadas no planejamento experimental 2^2 .

Variáveis independentes	Variável dependente
Atividade Oferecida (gENZ gSUP ⁻¹)	Atividade Obtida (gENZ gSUP ⁻¹)
pH	

Fonte: O autor.

Assim, serão realizados um total de onze ensaios, com 8 fatoriais e 3 pontos centrais (essas variáveis codificadas vão dos níveis +1 para os pontos de máximo, -1 para os pontos de mínimos e 0 para os pontos centrais), conforme mostrado na Tabela 07. O cálculo dessa codificação é obtido pela Equação 04.

$$X_i = \frac{x_i - Z}{\Delta X_i} \quad (4)$$

Na equação acima, X_i é o valor codificado da variável i , x_i é o valor real da variável, ΔX_i refere-se ao intervalo da variação da variável i e Z é o valor real da variável i no ponto central. Na Tabela 06, são apresentados os níveis das variáveis independentes e, na Tabela 07, os tratamentos realizados no processo.

Tabela 6 – Decodificação das variáveis do planejamento 2²

Variáveis codificadas	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Atividade enzimática oferecida (gENZ gSUP ⁻¹)	0,0249	0,0249	0,0404	0,0498	0,0498
pH	3,3	5,0	9,0	7,0	10,7

Fonte: O autor.

Tabela 7 – Planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central

Ensaio	X1	X2	pH	Atividade Oferecida (gENZ gSUP ⁻¹)
1	-1	-1	5,0	0,0249
2	1	-1	9,0	0,0249
3	-1	1	5,0	0,0498
4	1	1	9,0	0,0498
5	-1,41	0	3,3	0,0404
6	1,41	0	10,7	0,0404
7	0	-1,41	7,0	0,0199
8	0	1,41	7,0	0,0607
9 (pc)	0	0	7,0	0,0404
10 (pc)	0	0	7,0	0,0404
11 (pc)	0	0	7,0	0,0404

pc – ponto central

Fonte: O autor.

Utilizou-se, como tampões, o fosfato citrato em pH 5,0; fosfato de sódio para pH 7,0 e fosfato de sódio (ajustado com hidróxido de sódio) para o pH 9,0. Prepararam-se essas soluções de acordo com o planejamento experimental em (0,05, 0,10 e 0,15 mol L⁻¹, respectivamente) (MOLINARI, 2018). As imobilizações da adsorção seguiram o planejamento experimental supracitado para obtenção dos resultados, com o auxílio do software Statistica e avaliados segundo o diagrama de Pareto, ANOVA, superfície resposta e demais análises estatísticas condizentes às análises.

3.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE

A avaliação da atividade enzimática empregou a metodologia de dosagem de atividade lipolítica de hidrólise. Inicialmente, foi preparada uma emulsão, composta por uma solução de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 sua composição foi a goma arábica 10% e o substrato óleo de oliva (7,15% m/v). Após seu preparo, monitorou-se o pH e fez-se sua correção para 7,0, quando necessário, por meio da adição de uma solução de NaOH 0,05 M ou 50 mM (FERNANDES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2015).

Foram adicionados em erlenmeyers, 20 mL da emulsão juntamente a 0,5mL da amostra da solução enzimática e, posteriormente, foram levadas ao shaker por 20 minutos e 35°C. Após o tempo pré-estabelecido, adicionou-se 20 mL de uma solução de acetona: etanol 1:1 para que a reação cessasse. Para a titulação, adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína e anotou-se o volume gasto da solução de NaOH 50 mM (KOBLOITZ, 2003; FERRETI et al., 2017). O cálculo da atividade enzimática foi realizado a partir da Equação 05.

$$A = \frac{\left[\left(\frac{\Delta V}{\Delta t}\right) * [\text{NaOH}] * Fc * 60(\text{seg})\right]}{1000\text{mL} * 1\text{min}} * 1000 \quad (5)$$

Em que: ΔV = Variação de volume; Δt = Variação de tempo; $[\text{NaOH}]$; Concentração de NaOH; Fc = Fator de correção do NaOH.

Ferreira et al. (2013) enfatizam que a atividade é dada em (U) e refere-se à quantidade de enzima que tem capacidade de catalisar uma reação com determinada velocidade de formação de produto por minuto, considerando toda a quantidade de NaOH consumido na titulação em função do tempo.

3.7.1 Glicerólise enzimática com a enzima livre e imobilizada

Foram realizados testes reacionais para a produção de MAG e TAG com a enzima livre e imobilizada, somente nas condições experimentais nas quais as microemulsões permaneceram estáveis. Os ensaios foram realizados em um reator de vidro encamisado sob temperatura controlada por um banho termostático (Tecnal TE 2005). Inicialmente, prepararam-se as microemulsões, aguardou-se um período

de 48 horas e, então, após essa estabilização, adicionou-se a enzima comercial e o glicerol no reator encamisado em conjunto com a MO anteriormente formada. O tempo reacional foi de 2 horas, temperatura de 45°C, razão molar glicerol:óleo 2:1, 35°C. Nos experimentos com enzima livre, utilizou-se uma razão massa de enzima por massa de reagentes de 7,5% (m/m). Nos experimentos que empregaram enzima imobilizada, utilizou-se as condições de pH 7, atividade oferecida de 0,0404 gENZ gSUP⁻¹ e como variável resposta à atividade obtida (gENZ gSUP⁻¹) por adsorção. O esquema do aparato experimental é apresentado na Figura 11.

Durante a reação, procedeu-se o acompanhamento e monitoramento do pH, que ocorreu por meio do uso de um pHmetro (Lucaderma Luca 210). O monitoramento dessa variável foi realizado nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de cada reação, tanto da enzima livre quanto da enzima imobilizada. É importante salientar a importância deste monitoramento, pois, por meio dele, é possível observar a variação do pH, que pode afetar a atividade da lipase e, conseqüentemente, haverá uma diminuição do rendimento da catálise.

Figura 11 – Reator encamisado acoplado à banho termostático.



Fonte: O autor.

Após o decorrer do tempo reacional pré-estabelecido, foi realizada a remoção da enzima das amostras, utilizando-se de um sistema de filtragem com um filtro de

seringa, sendo, então, o filtrado transferido para frascos de coloração âmbar (Figura 12), assim, dispostos em recipiente de isopor e, por fim, encaminhados ao refrigerador, para então realizar posterior quantificação por CLAE Thermo Scientific Ultimate 3000 com injetor automático, realizados na UTFPR *Campus* Medianeira. Ressalta-se que os testes de determinação da atividade enzimática foram feitos para as enzimas livres e imobilizadas.

Figura 12 – Amostras acondicionadas para posterior leitura.



Fonte: O autor.

3.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL GLICERÓLISE ENZIMÁTICA COM A ENZIMA IMOBILIZADA

A partir do resultado do planejamento experimental de análise do processo de imobilização, descrita na sessão 3.7, foi definida a condição de imobilização da enzima que foi utilizada na produção de MAG e DAG. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 foi utilizado com a finalidade de determinação das condições ótimas de síntese de MAG e DAG. As variáveis analisadas no planejamento foram: temperatura e porcentagem volumétrica de enzima, cujos níveis são apresentados na Tabela 08, tendo como variável resposta a conversão calculada pela Equação 03.

As emulsões foram preparadas em termos de m/m com 1,2mL de glicerol, 0,6mL de azeite de oliva, 0,9mL de água, 4,5mL de Tween 80 e 9mL de butanol, pois foi a condição que apresentou a melhor conversão de TAG em MAG e DAG de acordo com os testes iniciais de glicerólise enzimática (Finco, 2018). Os experimentos foram conduzidos por 2 horas. Ao final, foi feita a separação da enzima e realizada uma

filtração por filtro de seringa. As amostras foram coletadas e, então, determinada a concentração de TAG, DAG e MAG por CLAE.

Tabela 8 – DCCR 2² do melhor ponto do planejamento 2³.

Teste	Temperatura (°C)	Enzima (%)
1	-1,00 / 30	-1,00 / 5
2	1,00 / 40	-1,00 / 5
3	-1,00 / 30	1,00 / 10
4	1,00 / 40	1,00 / 10
5	-1,41 / 28	0,00 / 7,5
6	1,41 / 42	0,00 / 7,5
7	0,00 / 35	-1,41 / 3,97
8	0,00 / 35	1,41 / 11,03
9	0,00 / 35	0,00 / 7,5
10	0,00 / 35	0,00 / 7,5
11	0,00 / 35	0,00 / 7,5

Fonte: O autor.

3.8.1 Análise de Variância

A partir das quantidades de MAG e DAG determinadas pela área do cromatograma, foi feito o cálculo da porcentagem de conversão de TAG pela Equação 06 e, em seguida, a posterior análise de variância nas condições 3/1/8 anteriormente descritas.

$$\% \text{ conversão} = \frac{[MAG \text{ final}] + [DAG \text{ final}]}{[TAG \text{ inicial}]} * 100 \quad (6)$$

Através do software Statistica versão 11.0 submeteu-se as médias dos resultados à análise de variância com 95 % de significância e realizou-se a determinação de quais variáveis são significativas e se houve interação significativa entre ela, sendo possível, assim, fazer a definição de quais foram as variáveis realmente importantes na formação de MAG e DAG. Além disso, estabeleceu-se como pontos máximos de 40°C e 10% de enzima, bem como os pontos de mínimos de 30°C e 5% de enzima, os centrais de 35°C e 7,5% de enzima, os valores extrapolados máximos de 42°C e 11,03% de enzima e os mínimos de 28°C e 3,97% de enzima. A aplicação de tal teste teve como finalidade permitir uma posterior análise de superfície de resposta e fundamentar os demais testes estatísticos necessários a fim de encontrar as condições ótimas.

3.9 REUTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS IMOBILIZADAS

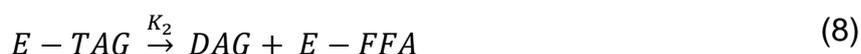
No intuito de avaliar a atividade enzimática da enzima em um teste de reuso (reciclo), utilizou-se o ponto ótimo em triplicata, obtido por meio do software Maple®, versão 13 (Waterloo Maple Inc., Canada), combinado à modelagem Box-Behnken. Analisaram-se os fatores de conversão obtidos e comparou-se com os resultados do primeiro ciclo. A condição reacional para a triplicata foi temperatura de reação em 35,96°C e o volume de enzima em 7,95%.

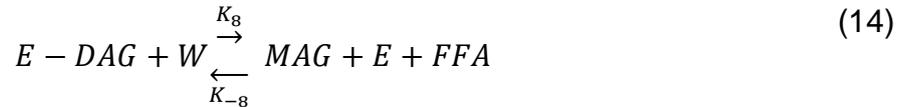
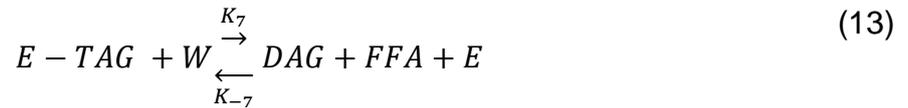
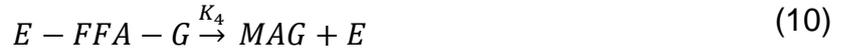
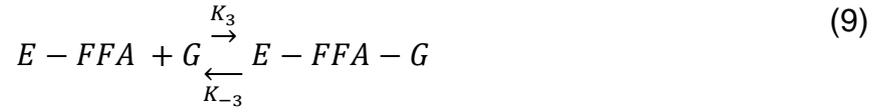
3.10 CINÉTICA DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE ENZIMÁTICA

Buscando fazer o acompanhamento da decomposição de TAG e formação de MAG e DAG, procedeu-se o monitoramento da reação que apresentou maior eficiência de conversão em produtos, procedimento realizado a cada trinta minutos por um período de 9 horas, sendo feita a retirada de alíquotas de 200 µL no tempo 0 minutos até o tempo 540 minutos. Posteriormente, foi determinada a concentração TAG, DAG e MAG por CLAE.

3.10.1 Determinação da cinética de reação

Na condição de maior conversão de TAG (ponto ótimo) foram realizados experimentos empregando diferentes tempos reacionais: 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 e 180 minutos para a determinação da concentração de TAG, DAG e MAG. Neste trabalho, foi empregado o modelo matemático ping-pong bi-bi descrito pelo conjunto da Equação 7 a Equação 12, além disso foram consideradas as reações de hidrólise, descritas pela Equação 13 a Equação 16. Na modelagem matemática cinética da reação de glicerólise do óleo de oliva, foram consideradas as seguintes reações elementares:





A partir das equações elementares, pode-se escrever as seguintes equações cinéticas (equações 17 a 26):

$$r_1 = -K_1 C_{TAG}(t) C_E(t) + K_{-1} C_{TAG-E}(t) \quad (17)$$

$$r_2 = -K_2 C_{TAG-E}(t) \quad (18)$$

$$r_3 = -K_3 C_{E-FFA}(t) C_G(t) + K_{-3} C_{E-FFA-G}(t) \quad (19)$$

$$r_4 = -K_4 C_{E-FFA-G}(t) \quad (20)$$

$$r_5 = -K_5 C_{DAG}(t)C_E(t) + K_{-5} C_{E-DAG}(t) \quad (21)$$

$$r_6 = -K_6 C_{E-DAG}(t) \quad (22)$$

$$r_7 = -K_7 C_{E-TAG} C_w(t) + K_{-7} C_{DAG}(t)C_{FFA}(t)C_E(t) \quad (23)$$

$$r_8 = -K_8 C_{E-DAG} C_w(t) + K_{-7} C_{MAG}(t)C_{FFA}(t)C_E(t) \quad (24)$$

$$r_9 = -K_9 C_{MAG}(t)C_E(t) + K_{-9}C_{E-MAG}(t) \quad (25)$$

$$r_{10} = -K_{10} C_{E-MAG}(t)C_E(t) + K_{-10} C_{FFA}(t)C_E(t)C_G(t) \quad (26)$$

Aplicando-se o balanço molar para cada espécie e considerando a produtividade com base na estequiometria, obtém-se o modelo da cinética enzimática para as diversas espécies envolvidas no mecanismo da reação de glicerólise, descrito pelas seguintes equações (equações 27 a 37):

$$\frac{dC_{TAG}}{dt} = r_1 \quad (27)$$

$$\frac{dC_{DAG}}{dt} = -r_2 + r_5 - r_7 \quad (28)$$

$$\frac{dC_{MAG}}{dt} = -r_4 - r_6 - r_8 + r_9 \quad (29)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = -r_3 + r_{10} \quad (30)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = r_1 - r_4 + r_5 - r_7 - r_8 + r_9 - r_{10} \quad (31)$$

$$\frac{dC_{E-TAG}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_7 \quad (32)$$

$$\frac{dC_{E-FFA}}{dt} = -r_2 + r_3 - r_6 \quad (33)$$

$$\frac{dC_{E-FFA-G}}{dt} = -r_3 + r_4 \quad (34)$$

$$\frac{dC_W}{dt} = r_7 + r_8 \quad (35)$$

$$\frac{dC_{FFA}}{dt} = -r_7 - r_8 - r_{10} \quad (36)$$

$$\frac{dC_{MG-E}}{dt} = -r_9 + r_{10} \quad (37)$$

O balanço para a concentração de enzimas livres foi baseado nas concentrações de complexos enzima-substrato e a concentração total de enzima permanece constante, representado pela seguinte equação (38):

$$C_E(t = 0) = C_E + C_{E-TAG} + C_{E-DAG} - C_{E-MAG} + C_{E-FFA} + C_{E-FFA-G} \quad (38)$$

As condições iniciais são apresentadas pelas equações de (39) a (44). Todos os valores de concentração estão expressos em mol kg⁻¹ e foram calculados para cada componente baseados na média da massa molecular do óleo de oliva, massa de cada componente e massa total de óleo e água.

$$C_{TAG}(0) = C_{TAG,0}^{exp} \quad (39)$$

$$C_{DAG}(0) = 0 \quad (40)$$

$$C_{MAG}(0) = 0 \quad (41)$$

$$C_G(0) = 0 \quad (42)$$

$$C_E(0) = C_{E,0}^{exp} \quad (43)$$

$$C_{E-TAG}(0) = 0 \quad (44)$$

$$C_{E-FFA}(0) = 0 \quad (45)$$

$$C_{E-FFA-G}(0) = 0 \quad (46)$$

$$C_W(0) = C_{W,0}^{exp} \quad (47)$$

$$C_{FFA}(0) = 0 \quad (48)$$

$$C_{E-MAG}(0) = 0 \quad (49)$$

$$C_{E-DAG}(0) = 0 \quad (50)$$

3.10.2 Estimação de parâmetros

Os parâmetros do modelo matemáticos ($K_1, K_{-1}, K_2, K_3, K_{-3}, K_4, K_5, K_{-5}, K_6, K_7, K_{-7}, K_8, K_{-8}, K_9, K_{-9}, K_{10}$ e K_{-10}) foram estimados a partir dos dados experimentais da cinética da hidrólise enzimática do óleo de oliva (TAG, DAG, MAG e FFA) e da minimização da função objetivo representada pela Equação (37). O método de otimização simplex Dowhill desenvolvido por Nelder e Mead (1965) foi utilizado na busca do mínimo da função objetivo, conforme a equação 51.

$$ob = \sum_{j=1}^{nc} \sum_{i=1}^{nd} (C_{ji}^{exp} - C_{ji}^{mod})^2 \quad (51)$$

Em que:

nc = número de componentes (TAG, DAG, MAG e FFA);

nd = número de dados experimentais;

C_{ji}^{exp} = concentração experimental do componente j ;

C_{ji}^{mod} = concentração do componente j calculado pelo modelo;

Dessa forma, a partir do modelo proposto, que é constituído pelo sistema de equações de (21) a (32) e das respectivas condições iniciais, as equações (33) a (44) foram utilizadas para modelar o comportamento do sistema reacional e determinar os parâmetros cinéticos das reações de hidrólise do óleo de oliva. Para a solução do modelo matemático, foi utilizado o método numérico de Rosenbrock (1963), por meio do software Maple®, versão 13 (Waterloo Maple Inc., Canada).

3.11 DETERMINAÇÃO DE TAG, DAG E MAG

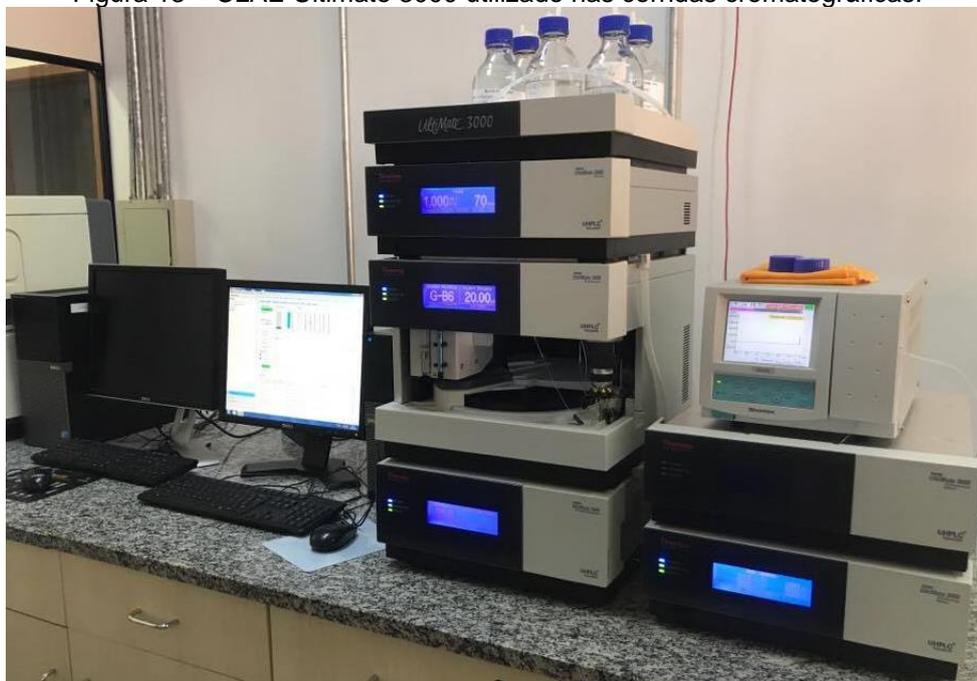
Para determinação da concentração de TAG, MAG e DAG após a glicerólise enzimática, seguiram-se parâmetros que irão ser descritos a seguir, mas foram determinados a partir da curva de calibração dos principais padrões do azeite de oliva, com base na área de pico desses padrões, após a reação de glicerólise. Tais processos estão descritos a seguir.

3.11.1 Determinação das curvas a partir dos padrões do azeite de oliva

Uma solução estoque (50 g L^{-1}) para cada um dos padrões: Ácido linoleico 97%; glicerol trilinoleico 98%; ácido oleico > 99%; monopalmitico > 99%; glicerol trioleico > 99%; e ácido dilinoleico 98%. Posteriormente, foram feitas diluições da solução estoque para elaborar a curva padrão no CLAE em diferentes faixas de concentração NA pesagem das amostras, assim utilizou-se uma balança (Shimadzu AUW 220D), pesando-se quantidades de 0,05g de cada padrão e feita a transferência para um balão volumétrico de 1mL, desse modo cada padrão ficou com uma concentração de 50 g L^{-1} . Foi feita a diluição para concentrações de 40, 30, 20 e 10 g L^{-1} , amostras que foram realizadas em balões de 1mL no campus Toledo, sendo, então, acondicionadas

em refrigerador e, posteriormente, levadas ao campus Medianeira para leitura no CLAE, observada na Figura 13.

Figura 13 – CLAE Ultimate 3000 utilizado nas corridas cromatográficas.



Fonte: O autor.

3.11.2 Quantificação de MAG, DAG e TAG

Após a preparação do equipamento com os parâmetros já descritos, foi feita a transferência das amostras para vials de 1mL e realizou-se corrida de 50 minutos de todos os pontos da curva do ponto menos concentrado para os de maior concentração para que não houvesse interferência na leitura. Essa análise foi realizada de acordo com o método 993.24 da AOAC (1996) em CLAE, Thermo Scientific Ultimate 3000, sob temperatura do forno da coluna de 35°C e temperatura do detector de 40°C, este com coluna C18 de 5 μ m e 100 Å da Phenomenex modelo 00G-4252-E0 de 250 x 4,6mm (Figura 14), o volume da injeção de 20 μ L, detector RI, fluxo de 1mL min⁻¹ com fase móvel de acetonitrila/acetona (1:1 m/m), grau CLAE da marca Dinamica, de forma isocrática.

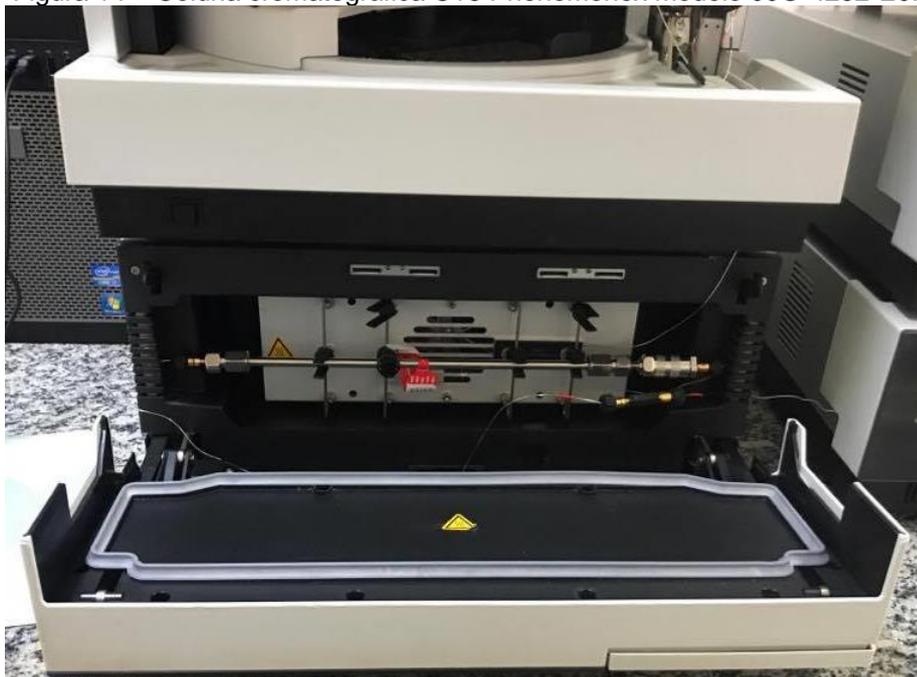
Após a realização da glicerólise enzimática e remoção da enzima, procedeu-se a diluição das amostras a uma concentração de 20 g L⁻¹ com a adição de 200 μ L de clorofórmio, em que se fez o complemento do volume do balão com a fase móvel.

Após, foi realizada a transferência das amostras para tubos de ensaio e agitação em Vórtex. Em seguida, foram transferidas ao CLAE para análise.

A quantificação das MO foi realizada de duas maneiras: a primeira por área de pico na região de MAG, TAG e TAG e a segunda por meio do tempo de retenção e área de pico dos padrões que estão envolvidos na curva de calibração. A primeira análise é fundamental, pois, nos cromatogramas que serão apresentados adiante (apêndice A), os valores obtidos apresentaram picos não caracterizados na região de MAG, DAG e TAG, dessa forma se mostraram componentes interessantes na conversão final, já que há o entendimento de que, aproximadamente, 99% da massa do azeite de oliva é TAG.

No entanto, foi necessário fazer o uso de seis padrões externos para a composição da curva de calibração, 10 a 50 ppm e, assim, foram definidos os tempos de retenção de cada um. Para tanto, compreende-se, assim, a resposta do cromatograma em relação à concentração dos ácidos linoleico e oleico, monopalmitico, trioleico, trilinoleico e dilinoleico (LIMA et al., 2013). Foi realizada a diluição das amostras 15 e 16 (Tabela 10), que apresentavam concentrações de TAG fora da curva de calibração (sendo superiores a 50 gL^{-1}), sendo diluídas em 30 gL^{-1} . Posteriormente, foi feito o acondicionamento destas em bancada até que atingissem a temperatura ambiente para posterior corrida.

Figura 14 – Coluna cromatográfica C18 Phenomenex modelo 00G-4252-E0.



Fonte: O autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos nesta pesquisa é relatada neste capítulo, apresentando, assim, os resultados observados na caracterização química do óleo e morfológica do suporte, avaliação da etapa de emulsificação, obtenção do catalisador, aplicação do catalisador na glicerólise enzimática, bem como em todos os processos de quantificação e das atividades e cinéticas originadas pela reação em estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AZEITE DE OLIVA

O azeite de oliva foi caracterizado pela determinação da umidade, índice de acidez, perfis dos ácidos graxos e concentração de TAG, MAG e DAG.

4.1.1 Determinação da umidade

Para a umidade do azeite de oliva, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2012) regulamenta um teor de umidade de até 0,15%. Nos testes realizados em triplicata no presente estudo, obteve-se um valor de $0,13\% \pm 0,1$ de umidade, ou seja, dentro das especificações governamentais. Tais resultados estão em consonância a literatura que, como no trabalho de Sánchez et al. (2011), que obtiveram resultados de umidade muito próximos aos do presente estudo e analisaram as características físico-químicas do azeite de oliva com base na estabilidade de oxidação por meio de uma filtração e, quando submetido a esse processo, reduziu a umidade e tornou o óleo brilhante, mas mantendo sua composição.

Muik et al. (2003) analisaram a composição e umidade do azeite de oliva por meio de uma Transformada de Fourier com espectrômetro de Raman. O azeite que avaliaram apresentou índices de umidade bem mais elevados, na faixa de 1,54%. Nota-se que a umidade e demais características físico-químicas estão ligadas às características sensoriais do azeite de oliva, ou seja, quando estão dentro dos parâmetros aceitáveis por legislação, o produto está próprio para venda e consumo, além de proporcionar maior efetividade em reações envolvendo os mesmos, como no caso do presente estudo (MORALES et al., 2005).

O percentual de umidade é uma das principais determinações analíticas realizadas com o propósito de verificar padrões de identidade e qualidade do azeite de oliva, além de auxiliar na tomada de decisão em várias etapas do processo (FURTADO; FERAZ, 2008). Portanto, esses valores de acordo com a embalagem e com as metodologias encontradas propiciaram as melhores condições de processo para otimização da reação de glicerólise enzimática.

4.1.2 Determinação do Índice de Acidez do azeite de oliva

O índice de acidez do azeite foi $0,38\% \pm 0,1$ e determinado pela metodologia descrita por Adolfo Lutz (2008), esse resultado pode variar de acordo com o azeite utilizado, mas está dentro dos valores encontrados seguindo tal metodologia (CAYUELA-SANCHÉZ, 2021; ROSA, 2021; KHALED, 2022). Um teor de $0,39\% \pm 0,02$ foi obtido no trabalho de Balesteros et al. (2007), que determinaram a acidez do azeite de oliva por meio de uma extração etanoica a 60°C (nível de confiança de 95%). Peixoto, Santana e Abrantes (1998) avaliaram os índices de acidez do azeite de oliva de diversas marcas e verificaram uma variação entre 0,15 a 0,75%, ou seja, dentro dos parâmetros obtidos na presente pesquisa.

Os índices de acidez podem variar pela degradação e condições de armazenamento por diversos fatores, como exposição à luz, calor, ar atmosférico e o tempo de prateleira (ÁVILA; SODRÉ, 2012). Até mesmo as condições de colheita influenciam no índice de acidez do azeite de oliva extra virgem, tendendo a aumentar a acidez e, conseqüentemente, diminuir a pureza (EVARISTO et al., 2016).

É de suma importância a determinação de um componente específico do alimento como é o caso da determinação da acidez. Ela pode ter diferentes finalidades, como: avaliação nutricional de um produto; controle de qualidade do alimento; desenvolvimento de novos produtos e a monitoração da legislação (AMORIM et al., 2012).

4.1.3 Perfil dos Ácidos graxos do azeite de oliva

A fim de analisar o perfil dos ácidos graxos presentes no azeite de oliva, seguiu-se o método de derivatização, descrito por Hartman e Lago (1973) e adaptado para o

presente estudo após a realização de testes preliminares. Esses testes foram feitos em triplicata e os resultados estão dispostos na Tabela 09.

Tabela 9 – Porcentagem dos padrões presentes no azeite de oliva.

Composto	Teste 1 (%)	Teste 2 (%)	Teste 3 (%)	Média (%)	Desvio Padrão
Ácido linoleico 97%	11,56	11,54	11,89	11,66	0,01
Glicerol trilinoleico 98%	0,27	0,36	0,31	0,31	0,00
Ácido oleico >99%	74,20	76,50	75,10	75,27	0,44
Monopalmítico >99%	8,46	8,91	8,74	8,70	0,01
Glicerol trioleico >99%	0,31	0,29	0,34	0,31	0,00
Ácido dilinoleico 98%	2,74	2,98	2,87	2,86	0,00

Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 09, percebe-se que os resultados da caracterização dos principais padrões do azeite de oliva estão de acordo com Tabela 01. Isso quer dizer que as quantidades presentes de cada padrão no azeite de oliva estão em conformidade com a sua composição, assim cada um dos picos do cromatograma está designado a esses padrões (NDIAYE, 2004). Ressalta-se a presença majoritária do ácido oleico, que está em torno de 75% da composição do azeite de oliva e os resultados estão de acordo com a literatura (BARONI, 2015; SALES, 2021; SANTOS, 2021). Destaca-se também o desvio padrão que foi baixo para todos os compostos analisados, indicando que tem-se um modelo ajustado em que seus valores estão muito próximos da média obtida na triplicata.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE DE ARGILA

Caracterizou-se o suporte de argila *Spectrogel tipo C* através das análises de espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados obtidos estão dispostos e serão discutidos a seguir.

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar a argila, antes e depois do tratamento ácido, bem como a análise da ativação ácida e conversão após a glicerólise enzimática. A técnica de

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada para identificar os grupos funcionais presentes nas amostras de argila durante o processo reacional.

Assim, a partir dos espectros FTIR (Figura 15), as principais bandas características do Spectrogel® são: 3632 cm^{-1} , que está relacionada ao estiramento O-H da água adsorvida na estrutura da argila, já as bandas em 3446 e 1641 cm^{-1} indicam a deformação angular H-O-H entre camadas de argila, respectivamente. (MANZOTTI et al., 2019; MAIA et al., 2019).

Em 1021 cm^{-1} observou-se o alongamento das ligações silício-oxigênio (Si – O) (MANZOTTI et al., 2019). Já a banda 913 e 793 cm^{-1} refere-se a uma variante angular do grupo O-H (MAIA et al., 2019). E ainda, as bandas entre 722 e 467 cm^{-1} , referem-se à estrutura filossilicato com deformação angular Si-O e Si-O-Al (MAIA et al., 2019). Os trechos em 2923 e 2852 cm^{-1} observa-se alongamento simétrico e assimétrico, respectivamente, são alongamentos vibracionais da ligação C-H e, segundo Manzotti et al. (2019), estão relacionados aos componentes orgânicos promovidos pelo sal, também orgânico, utilizado durante o processo de organofilização da argila. Por sua vez, a banda por volta de 1477 cm^{-1} também sinaliza a deformação angular desses grupos (C–H) (MAIA et al., 2019).

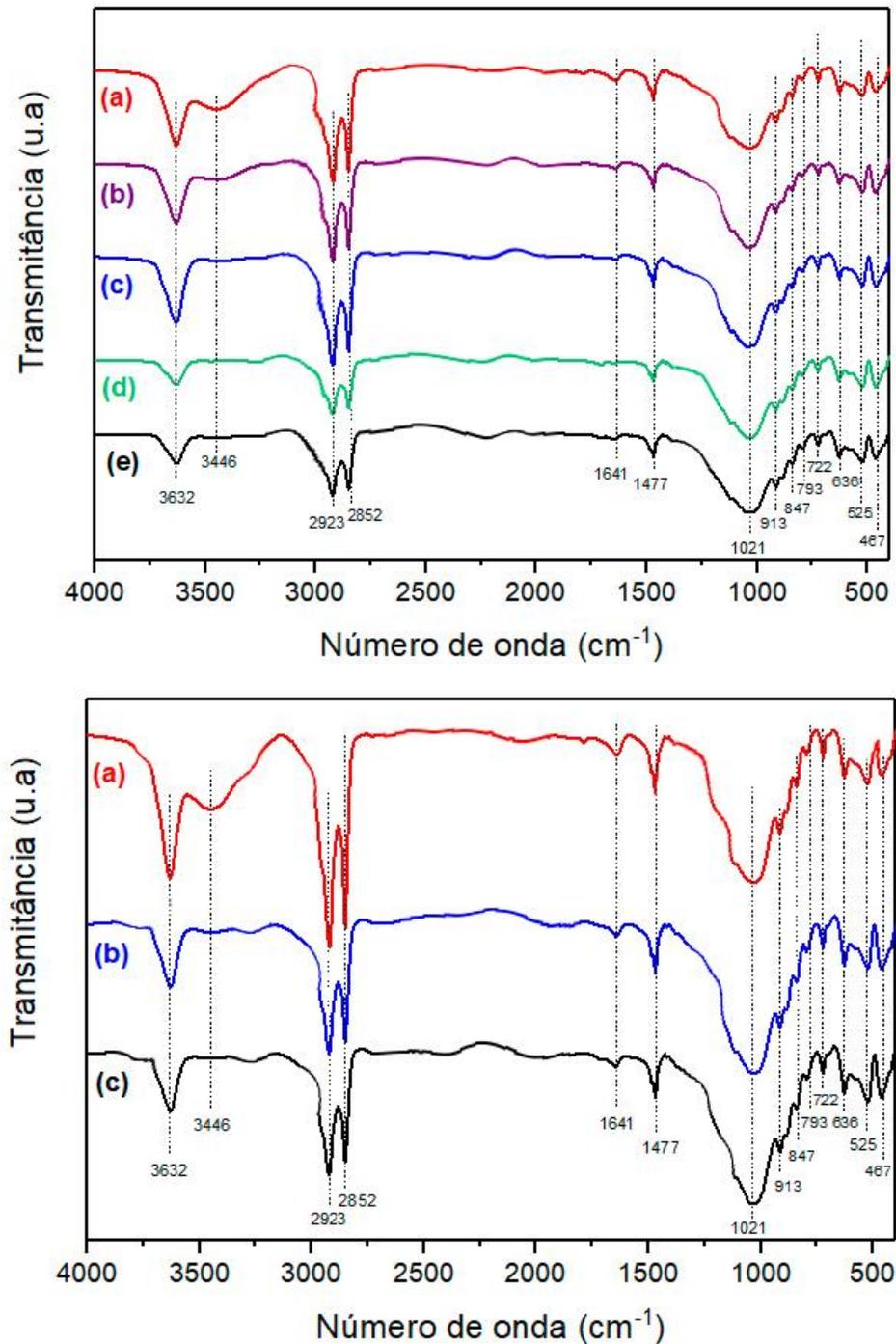
Quanto a amostra ativada com o ácido clorídrico, ainda é possível verificar a presença dos picos citados acima. Rodrigues et al. (2006), realizaram um estudo com diferentes tempos de reação para a ativação ácida, no qual verificaram por FTIR, que apenas nos casos de tempos mais extremos (7 dias) a argila deixava de apresentar os picos característicos, o que indicava destruição das camadas da argila. Os autores concluíram que, o tempo de reação de 1 hora, que é igual ao usado neste trabalho, e acaba por ser menor do que os geralmente utilizados nas indústrias, foi o que não causou modificações significativas na estrutura da argila. A modificação mais visível neste caso, está na banda $3446,68\text{ cm}^{-1}$, referente ao estiramento H-O-H, que representa a água entre as camadas da argila, no qual é possível notar sua redução.

Com relação à amostra que sofreu ativação com ácido clorídrico, ainda é possível verificar a presença dos picos citados acima. Esses parâmetros podem ser observados no trabalho de Rodrigues et al. (2006), que efetuaram um estudo com diferentes tempos de reação para ativação ácida, no qual verificaram por FTIR que somente em casos de tempos mais extremos (7 dias) a argila deixou de apresentar os picos característicos, que caracterizou a destruição das camadas de argila. Deste

modo, os autores concluíram que o tempo de reação de 1 hora, que é o mesmo utilizado no presente trabalho e é menor do que os geralmente aplicados nas indústrias, não provocou mudanças significativas na estrutura da argila. Verifica-se que a alteração mais visível na estrutura da argila está na faixa de 3446 cm^{-1} , que se refere a banda H-O-H, representando a água entre as camadas de argila, na qual é possível observar sua redução.

Já na banda em 2923 cm^{-1} que está presente no espectro da Spectrogel®, segundo a Figura 15, assim como nas demais amostras, também é referente ao estiramento vibracional C-H do grupo CH_2 presente em todas os testes feitos (XUE et al., 2010). Observa-se também a banda em 2852 cm^{-1} que é característica do grupo C-H e do grupo -CHO. Ao analisar o pico em 1641 cm^{-1} do estiramento vibracional C = N, distingue-se que o mesmo aumentou ligeiramente em relação à amostra antes da reação de glicerólise, devido à realização da reação de promovida pelo sistema (YIGITOGU & TEMOCIN, 2010). Diante-se do explanado, os resultados aqui apresentados confirmam, que o processo reacional desenvolvido promoveu a modificação da superfície da *Spectrogel tipo C* após a glicerólise enzimática.

Figura 15 – Espectros de FTIR. a) argila Spectrogel® Tipo C, antes e após tratamento com H₂O₂ e HCl, e com a ativação ácida. b) argila Spectrogel® Tipo C após a glicerólise enzimática.

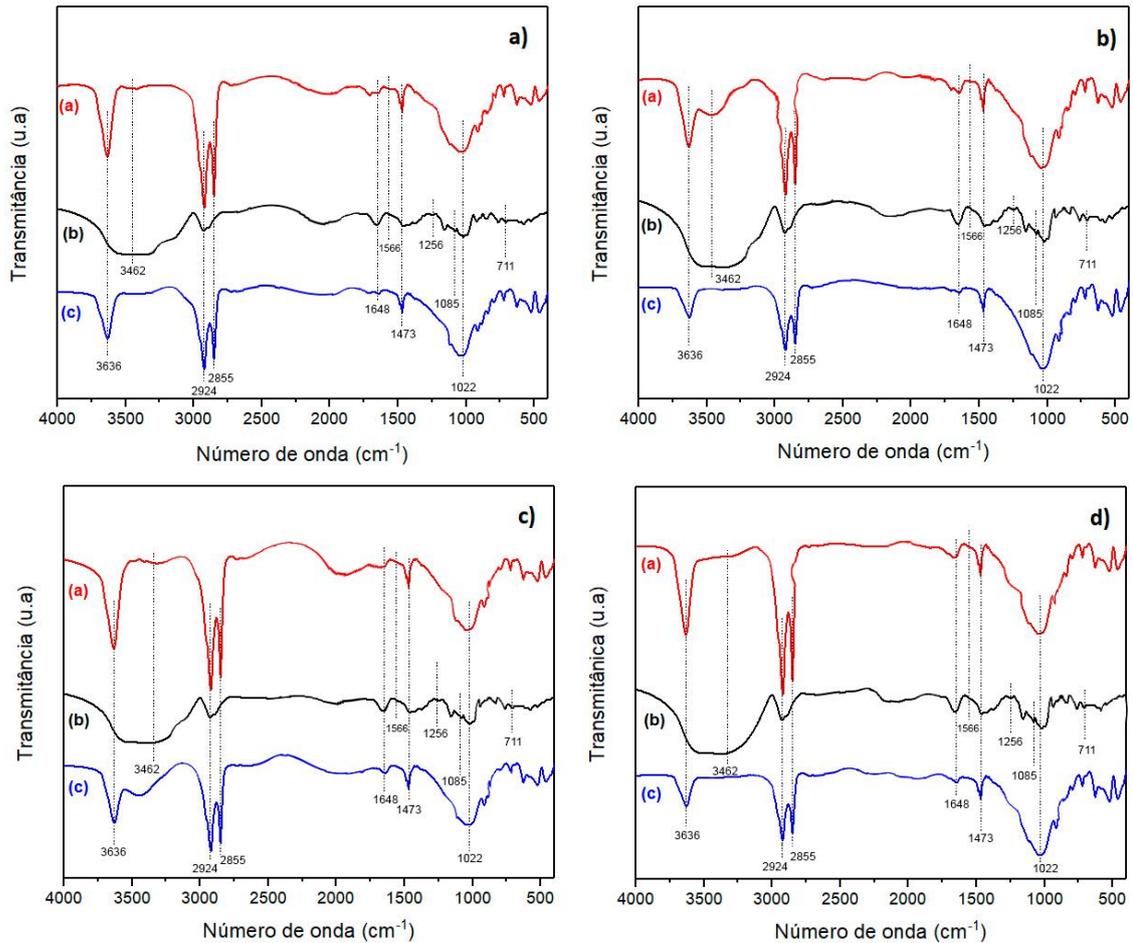


Fonte: O autor.

Com base nos resultados obtidos (Figura 15) e nas pesquisas da área, observa-se então que a ativação ácida é mais utilizada que a básica, visto que trata-se de um método eficiente para a adsorção da enzima até mesmo em escalas industriais. Então, se escolheu uma metodologia propícia para que seja testada com a reação de glicerólise enzimática.

A Figura 16 mostra que as bandas presentes na argila antes e depois da imobilização são semelhantes e apresentam deslocamentos discretos e intensidade de banda e estão relacionados à banda da *Lipozyme TL100L*.

Figura 16 – Espectros de FTIR nas reações de glicerólise. a) Biocatalisador por adsorção em argila Spectrogel® tratada; b) Replicata do teste “a” c) Biocatalisador por adsorção em argila Spectrogel® tratada após a glicerólise entimática; d) Biocatalisador por adsorção em argila Spectrogel® após reciclo da enzima.



Fonte: O autor.

A banda da amida I (Figura 16) está normalmente entre $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ e representa as vibrações de estiramento C=O e a deformação angular N-H (DIAS et al., 2018; ZHOU et al., 2012). Pode se observar, o espectro da lipase livre, com a banda característica de amida I está em aproximadamente 1648 cm^{-1} . Enquanto a banda de amida II observa-se em 1566 cm^{-1} (Figura 16).

De acordo com Zhou et al. (2012) os autores citam que a banda de amida II gira em torno de 1550 cm^{-1} devido às vibrações no plano N-H e ao estiramento C-N, e aproxima-se bastante do resultado obtido no presente trabalho. Tal confirmação

também se dá no trabalho de Andrade et al. (2010), que encontraram em seus espectros de FTIR da lipase como banda característica da amida I em 1648 cm^{-1} , e para a amida II em 1566 cm^{-1} . Verifica-se essas bandas nos espectros dos derivados imobilizados, ou seja, revela-se a presença desses grupos, sendo mais evidente nos biocatalisadores imobilizados em suporte tratado e para o método de adsorção. Portanto, é possível analisar pela Figura 16 que a intensidade aumentou principalmente no pico de 1648 cm^{-1} referente a amida I, provavelmente como resultado da imobilização da lipase.

Segundo Mathpati et al. (2017) a banda de amida III é atribuída a estiramento C-C, C-N e vibrações de deformação angular N-H encontrada entre $1300\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$. Quanto a amida IV, no trabalho de Barbosa et al. (2016) está em 695 cm^{-1} . No caso deste trabalho a amida III e IV para a lipase estão por volta de 1256 cm^{-1} e 711 cm^{-1} . Nas bandas de amida III e IV, Zhou et al. (2012) encontraram em torno de 1285 e 726 cm^{-1} , respectivamente. Ressalta-se que nos biocatalisadores a presença dessas bandas pode estar sobreposta, uma vez que, não são tão evidentes como as demais, por conta das estruturas identificadas nas Figuras 15 e 16 (MATHPATI et al., 2017).

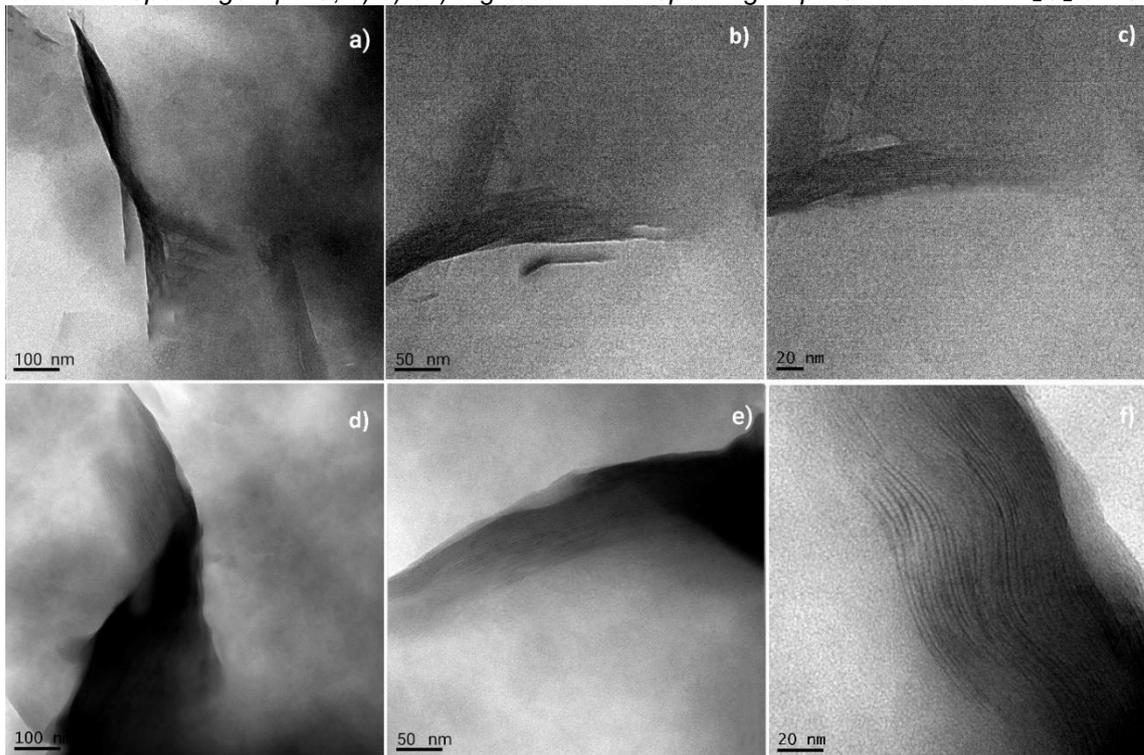
Constata-se que o pico em 1085 cm^{-1} está associado às vibrações compostas C-C e C-N da cadeia proteica (ZHOU et al., 2012). De acordo com Dias et al., (2018) a banda em 1022 cm^{-1} , é atribuída à ligação C-N e pode confirmar a presença da amida, assim como a banda em 3636 cm^{-1} e 3462 cm^{-1} também são atribuídas ao estiramento N-H da amida, sugerindo que este grupo tem presença e que os grupos hidroxila formam pontes de hidrogênio com a lipase (YIGITOGLU & TEMOCIN, 2010).

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Realizou-se as análises de microscopia eletrônica de transmissão para a análise das características estruturais para o suporte de argila comercial Spectrogel® e para a argila Spectrogel® tratada com H_2O_2 e HCl.

Observa-se as micrografias obtidas (Figura 17), e analisando pode-se perceber camadas da estrutura intercalada. Tal fato está de acordo com Machado (2016) onde as linhas escuras indicam a espessura das lamelas, que quando em conjunto se encontram afastadas umas das outras pela distância interplanar. A visualização individual é facilitada quando há esfoliação, ou seja, a dispersão das lamelas.

Figura 17 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão. Para: a), b) e c) argila comercial *Spectrogel tipo C*; d) e) e f) argila comercial *Spectrogel tipo C* tratada com H_2O_2 e HCl



Fonte: O autor.

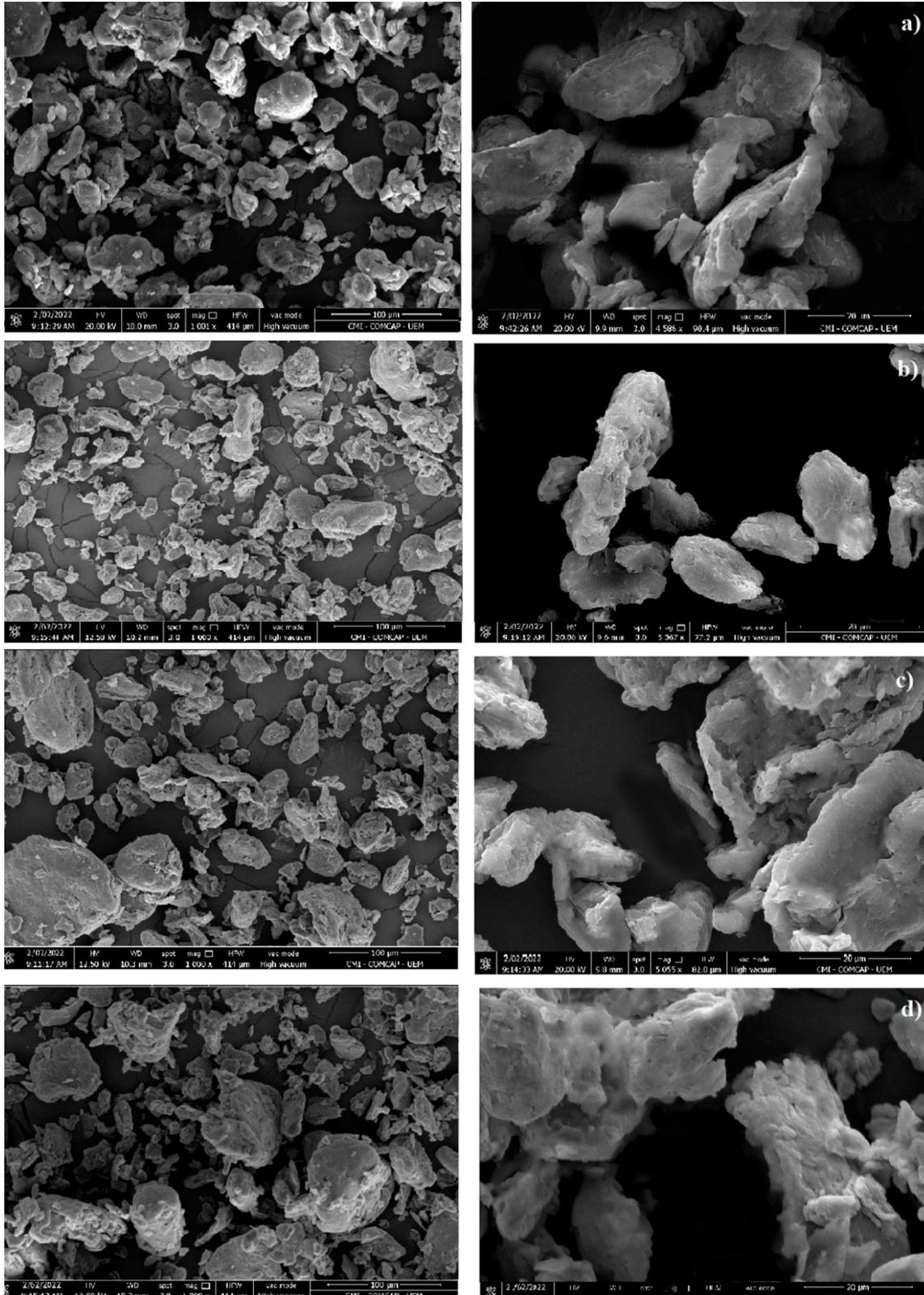
Também pode ser verificado, a partir da Figura 17, que não houveram mudanças significativas quando a argila foi tratada (Figura 17 - d, e, f), mencionando que este tratamento não danifica significativamente a estrutura da argila, apenas é possível observar que contém alguns subparalelos e terminação de camadas.

As imagens MET geralmente capturam algumas partes mais turvas da argila. Kuwamura et al., (2013) afirmam que as partículas de argila, especialmente a bentonita, se unem para formar grandes aglomerados quando secas. Existem, portanto, partes mais escuras devido a agregados argilosos com partículas muito pequenas que mascararam o tamanho e a forma reais, dificultando a visualização detalhada do tamanho e da morfologia das partículas.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 18 analisa as micrografias eletrônicas de varredura para: (a) Spectrogel® Tipo C, (b) Spectrogel® após ativação ácida, (c) Spectrogel® tratada (H_2O_2 e HCl) e (d) Spectrogel® após ativação ácida, com aumentos de de 1000x e 5000x.

Figura 18 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura: (a) Spectrogel® Tipo C, (b) Spectrogel® ativada, (c) Spectrogel® tratada (H₂O₂ e HCl) e (d) Spectrogel® com aumentos de de 1000x e 5000x



Fonte: O autor.

É possível observar na Figura 18 a irregularidade de superfície e de tamanho das partículas. Esse comportamento se deve a formação de aglomerados devido ao empilhamento das camadas octaédricas nos minerais da argila comercial (MANZOTTI & SANTOS, 2019).

Este fato pode estar relacionado à adição de sais tensoativos aplicados na preparação de solos organofílicos. Observou-se no trabalho de Paiva et al. (2008b), que o processo de intercalação com sais quaternários aumentou a tendência à formação de aglomerados.

Aglomerados podem confirmar a análise de fisissorção de N_2 , mostrando sólidos formados por agregados não rígidos de partículas em forma de placa, esclarecendo a existência de mesoporos. As ondulações indicam o empilhamento das camadas, porém pela fotomicrografia obtida não é possível identificar a presença de poros pois o material é não poroso ou macroporoso.

As imagens (b) e (d) da Figura 18 são mais brancas e suaves. Nota-se na imagem que a morfologia da argila sem tratamento (a), é muito próxima da argila com o tratamento feito com H_2O_2 e HCl, indicando que o tratamento não afetou a estrutura da argila, pois não houveram mudanças significativas na morfologia das partículas.

4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS MICROEMULSÕES DAS ENZIMAS LIVRES

As condições experimentais empregadas foram baseadas no estudo realizado por Fiametti (2009), dessa maneira foram conduzidos a $45^\circ C$, com uma razão molar glicerol: azeite de oliva de 2:1, 7,5 % (m/m) de enzima imobilizada pelo período de 2 horas de reação. Na Tabela 10, são descritas as quantidades de reagentes utilizados, inclusive nas MO. Avaliou-se o volume de enzima a 7,5 % do valor do substrato, baseando-se nos dados reportados por Fiametti (2009).

Tabela 10 – Testes com as microemulsões e suas proporções.

Ensaio	Glicerol (mL)	Azeite (%/mL)		Água (%/mL)		Tween (%/mL)		Butanol (mL)	Substrato (mL)	Enzima (mL)	MO
1	0,60	1,64	0,30	9,84	1,80	19,67	3,60	12,00	18,30	1,37	
2	0,60	1,64	0,30	9,84	1,80	19,67	3,60	12,00	18,30	1,37	
3	0,60	1,72	0,30	1,72	0,30	31,03	5,40	10,80	17,40	1,31	X
4	1,20	3,23	0,60	3,23	0,60	29,03	5,40	10,80	18,60	1,40	
5	1,20	3,03	0,60	9,09	1,80	27,27	5,40	10,80	19,80	1,49	
6	1,20	3,33	0,60	8,33	1,50	21,67	3,90	10,80	18,00	1,35	X
7	1,20	3,49	0,60	8,72	1,50	22,67	3,90	10,00	17,20	1,29	X
8	0,60	1,84	0,30	3,68	0,60	29,45	4,80	10,00	16,30	1,22	
9	0,60	1,85	0,30	5,56	0,90	29,63	4,80	9,60	16,20	1,22	X
10	0,60	1,75	0,30	10,53	1,80	28,07	4,80	9,60	17,10	1,28	
11	1,20	3,57	0,60	3,57	0,60	28,57	4,80	9,60	16,80	1,26	X
12	0,60	1,92	0,30	7,69	1,20	28,85	4,50	9,00	15,60	1,17	X
13	1,20	3,64	0,60	7,27	1,20	27,27	4,50	9,00	16,50	1,24	
14	1,20	3,70	0,60	5,56	0,90	27,78	4,50	9,00	16,20	1,22	X
15	1,80	5,36	0,90	3,57	0,60	26,79	4,50	9,00	16,80	1,26	X
16	2,40	6,90	1,20	1,72	0,30	25,86	4,50	9,00	17,40	1,31	X
17	2,40	7,14	1,20	3,57	0,60	25,00	4,20	8,40	16,80	1,26	
18	0,60	2,00	0,30	10,00	1,50	28,00	4,20	8,40	15,00	1,13	X
19	0,60	2,08	0,30	10,42	1,50	29,17	4,20	7,80	14,40	1,08	
20	0,60	2,08	0,30	12,50	1,80	27,08	3,90	7,80	14,40	1,08	X
21	1,20	4,55	0,60	2,27	0,30	29,55	3,90	7,20	13,20	0,99	
22	0,60	2,22	0,30	13,33	1,80	26,67	3,60	7,20	13,50	1,01	X
23	1,80	6,38	0,90	4,26	0,60	25,53	3,60	7,20	14,10	1,06	
24	2,40	8,39	1,20	2,10	0,30	25,17	3,60	6,80	14,30	1,07	

Fonte: O autor.

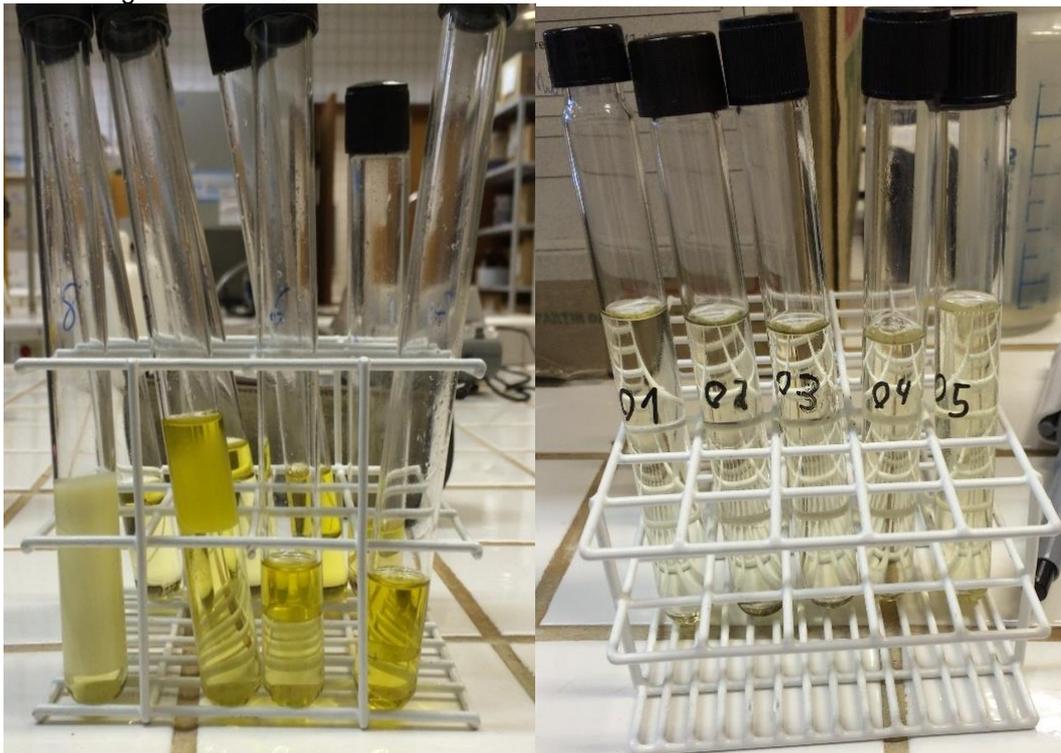
Dos testes acima citados (Tabela 10), os pontos que formaram microemulsões estáveis foram os seguintes: 3,6,7,9,11,12,14,15,16,18,20,22. Eles apresentaram estabilidade após o período de descanso de 48 horas e foram submetidos à glicerólise enzimática imobilizada, a fim de avaliar o fator de conversão dessas reações para, posteriormente, formar-se um planejamento fatorial com base nesses resultados.

Nas condições avaliadas, algumas não se mostraram apropriadas para formar as microemulsões, pois não apresentaram homogeneidade e translucidez e, por consequência, estruturas instáveis para promover a reação de glicerólise enzimática. No entanto ocorreu a formação de 12 pontos diferentes de MO e estes pontos se mantiveram estáveis durante um período de 48 horas, após este período, é que estas

foram submetidas à glicerólise enzimática a fim de observar a eficiência da conversão de TAG em MAG e DAG.

No trabalho realizado por Hu et al. (2013), os autores produziram DAG de cadeias médias a partir da glicerólise, no entanto ressaltam que, para a obtenção da formação destes pontos de emulsões, várias foram as tentativas para conseguir-se pontos ótimos e que, então, pudesse ser realizado o procedimento da reação. É importante enfatizar que somente as MO que se mostraram homogêneas e límpidas foram utilizadas. Na Figura 19, são apresentados os resultados das amostras que não apresentaram essa estrutura de um sistema microemulsionado, por não existir o equilíbrio entre as fases e não demonstraram estabilidade para que, então, a enzima comercial *Lipozyme TL 100L* pudesse agir e realizar a conversão do TAG em MAG e DAG.

Figura 19 – Tentativas de microemulsões malsucedidas / bem-sucedidas.



Fonte: O autor.

De acordo com a Figura 19, nota-se uma ausência do comportamento de formação das microemulsões, pois não foram apenas os pontos com menor concentração de surfactantes que não formaram microemulsões estáveis, isto é, devido à complexidade do sistema que envolve: solvente, óleo, água, surfactante e co-surfactante (NICHOLSON, 2021).

A não formação da MO de forma homogênea se dá por diversos fatores, sejam estes ocasionados pelo excesso de água na emulsão caracterizada por A/O, sejam pela não compatibilidade dos reagentes do diagrama ternário, bem como pela presença excessiva de óleo e pouca água, ou ainda pela parcialidade na formação de emulsão resultante da falta de área de superfície dos reagentes e, por fim, pelo excesso de surfactante e/ou co-surfactante, de acordo com a metodologia sugerida por Karleskind (1996) e Pescara (2016).

4.4 CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DAS MICROEMULSÕES

A massa de azeite de oliva adicionada em cada uma das MO formadas foi determinada por meio de pesagem em balança analítica, com o objetivo de se conhecer a concentração de TAG nas amostras no início da reação de glicerólise enzimática e os valores das concentrações médias obtidas são apresentados na Tabela 11. No cálculo, considerou-se que o azeite era constituído exclusivamente de TAG.

Tabela 11 – Cálculo de concentração de TAG das MO's formadas.

Ensaio	Volume Total das MO na reação (mL)	Volume Azeite (mL)	Massa Azeite (g)	Concentração (g.L ⁻¹)
3	17,40	0,30	0,28	16,09
6	18,00	0,30	0,28	15,56
7	17,20	0,60	0,55	31,98
9	16,20	0,30	0,28	17,28
11	16,80	0,60	0,55	32,74
12	15,60	0,30	0,28	17,95
14	16,20	0,60	0,55	33,95
15	16,80	0,90	0,83	49,40
16	17,40	1,20	1,10	63,22
18	15,00	0,30	0,28	18,67
20	14,40	0,30	0,28	19,44
22	13,50	0,30	0,28	22,22

Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na Tabela 11 demonstraram que a faixa de concentração de TAG ficou entre 16 e 63 gL⁻¹. Essa informação é fundamental na padronização das amostras no que se refere aos termos de concentração, pois uma vez que se respeitou os valores da curva de calibração, a diluição das amostras mais

concentradas foi realizada para se obter concentrações próximas a 30 gL⁻¹. Essas diluições foram feitas a partir da diluição das amostras mais concentradas, tal qual foi feito para a curva de calibração. Segundo Hu et al. (2013), esse processo de diluição é fundamental para respeitar os valores na faixa de obtenção da curva de calibração.

4.5 RESULTADOS DA GLICERÓLISE ENZIMÁTICA DAS MO UTILIZANDO ENZIMAS LIVRES E IMOBILIZADAS

Foi realizado o monitoramento do pH das microemulsões durante os 120 minutos de reação, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. Observa-se que houve uma baixa variação do pH durante a reação, tanto para as enzimas livres quanto para as imobilizadas. Esse comportamento é importante para a atuação da enzima, pois, em variações elevadas do pH, poderiam resultar até na inativação da enzima e, assim, inviabilizar a produção de MAG e TAG ao longo do tempo. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Muller (2013), que investigou a glicerólise enzimática do óleo de peixe (Savelha) utilizando a Lipozyme® RM IM como biocatalisador e Tween 65, 80 e 85 como surfactantes. Neste estudo, observou-se que a variação do pH durante a glicerólise também foi baixa e se manteve em uma faixa de 6,5 a 7,5.

Tabela 12 – Monitoramento do pH durante a glicerólise enzimática das enzimas livres.

Amostra	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
3	6,9	7,2	7,2	7,1	7,0
6	6,9	7,1	6,9	6,7	6,7
7	7,4	7,1	7,1	7,2	7,1
9	6,7	6,7	6,8	6,8	7,0
11	7,0	7,1	7,0	7,0	6,9
12	7,3	7,2	7,2	7,2	7,2
14	6,9	6,9	6,9	7,0	6,9
15	6,8	7,0	6,9	6,9	6,8
16	7,0	7,2	7,1	7,1	7,1
18	7,2	7,1	7,0	7,1	7,1
20	7,3	7,1	6,9	6,9	7,1
22	6,6	6,9	7,0	6,7	6,7

Fonte: O autor.

Tabela 13 – Controle do pH durante a glicerólise enzimática com a utilização das enzimas imobilizadas.

Amostra	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
3	6,8	7,1	7,1	7,0	6,9
6	6,9	7,1	7,0	6,9	6,8
7	7,3	7,2	7,2	7,1	7,0
9	6,6	6,6	6,7	6,7	6,8
11	7,0	7,2	7,1	7,0	7,1
12	7,2	7,3	7,2	7,1	7,1
14	6,9	6,8	6,9	7,0	7,1
15	6,8	6,9	7,0	7,1	6,9
16	6,9	7,1	7,0	7,0	7,0
18	7,1	7,0	7,1	7,0	6,9
20	7,3	7,2	7,0	7,0	6,9
22	6,5	6,6	6,7	6,8	6,8

Fonte: O autor.

Após a calibração do CLAE e devidamente estabilizado nas condições pré-determinadas e anteriormente descritas na sessão 3.12.2, realizou-se a determinação da concentração de TAG, DAG e MAG após 120 minutos de tempo reacional de todas microemulsões estáveis. Todas as amostras foram devidamente diluídas para se enquadrarem na faixa de leitura das curvas de calibração. Os resultados dos padrões da curva de calibração e do cromatograma estão apresentados no apêndice A deste trabalho. Os resultados, em função da área de pico dos compostos MAG, DAG e TAG, estão apresentados no apêndice B.

Realizou-se o cálculo de rendimento destes compostos por duas maneiras distintas: pelas áreas dos picos dos padrões de MAG, DAG e TAG presentes no trabalho e pelas curvas de calibração, sendo assim a área de pico escolhida para demonstrar a formação de MAG, DAG em função da quebra dos TAG graficamente, visto que se utilizou uma quantidade parcial dos padrões existentes no azeite de oliva.

No entanto, é possível compreender que, pela curva de calibração, tem-se uma maior confiabilidade de qual composto foi formado e, conseqüentemente, em qual concentração ele está presente em cada MO. Dessa forma, aplicou-se ambas as técnicas no estudo das análises para verificar se existe equivalência entre estas duas técnicas. Para a obtenção dos resultados em termos de eficiência através do cálculo pela área de pico pela região dos MAG e DAG formados e, assim, foi possível a mensuração da taxa de catálise dos TAG.

A metodologia de cálculo baseada nas áreas dos picos pode ser empregada na análise de diferentes compostos químicos que empregam a CLAE, por exemplo, o trabalho desenvolvido por Silva (2017a), que determinou polioli produzido a partir da catálise enzimática óleo de andiroba. A quantificação das amostras deste trabalho empregou o mesmo equipamento usado no presente trabalho, com uma metodologia muito semelhante.

Cabral (2014) desenvolveu um estudo para a determinação da cinética da glicerólise do azeite de oliva em reator batelada com um tempo de reação de 24 horas na ausência e presença de biocatalisadores. Estipulou-se área do cromatograma para a quantificação de MAG, DAG e TAG e empregaram-se alguns padrões do óleo de oliva (monooleína pureza >99%, dioleína > 99% e trioleína >99) semelhante à metodologia adotada nesta presente pesquisa, que objetivou o monitoramento da conversão de TAG. Os resultados obtidos pelo autor foram inferiores, ele conduziu os testes em batelada e obteve valores de conversão muito menores quando comparados aos ensaios sem catalisador, na faixa de 5% de MAG, 10% de DAG, 40% de TAG e 45% de ácidos graxos livres, enquanto o presente estudo conseguiu uma eficiência de conversão acima de 90%, visto que os objetivos foram diferentes.

4.5.1 Eficiência de conversão pela área de pico

Os resultados para a conversão e eficiência de cada amostra estão apresentados no apêndice B. Observa-se que a quantidade de MAG formada foi superior à de DAG, isso nos confirma uma produção de MAG 300% superior quando comparado à produção de DAG, como, por exemplo, no caso das MO 7, 9, 14 e 18. Também é possível analisar que a porcentagem mássica de MAG mostrou-se, mais uma vez, superior aos resultados de DAG, demonstrado Tabelas 14 e 15.

Esses resultados são promissores e mostram que a eficácia da enzima na reação de glicerólise, dessa maneira, acontece a formação de compostos menos complexos e que tem propriedade emulsificante, no entanto é indicado que estudos posteriores de aplicabilidade em nichos farmacêuticos, alimentícios e talvez automotivos sejam realizados para, então, ser colocados em teste para identificar se estes podem ser usados em indústrias e, assim, substituir os emulsificantes comerciais que atualmente são utilizados no mercado de trabalho (JALA et al., 2016).

Tabela 14 – Eficiência de conversão mássica para cada microemulsão formada com a enzima imobilizada.

MO	MAG	DAG	TAG	Eficiência (%)
3	0,5121	0,2312	0,2567	74,33
6	0,5745	0,2216	0,2039	79,61
7	0,6121	0,1945	0,1934	80,66
9	0,6545	0,2012	0,1443	85,57
11	0,5312	0,2314	0,2374	76,26
12	0,5842	0,2136	0,2022	79,78
14	0,6834	0,2299	0,0867	91,33
15	0,5485	0,2216	0,2299	77,01
16	0,5193	0,2295	0,2512	74,88
18	0,6632	0,2103	0,1265	87,35
20	0,5295	0,2398	0,2307	76,93
22	0,5921	0,2208	0,1871	81,29

Fonte: O autor.

Os resultados da Tabela 14 mostram que foram obtidas elevadas eficiências de conversão, com valores superiores a 74%. Entretanto, é importante destacar que a MO número 14 obteve eficiência de 91,33%, demonstrando uma conversão de TAG em MAG e DAG, destacando-se pela superioridade. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Wang et al. (2016), que investigaram a reação de glicerólise empregando a lipase MAS1 imobilizada e obtiveram conversões superiores a 80%. Ressalta-se que os autores não utilizaram meio emulsionado no sistema, e sim promoveram a reação de 10 g do substrato livre em meio reacional com utilização da glicerólise enzimática imobilizada, tal qual a quantificação dos autores, que também se decorreu por CLAE.

Tabela 15 – Eficiência de conversão mássica para cada microemulsão formada com a enzima livre.

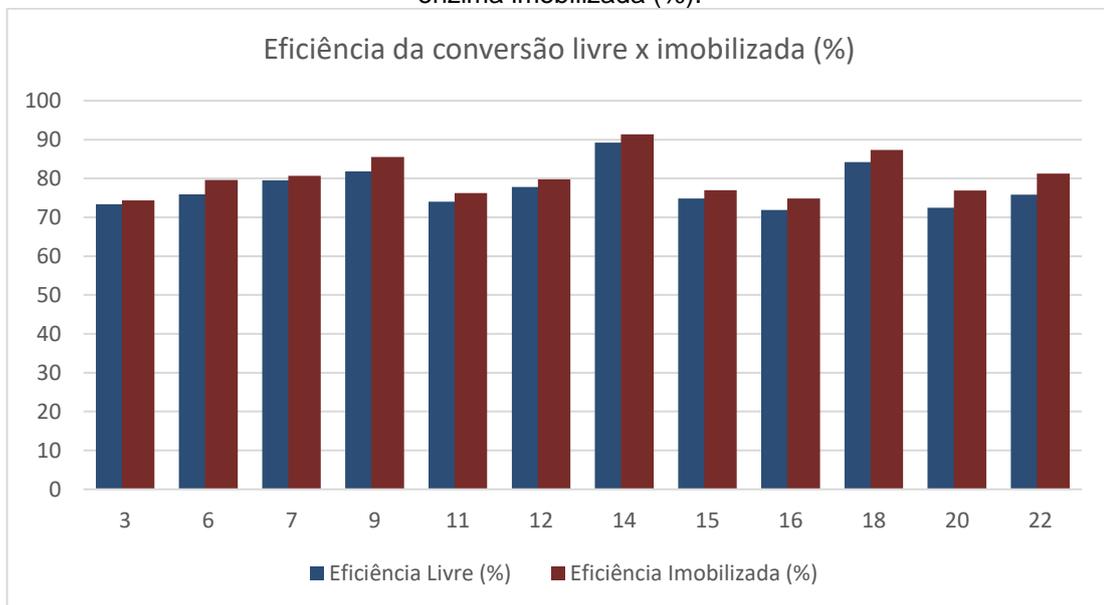
MO	MAG	DAG	TAG	Eficiência (%)
3	0,4915	0,2418	0,2946	73,33
6	0,5247	0,2345	0,2614	75,92
7	0,5942	0,2014	0,2049	79,56
9	0,6127	0,2054	0,1542	81,81
11	0,5014	0,2387	0,2541	74,01
12	0,5564	0,2214	0,2342	77,78
14	0,6614	0,2312	0,1004	89,26
15	0,5342	0,2145	0,2354	74,87
16	0,5017	0,2174	0,2641	71,91
18	0,6418	0,2001	0,1451	84,19
20	0,5112	0,2134	0,2487	72,46
22	0,5641	0,1945	0,2021	75,86

Fonte: O autor.

Para comparar a conversão de TAG em MAG e DAG entre as enzimas livre e imobilizada (Tabelas 14 e 15), em parâmetros de porcentagem de conversão e dos valores de MAG, DAG e TAG, são apresentadas a seguir, as Figuras 20 e 21, respectivamente. Analisando-se estas figuras, verifica-se a eficiência das enzimas imobilizadas em relação à enzima livre, com relação à conversão em produtos, onde o eixo “x” refere-se a MO e o eixo “y” a porcentagem de conversão (Figura 20) e o fator de conversão para cada região (Figura 21).

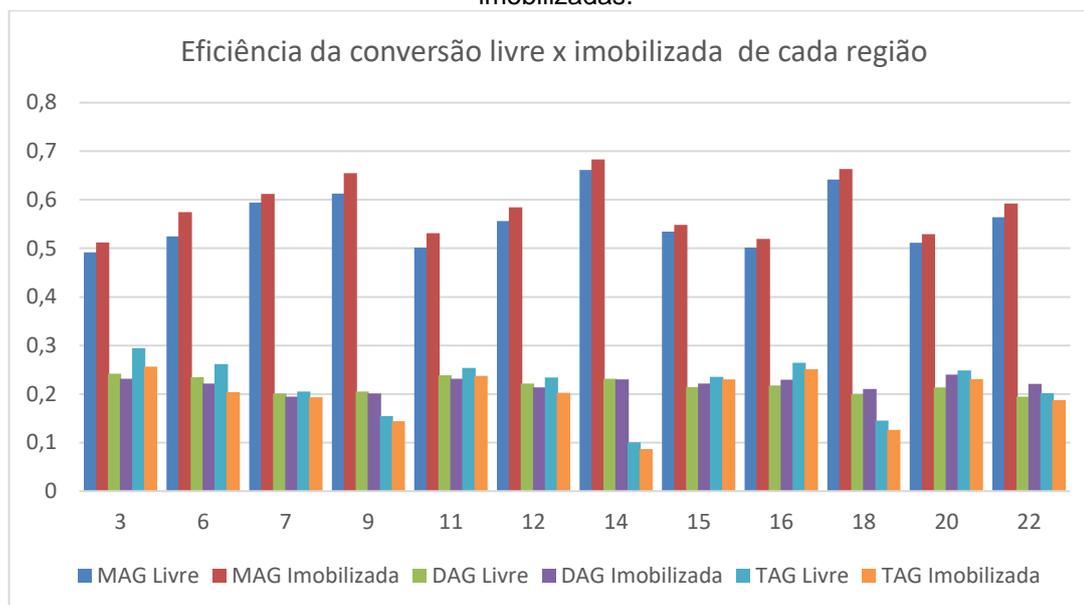
Esses fatores são de suma importância para realizar a comparação da conversão entre as enzimas livres e imobilizadas e graficamente percebe-se que com a enzima imobilizada, como pressuposto, a conversão é maior do que com a enzima livre. Visto posto, que ambas as condições experimentais são as mesmas e a variável que será abordada adiante, imobilização da enzima, é extremamente importante para a otimização da reação. Esse fato confirma o que foi trazido até agora e reitera a relevância do monitoramento das condições processuais para um melhor fator de conversão.

Figura 20 – Comparação da eficiência de conversão de TAG em MAG e DAG da enzima livre e da enzima imobilizada (%).



Fonte: O autor.

Figura 21 – Comparação da eficiência da conversão de TAG em MAG e DAG das enzimas livres e imobilizadas.

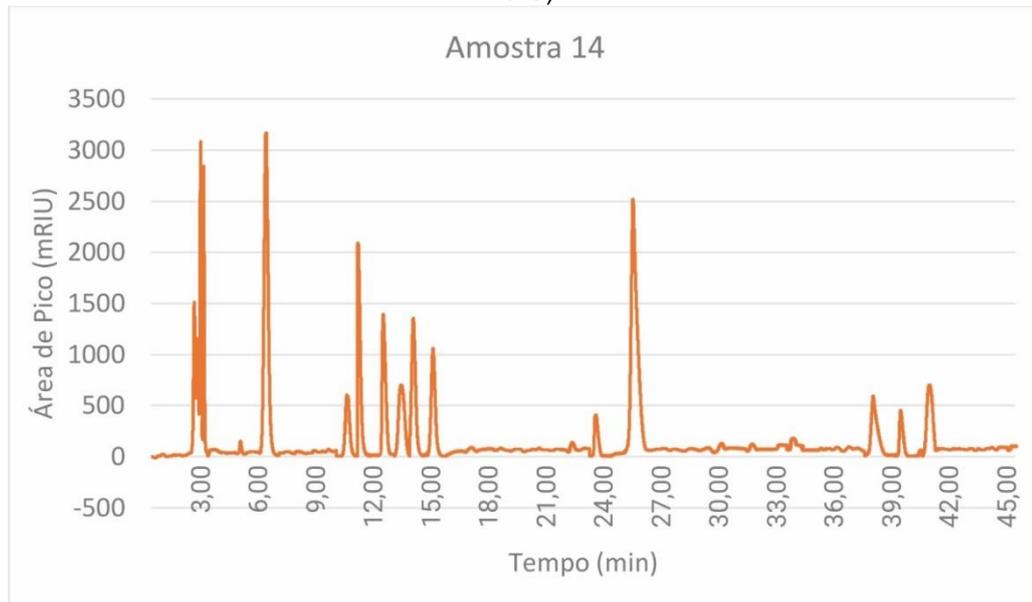


Fonte: O autor.

Analisando os resultados de eficiência apresentados na Tabela 15, nota-se que, na reação de glicerólise conduzida com a Lipozyme TL100L de forma livre, obteve-se valores inferiores aos do que com a enzima imobilizada em Spectrogel. Esse comportamento é esperado, pois, na maioria dos casos, a utilização do suporte tende a fornecer melhores condições para que a enzima atue na glicerólise (MOLINARI, 2020). Percebe-se, também, que os valores de produção de DAG empregando as enzimas livres e imobilizadas foram equivalentes.

Esses resultados de conversão e produção de DAG mostram que a reação foi realizada em condições adequadas de temperatura e pH, favorecendo a atividade enzimática. Verificou-se, também, que o tempo de reação e quantidade de enzima empregada foram adequados para o estudo das reações. Dessa maneira, entende-se que a metodologia utilizada nesta pesquisa para conduzir a reação de glicerólise enzimática foi adequada. Para ilustrar as análises realizadas para determinação do teor de MAG, DAG e TAG, é apresentado, na Figura 22, o cromatograma para a condição experimental: MO 14: razão molar glicerol:azeite na proporção de 2:1, 7,5% (m/m) de enzima, com duas horas de reação, com temperatura de 45°C.

Figura 22 – Cromatograma área de pico x tempo da Amostra 14 (Razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C).



Fonte: O autor.

Os resultados obtidos por Kruger (2010) foram semelhantes aos deste estudo (Figura 22) da reação enzimática da glicerólise do azeite de oliva. O autor obteve um cromatograma, sendo o primeiro pico de solvente, seguido do pico de glicerol em, aproximadamente, 6 minutos, seguidos dos MAG de 10 a 17 minutos, DAG 25 a 30 minutos e, por fim, os TAG de 41 a 46 minutos. No entanto, os valores obtidos para os parâmetros de eficiências do presente trabalho foram superiores ao do trabalho de Kruger (2010), que, na condição ótima, obteve conversão de 73%.

Solaesa et al. (2017) investigaram a reação de glicerólise do óleo de sardinha por meio da Lipozyme 435 imobilizada em suporte de resina acrílica hidrofóbica e realizaram a quantificação de produção do MAG, DAG e TAG, apenas pelas áreas de picos da região do cromatograma, com conversão de, aproximadamente, 25% de MAG e 50% de DAG e uma conversão total de 75%. Esse resultado foi obtido numa faixa de temperatura de 50°C e foi utilizado como a principal referência para a fundamentação das técnicas empregadas no presente trabalho.

Valério (2009) investigou a glicerólise enzimática de óleo de oliva usando surfactantes alimentícios e em sistema livres de solventes empregando a lipase Novozym 435. Os valores na condição ótima são: razão molar 6:1 (glicerol: óleo), 16% de surfactante e 9% de enzima imobilizada com temperatura de 70°C e 2 horas de reação forneceram eficiência de, aproximadamente, 90% de conversão de TAG em MAG e DAG.

4.5.2 Eficiência de conversão pela curva de calibração

Na determinação da concentração dos compostos, temos: Ácido linoleico, glicerol trilinoleico, ácido oleico, monopalmitico, glicerol trioleico e ácido dilinoleico (sendo PD1 a PD6, respectivamente) nas amostras, utilizou-se as equações das retas apresentadas no apêndice A, das curvas de calibração de cada padrão. Constata-se que as amostras reagiram pelo método da glicerólise enzimática. Nos cromatogramas, observa-se que, nos tempos de retenção de cada padrão, surgiu um pico e, a partir da sua área e da respectiva equação, foi possível a determinação da concentração em cada amostra.

Nas Tabelas 16, 17 e 18, é possível observar onde os valores de AP, PD e C (AP sendo a área de pico de cada padrão; PD padrão utilizado e C a concentração de cada padrão) significam área de pico (mRIU), padrão e concentração (g L^{-1}), respectivamente. O cálculo da concentração de TAG, DAG e MAG foi feito a partir das equações das retas obtidas dos padrões, em que se substitui o valor de “y” a partir das áreas dos picos de cada padrão e obteve-se o valor de “x”, que representa a concentração de cada padrão de acordo com a curva de calibração que foi construída. Tais dados são apresentados na Tabela 16.

Os valores de coeficientes de determinação para a obtenção da curva padrão foram considerados elevados, todos próximos ao valor unitário, caracterizando, assim, um bom ajuste do modelo bem linear, importante ressaltar que todos os tempos de retenção foram respeitados de acordo com a ordem que deveriam sair pelas interações entre coluna e fase móvel. Tal qual, a equação da reta de cada padrão que foi utilizada para a determinação da concentração obtida e descrita na Tabela 17, por meio dos valores dos picos dos padrões da Tabela 18, das MO com enzimas imobilizadas.

Tabela 16 – Padrões utilizados, equação da reta e tempos de retenção.

	Padrão	Equação da Reta	R²	T' Retenção (min)
PD1	Ácido linoleico	$y = 266,11x - 266,22$	0,99989	11,55
PD2	Ácido oleico	$y = 127,45x - 126,51$	0,9996	13,06
PD3	Ácido monopalmitico	$y = 177,24x - 176,82$	0,99744	14,51
PD4	Ácido dilinoleico	$y = 226,53x - 227,52$	0,99937	27,38
PD5	Trioleína	$y = 159,73x - 162,15$	0,9956	41,28
PD6	Trilinoleína	$y = 184,12x - 181,7$	0,9998	44,65

PD: Padrão.

Fonte: O autor.

Tabela 17 – Área de pico de cada padrão para cada amostra imobilizada.

Amostra	AP PD1	AP PD2	AP PD3	AP PD4	AP PD5	AP PD6
3	900,46	883,12	960,77	934,36	298,28	315,64
6	996,25	1102,11	1078,24	1007,64	302,78	343,21
7	2098,59	1987,61	2202,64	2210,36	254,31	281,25
9	1156,12	989,37	1201,28	1055,43	167,63	190,19
11	2249,42	2127,39	2493,14	2416,24	143,63	170,39
12	1198,17	1086,39	1265,97	1279,81	213,15	240,67
14	2314,78	2186,47	2536,18	2458,61	46,78	49,45
15	1795,13	1682,14	1977,59	1981,68	305,17	339,42
16	1781,67	1676,39	1934,81	2007,28	293,68	313,28
18	1183,37	1001,37	1226,29	1297,97	304,28	338,67
20	1317,57	1201,38	1483,91	1483,47	259,5	298,64
22	1251,28	1138,41	1355,57	1534,24	312,14	348,62

AP PD: Área de pico do padrão

Fonte: O autor.

Tabela 18 – Concentração de cada padrão pós-glicerólise enzimática imobilizada.

Amostra	C PD1	C PD2	C PD3	C PD4	C PD5	C PD6	Eficiência (%)
3	2,38	5,94	4,42	3,12	0,85	0,73	74,96
6	2,74	7,65	5,09	3,44	0,88	0,88	80,16
7	6,89	14,60	11,43	8,75	0,58	0,54	80,57
9	3,34	6,77	5,78	3,65	0,03	0,05	85,40
11	7,45	15,70	13,07	9,66	0,21	0,06	76,85
12	3,50	7,53	6,15	4,65	0,32	0,32	79,26
14	7,70	16,16	13,31	9,85	0,73	0,72	91,11
15	5,75	12,21	10,16	7,74	0,90	0,86	75,89
16	5,69	12,16	9,92	7,86	0,82	0,71	75,72
18	3,45	6,86	5,92	4,73	0,89	0,85	86,59
20	3,95	8,43	7,37	5,54	0,61	0,64	75,62
22	3,70	7,94	6,65	5,77	0,94	0,91	81,87

C PD: Concentração do padrão

Fonte: O autor.

Os mesmos testes foram feitos para a glicerólise empregando a enzima livre e estes resultados são apresentados nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19 – Área de pico de cada padrão para cada amostra livre.

Amostra	AP PD1	AP PD2	AP PD3	AP PD4	AP PD5	AP PD6
3	859,13	901,67	926,66	860,73	326,32	295,03
6	917,75	1182,67	998,88	941,84	301,93	337,92
7	1919,58	1981,85	2150,66	2108,90	273,13	271,27
9	1091,03	1198,52	1154,91	1039,18	209,17	182,85
11	2102,53	2284,82	2454,75	2210,13	174,37	160,69
12	1109,98	1318,88	1166,21	1207,76	239,58	228,95
14	2232,61	2284,86	2393,39	2363,71	44,97	45,55
15	1725,84	1890,73	1865,07	1812,64	304,29	320,11
16	1754,23	2091,80	1840,58	1915,15	306,90	305,89
18	1125,74	998,57	1146,21	1202,44	326,52	326,65
20	1286,48	1314,31	1374,69	1386,60	264,95	284,93
22	1180,08	1248,84	1334,69	1459,52	324,94	338,58

AP PD: Área de pico do padrão

Fonte: O autor.

Tabela 20 – Concentração de cada padrão pós-glicerólise enzimática livre.

Amostra	C PD1	C PD2	C PD3	C PD4	C PD5	C PD6	Eficiência (%)
3	2,23	6,08	4,23	2,80	1,03	0,62	71,43
6	2,45	8,29	4,64	3,15	0,88	0,85	75,27
7	6,21	14,56	11,14	8,31	0,69	0,49	82,86
9	3,10	8,41	5,52	3,58	0,29	0,01	79,72
11	6,90	16,93	12,85	8,75	0,08	0,11	71,15
12	3,17	9,36	5,58	4,33	0,48	0,26	76,72
14	7,39	16,93	12,51	9,43	0,74	0,74	88,18
15	5,49	13,84	9,53	7,00	0,89	0,75	78,29
16	5,59	15,42	9,39	7,45	0,91	0,67	70,79
18	3,23	6,84	5,47	4,30	1,03	0,79	87,64
20	3,83	9,32	6,76	5,12	0,64	0,56	77,31
22	3,43	8,81	6,53	5,44	1,02	0,85	73,69

C PD: Concentração do padrão

Fonte: O autor.

Ao analisar as Tabelas acima (Tabelas 17 a 20), percebe-se que a conversão com a enzima imobilizada foi maior do que com a enzima livre, já que é a melhor condição para a glicerólise enzimática. No tópico 4.5.3, será abordada a equivalência entre os métodos de determinação da eficiência de conversão, por área de pico e pela curva de calibração, para analisar se há ou não equivalência entre eles. Com estes valores, é possível, assim, realizar a determinação da concentração de alguns dos MAG, DAG e TAG que estão presentes no azeite de oliva, de acordo com os padrões utilizados no presente estudo. Isso também é ressaltado no trabalho de Gole e Gogate (2014), que buscaram a promoção da glicerólise de ácidos graxos livres diversos,

realizada por sistema de micro-ondas, e que também se utilizou de padrões externos para curvas de calibração de óleos e seguiu um planejamento que é muito similar e coincide com o que foi utilizado no presente trabalho, mostrando-se eficiente no que se refere à quantificação de AG.

A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 18 e 19, é possível a análise da quantificação dos padrões avaliados: (Ácido linoleico 97%; glicerol trilinoleico 98%; ácido oleico >99%; monopalmitico >99%; glicerol trioleico >99%; ácido dilinoleico 98%, todos da marca Sigma-Aldrich) a partir da área de pico, assim como seus tempos de retenção e a concentração (g L^{-1}). Ao que se refere aos tempos de retenção, observa-se que os MAG aparecem primeiro, são seguidos dos DAG e, por fim, os TAG, essa sequência de posicionamento ocorre pela interação que há entre a fase móvel e estacionária, ou seja, há uma maior afinidade dos MAG com a fase móvel da CLAE e, assim, saíram primeiro. Por outro lado, os TAG têm uma maior afinidade com a coluna na fase estacionária e, assim, são retidos por mais tempo, demorando um tempo maior para sair no cromatograma.

Essa interação intermolecular físico-química explica a diferença que existe nos tempos de retenção, uma vez que as moléculas que poderiam ser interferentes saem sobrepostas nos cromatogramas, no entanto isso não ocorreu neste trabalho, pois cada MAG, DAG e TAG tem interação diferente com as fases do sistema e também podem ser observados pelos tempos de retenção, que variaram de 11,55 a 44,65 minutos (SKOOG et al., 2014). Os demais gráficos para este parâmetro podem ser observados nos Anexos A do presente trabalho.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho realizado por Solaesa (2016), que teve como objetivo a promoção da glicerólise enzimática por lipase em óleo de sardinha em diferentes sistemas, como livre de solventes. O autor usou o surfactante Tween 80 e o surfactante AOT, sob várias condições de pressão e tempos de reação e, assim, concluindo que é importante a promoção da MO antes da catálise enzimática, ressaltando que os surfactantes tiveram comportamentos semelhantes, não apresentando diferenças significativas tanto para as conversões quanto equilíbrio do sistema.

Analisando as Tabelas 18 e 20, observa-se que a condição que resultou numa maior conversão em DAG e MAG foi o experimento 14 (1,2 mL de glicerol, 0,6 mL de azeite de oliva, 0,9 mL de água, 4,5 mL de Tween 80, 9 mL de glicerol e 1,22 mL de enzima). Assim, essa condição experimental foi selecionada para realizar os outros

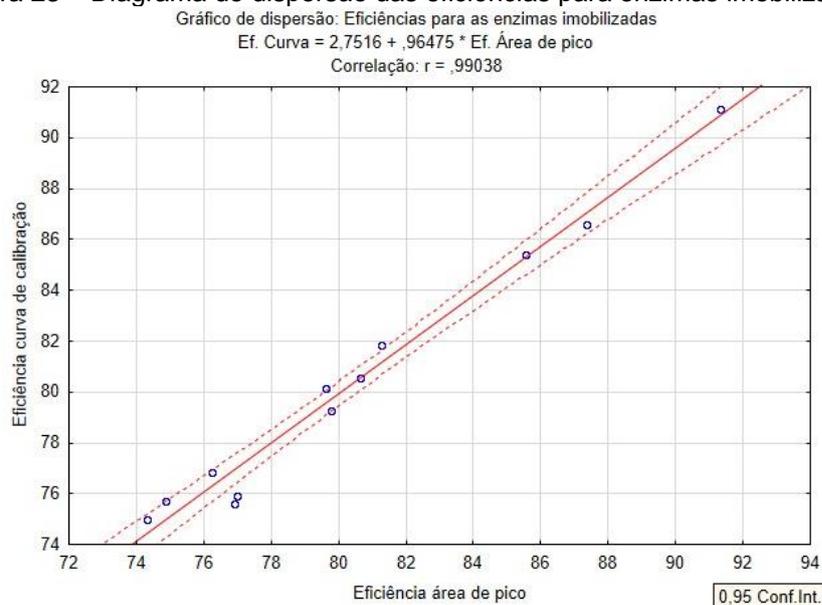
ensaios com a enzima imobilizada. Esse ponto de formação de microemulsão foi o que apresentou a melhor conversão na glicerólise enzimática quando se utilizou os mesmos valores das variáveis nos testes de glicerólise enzimática, assim, em função do teor de água e de surfactante, foi o ensaio que se comportou de forma a proporcionar a maior conversão possível, dentro da sua faixa de condição, de TAG em MAG e DAG.

A eficiência de conversão observada nas Tabelas 18 e 20 foi determinada utilizando a Equação 06 e, ao comparar com os resultados da conversão das Tabelas 14 e 15, observa-se que tanto por método das áreas de pico quanto pelo método da curva de calibração os resultados de eficiência de conversão se equipararam, ou seja, os testes foram conduzidos de maneira coerente e são equivalentes, visto que, em ambas as quantificações, a conversão foi muito similar.

4.5.3 Equivalência entre os métodos de eficiência de conversão

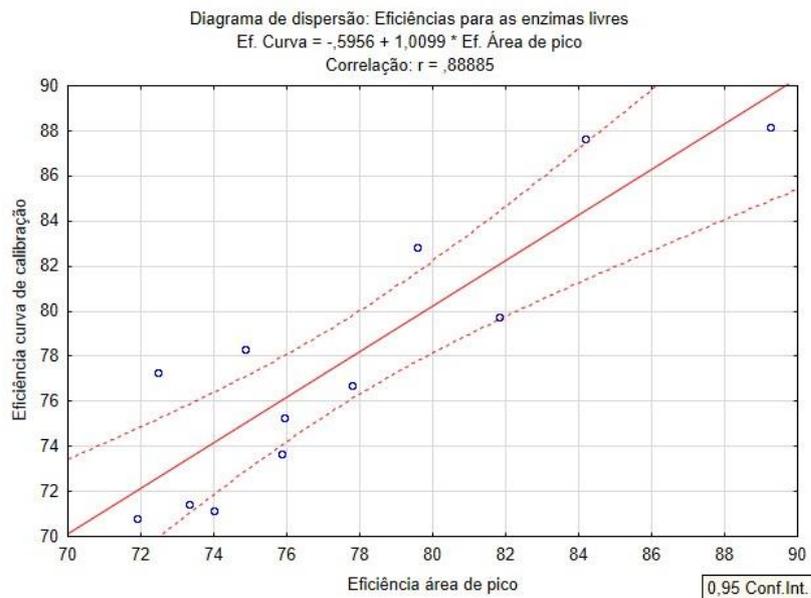
No intuito de analisar se os dois métodos apresentados até aqui, foram equivalentes em termos da porcentagem de conversão, construiu-se gráficos da eficiência de conversão obtida pelo método da área de pico em função do valor de eficiência obtido pelo método da curva de calibração para as enzimas livre e imobilizadas (Figuras 23 e 24).

Figura 23 – Diagrama de dispersão das eficiências para enzimas imobilizadas.



Fonte: O autor.

Figura 24 – Diagrama de dispersão das eficiências para enzimas livres.



Na Figura 23, notam-se níveis de dispersão muito baixos, sugerindo que os métodos de determinação da eficiência de conversão para as enzimas imobilizadas são equivalentes. Ao analisar a Figura 24, percebe-se uma dispersão um pouco maior, mas a maioria dos pontos está dentro de um limite estabelecido pelo software Statistica, porém nitidamente maior do que com a enzima imobilizada. Contudo, como observou-se que a glicerólise enzimática conduzida por enzima imobilizada apresentou maior conversão do que com a enzima livre, os testes a partir desse ponto foram conduzidos somente com essa condição de maior conversão (enzima imobilizada), no objetivo de otimizar os fatores de conversão de TAG, nas melhores condições possíveis.

4.6 PLANEJAMENTO FATORIAL DA IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO

Para estudar a atividade da enzima *Lipozyme TL100L* imobilizada no suporte de argila *Spectrogel tipo C*, desenvolveu-se um planejamento experimental fatorial do tipo Delineamento de Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , com base nos resultados de atividade obtida (variável resposta) em função do pH e da atividade oferecida (variáveis independentes). Os resultados do DCCR 2^2 são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados do planejamento fatorial 2² para o processo de adsorção por imobilização.

Teste	X1 / pH	X2 / Atividade oferecida (gENZ gSUP ⁻¹)	Atividade obtida (gENZ gSUP ⁻¹)
1	-1 / 5	-1 / 0,0249	0,0139
2	1 / 9	-1 / 0,0249	0,0152
3	-1 / 5	1 / 0,0498	0,0246
4	1 / 9	1 / 0,0498	0,0271
5	-1,41 / 3,3	0 / 0,0404	0,0087
6	1,41 / 10,7	0 / 0,0404	0,0143
7	0 / 7	-1,41 / 0,0199	0,0134
8	0 / 7	1,41 / 0,0607	0,0346
9	0 / 7	0 / 0,0404	0,0315
10	0 / 7	0 / 0,0404	0,0321
11	0 / 7	0 / 0,0404	0,0328

Fonte: O autor.

Os resultados da atividade da enzima imobilizada expostas pela Tabela 21 estão na faixa de 0,0087 até 0,0328 (gENZ gSUP⁻¹). Quando o pH está fixo, os valores da atividade obtida aumentaram com a quantidade de atividade oferecida. No teste 8, que corresponde à condição experimental de valor máximo da atividade oferecida, tem-se 0,0607 gENZ gSUP⁻¹, sendo obtido o valor máximo de atividade (enzima imobilizada). Por se tratar de um processo de adsorção, quanto maior a concentração da enzima maior a probabilidade das moléculas se fixarem com os sítios. Verificou-se, também, que o pH teve um efeito na imobilização da enzima, pois essa variável afeta a superfície do suporte e pode favorecer o surgimento de sítios ácidos e básicos na qual a enzima pode se ligar, além disso o pH afeta a atividade da enzima. Os resultados da análise estatística da ANOVA e efeitos do planejamento experimental estão apresentados nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22 – ANOVA do DCCR 2² da imobilização da enzima pelo processo de adsorção.

Fator	SS	GL	MS	F	p
pH (L)	179,3023	1,0000	179,3023	3,7200	0,1117
pH (Q)*	5491,4984	1,0000	5491,4984	113,9339	0,0001
Atividade Oferecida (L)*	3563,1019	1,0000	3563,1019	73,9248	0,0004
Atividade Oferecida (Q)*	694,3063	1,0000	694,3063	14,4050	0,0127
1L by 2L	3,6252	1,0000	3,6252	0,0752	0,7949
Erro	240,9950	5,0000	48,1990		
Total SS	9503,2594	10,0000			

Fonte: O autor.

Tabela 23 – Tabela dos efeitos do DCCR 2² da imobilização da enzima por adsorção.

Fator	Efeito	Erro padrão	t (5)	p	Limite - 95%	Limite +95%	Coef.	Erro padrão
Interação*	103,3345	4,0082	25,7805	0,0000	93,0310	113,6380	103,3345	4,0082
pH (L)	9,4825	4,9164	1,9287	0,1117	-3,1556	22,1207	4,7413	2,4582
pH (Q)*	-62,6199	5,8666	-10,6740	0,0001	-77,7005	-47,5394	-31,3100	2,9333
Ativ. Ofer. (L)*	42,2713	4,9164	8,5980	0,0004	29,6332	54,9095	21,1357	2,4582
Ativ. Ofer. (Q)*	-22,2660	5,8666	-3,7954	0,0127	-37,3466	-7,1855	-11,1330	2,9333
1L by 2L	1,9040	6,9425	0,2743	0,7949	-15,9424	19,7504	0,9520	3,4713

Fonte: O autor.

Os dados apresentados nas Tabelas 22 e 23 indicam quais variáveis foram significativas: atividade enzimática (Linear e Quadrática) e o pH (quadrático), bem como a interação destas duas variáveis tiveram influência na atividade obtida. Notou-se que tanto o pH quanto a atividade tiveram influência significativa no processo de imobilização da enzima por adsorção, pode ser justificado pelo pH do ponto isoelétrico da argila comercial que é de 7,0 - 8,0 (STOFELA et al., 2015).

Salienta-se que ao tratar a argila com ácido, para posterior lavagem com água destilada até atingir o pH de 5,5, o suporte de argila encontra-se abaixo do seu ponto isoelétrico, com cargas positivas em sua superfície. O valor do ponto isoelétrico varia de acordo com a lipase utilizada, como a lipase de *Burkholderia cepacia* possui seu ponto isoelétrico em pH 5,2 (SECUNDO et al., 2008; REBELO et al., 2010). Desta maneira, em condições ácidas, a proporção de enzimas com carga negativa diminui e reduz a quantidade adsorvida na argila. Visto posto, é possível explicar que qualquer variação do pH que saia do ponto isoelétrico da argila altera os valores de adsorção, bem como afeta atividade enzimática.

Normalmente, o pH da solução que propicia valores máximos de imobilização está próximo do ponto isoelétrico da proteína. Isso ocorre pelo fato de que a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada no valor de pH correspondente ao ponto isoelétrico (RABE et al., 2011). Tal fato pode ser observado no trabalho de Li et al. (2017), que obtiveram a maior atividade enzimática em um ambiente neutro (pH 7,0) para a imobilização de lipase se *B. cepacia*. Yucel (2011), por sua vez, analisou a influência da concentração do tampão durante a imobilização e obteve atividade com valores próximos em diferentes concentrações, não sendo observado um efeito importante na atividade da enzima imobilizada. Diante disso, deve-se analisar todas as variáveis para que se possa dizer que é um parâmetro importante ou não, contudo, baseando-se nos resultados, nota-se que sim, trabalhar

com um pH próximo ao ponto eletrostático condiciona um aumento da atividade enzimática.

Isso está ligado às forças iônicas presentes na solução de imobilização, uma vez que, quando altas forças iônicas, a lipase tende a manter sua conformação fechada, o que faz com que ocorra perda de atividade catalítica da enzima ou ainda apresente dificuldades ao interagir com substratos, devido ao impedimento histérico e, por consequência, afete os resultados de atividade enzimática ou outro parâmetro designado como variável resposta (BARBOSA et al., 2011; BARBOSA et al., 2013). Bastida et al. (1998) comentam que enzimas são melhores imobilizadas nos suportes quando a força iônica é baixa. Desse modo, utilizando uma concentração intermediária (até $0,1 \text{ Mol.L}^{-1}$), permite um possível equilíbrio entre a estrutura aberta e a fechada da enzima. Portanto, as condições do tampão fosfato de sódio em pH 7,0 e concentração de $0,05 \text{ Mol.L}^{-1}$ (condições do ponto central do planejamento) foram fixadas para utilização nas demais etapas de imobilização (BORNSCHEUER, 2018).

Analisar a ANOVA (Tabela 23) para um modelo quadrático nos traz que a viabilidade e a significância estatística de cada efeito são determinadas pela probabilidade p (p -valor) e teste de Fisher (teste F), ou seja, quanto maior o valor de F e quanto menor o p -valor, mais significativo é o coeficiente, enquanto a qualidade do ajuste é avaliada pelo R^2 , sendo que, quanto mais próximo de 1, maior correlação tem nos ensaios. Por consequência, os dados sugerem que o modelo apresentado é significativo e adequado para descrever os dados experimentais, uma vez que as variáveis apresentaram valor $p < 0,05$. O R^2 para esses testes foi de 0,9746, indicando que 97,5% das variações na resposta são causadas pelas variáveis independentes do processo.

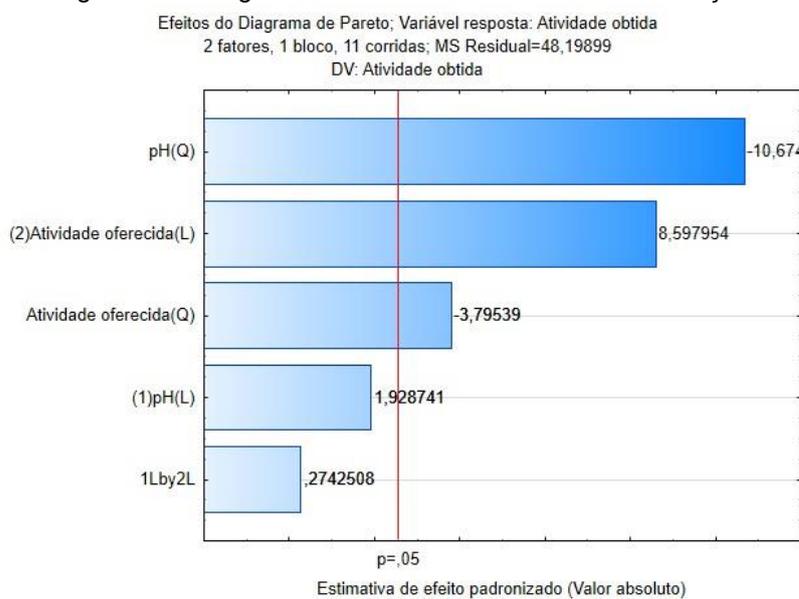
A viabilidade do modelo também foi confirmada pelo teste F, no qual a condição de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) foi satisfeita (F_{tab} é de 6,26, logo, para o parâmetro da atividade oferecida, esse valor foi cerca de 7 vezes maior do que o F_{calc}) e calculado a partir de ANOVA e dados tabelados, respectivamente (ALVES, 2021). Na Figura 25, são apresentados o digrama de Pareto e os gráficos de superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 26 e 27, respectivamente.

A equação (52), em termos das variáveis codificadas, foi utilizada para a construção das superfícies. Os gráficos de superfície de resposta mostram que os pontos ótimos estão na região próximo ao ponto central para a variável pH e na região de valores mais elevados da atividade ofertada.

Além disso, a atividade enzimática está diretamente ligada ao pH do meio, pode ser explicada por trabalhar de forma chave-fechadura e deve-se ter quantidade suficiente de enzima oferecida no meio, em um pH que permita que a atividade enzimática seja máxima para que a catálise possa acontecer (JUNIOR, 2017). A partir da equação 52, foi determinada a condição ótima de imobilização da enzima: 0,0491 gENZ gSUP⁻¹ e pH de 7,12, que resultará numa atividade da enzima imobilizada de 0,0353 gENZ gSUP⁻¹. Nessa condição, realizou-se o experimento com triplicata e obteve-se os resultados da Tabela 21.

$$Az = 103,3345 + 4,7413x - 31,3099x^2 + 21,1357y - 11,1330y^2 - 0,952xy + 0 \quad (52)$$

Figura 25 – Diagrama de Pareto do DCCR 22 da adsorção.



Fonte: O autor.

No trabalho de Molinari (2020), o autor analisa a imobilização de *Burkholderia cepacia* em suportes de argila, dentre eles o *Spectrogel tipo C*, para a produção de ésteres etílicos. O autor avaliou a atividade oferecida e pH em função da atividade obtida e, na análise do gráfico de Pareto, percebeu que somente a atividade oferecida foi significativa para o processo, enquanto no presente estudo, além do parâmetro citado, o pH também foi significativo.

Figura 26 – Superfície de contorno do DCCR 2² da adsorção.

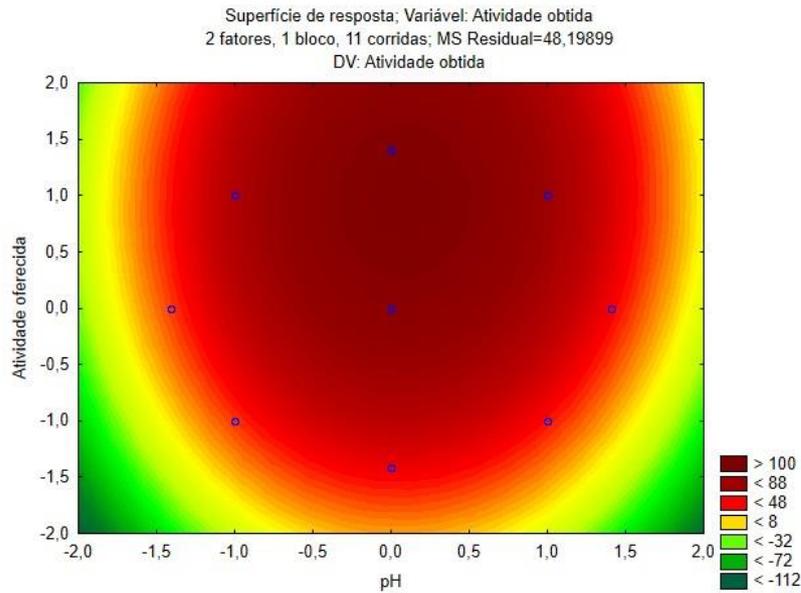
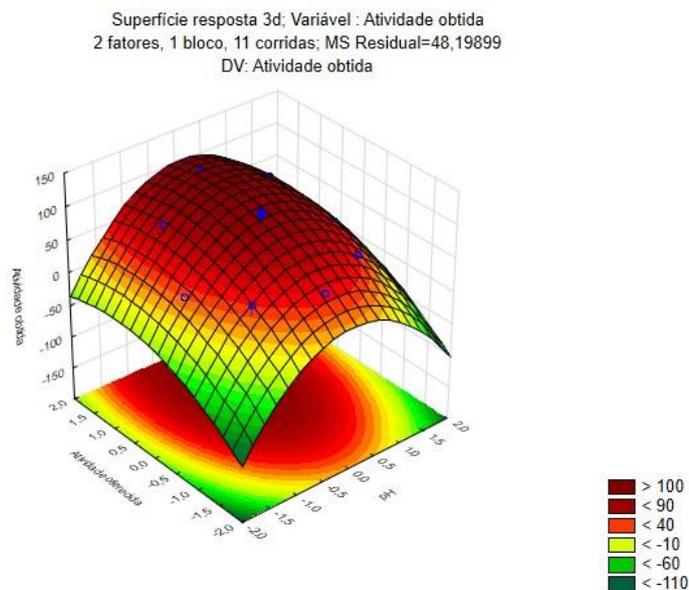


Figura 27 – Superfície resposta do DCCR 2² da adsorção.



Ao observar os gráficos de superfície de resposta (Figuras 26 e 27), verifica-se que há uma região com formação de ponto ótimo e que as variáveis foram significativas. O diagrama de Pareto indica que, num nível de significância de $p = 0,5$, ambas variáveis foram significativas, logo, ao alterar as variáveis independentes gerou variações significativas na variável dependente. Então, seguiu-se de uma triplicata no ponto ótimo de adsorção que pode ser observada na Tabela 24.

Tabela 24 – Triplicata do ponto ótimo do processo de adsorção.

Teste	pH	Atividade Oferecida (gENZ gSUP ⁻¹)	Atividade Obtida (gENZ gSUP ⁻¹)	Desvio padrão
1	7,1	0,0491	0,0349	1,8333.10 ⁻⁸
2	7,1	0,0491	0,0353	
3	7,1	0,0491	0,0349	
Médio	7,1	0,0491	0,0350	

Fonte: O autor.

Os testes experimentais nos trouxeram resultados similares aos previstos pelo modelo. Esses valores confirmam os resultados da análise estatística do modelo, visto que o desvio entre atividade teórica e experimental foi de 0,0002 gENZ gSUP⁻¹, portanto foram muito próximos. Essa condição de imobilização foi a utilizada para otimizar a reação de glicerólise (pH 7,1, atividade oferecida de 0,0491 gENZ gSUP⁻¹). Ademais, o desvio padrão entre as amostras foi baixo o que nos mostra um modelo ajustado e com resultados próximos a média, agregando confiabilidade nos dados obtidos.

4.7 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ENSAIOS DE GLICERÓLISE COM A ENZIMA IMOBILIZADA

O estudo da reação de glicerólise empregando a enzima imobilizada (Razão molar m/m 2:1, 7,5% enzima, 35°C) foi realizado utilizando um planejamento experimental, no qual foram avaliadas as variáveis temperatura e quantidade de enzima e como variáveis resposta à atividade obtida e a conversão de TAG, com o intuito de tentar correlacioná-las. Os resultados da atividade enzimática estão apresentados na Tabela 25.

Ferreira (2017) afirma que a atividade enzimática é um parâmetro importante quando se objetiva monitorar o comportamento da enzima, que, normalmente, é quantificada em termos de unidades de atividade, seja U, seja UI, podendo ser definida como a quantidade de enzimas capaz de realizar a catálise e a modificação de 1 µmol de substrato por minuto de reação, que, obviamente, segue as condições experimentais pré-estabelecidas.

Dessa maneira, a comercialização das enzimas é feita sob os termos de atividade ou pela atividade específica, U mg⁻¹ de proteína. Na Tabela 25, são apresentados os valores referentes à atividade das amostras do DCCR. As condições

experimentais da imobilização por adsorção foram utilizadas de acordo com o ponto ótimo obtido e descrito no item 4.8 em pH 7,1 e atividade oferecida de 0,0491 gENZ gSUP⁻¹. Para as condições da formação da microemulsão, seguiu-se o planejamento fatorial descrito no item 4.7.

Tabela 25 – Atividade enzimática obtida por meio do planejamento fatorial DCCR 2² (razão molar 2:1, 2 horas de reação).

Teste	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Atividade obtida (gENZ gSUP ⁻¹)
1	-1 / 30	-1 / 5	0,0158
2	1 / 40	-1 / 5	0,0162
3	-1 / 30	1 / 10	0,0187
4	1 / 40	1 / 10	0,0197
5	-1,41 / 28	0 / 7,5	0,0169
6	1,41 / 42	0 / 7,5	0,0135
7	0 / 35	-1,41 / 3,97	0,0150
8	0 / 35	1,41 / 11,02	0,0230
9	0 / 35	0 / 7,5	0,0277
10	0 / 35	0 / 7,5	0,0279
11	0 / 35	0 / 7,5	0,0272

Fonte: O autor.

Nas condições processuais 6 e 7 foram obtidas dos menores valores da atividade enzimática, provavelmente em função da razão da quantidade de enzima ser insuficiente e/ou a temperatura fora dos pontos ótimos. Esses são valores previstos, pois a atividade está relacionada diretamente à ação da *Lipozyme TL 100L* e, por consequência, à conversão de TAG para MAG e DAG (MILLER et al., 1988). O comportamento das variáveis pode ser analisado pela ANOVA e são apresentados nas Tabelas 26 e 27. O monitoramento das variáveis é importante para otimização do modelo, ademais analisa-se, assim, se a atividade obtida está relacionada às condições de processo para realização da glicerólise enzimática (temperatura e quantidade de enzima).

Tabela 26 – ANOVA do delineamento DCCR 2².

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
(1) Temperatura (°C)(L)	14,3850	1	14,3850	0,8151
Temperatura (°C)(Q)*	2152,3149	1	2152,3149	121,9526
(2) Enzima (%) (L)*	412,01239	1	412,0123	23,3451
Enzima (%) (Q)*	1005,0447	1	1005,0447	56,9470
1L by 2L	0,81	1	0,81	0,04589
Erro	88,2438	5	17,6487	
Total SS	3029,1350	10		

Fonte: O autor.

Ao analisar a Tabela 26 da ANOVA, percebe-se que, para um modelo quadrático, é um processo viável e a significância estatística de cada efeito são determinadas pela probabilidade p (p -valor, na Tabela 27) e teste de Fisher (teste F), portanto, quanto maior o valor de F e quanto menor o p -valor, mais significativo é o coeficiente. Assim, os dados sugerem que o modelo apresentado é significativo e adequado para descrever os dados experimentais, uma vez que as variáveis apresentaram valor $p < 0,05$. O R^2 para esses testes foi de 0,9709, indicando que 97,1% das variações na resposta são causadas pelas variáveis independentes do processo. Logo, a viabilidade do modelo também foi confirmada pelo teste F, no qual a condição de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) foi satisfeita, sendo calculado a partir de ANOVA e dados tabelados, respectivamente (ALVES, 2021).

Tabela 27 – Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2².

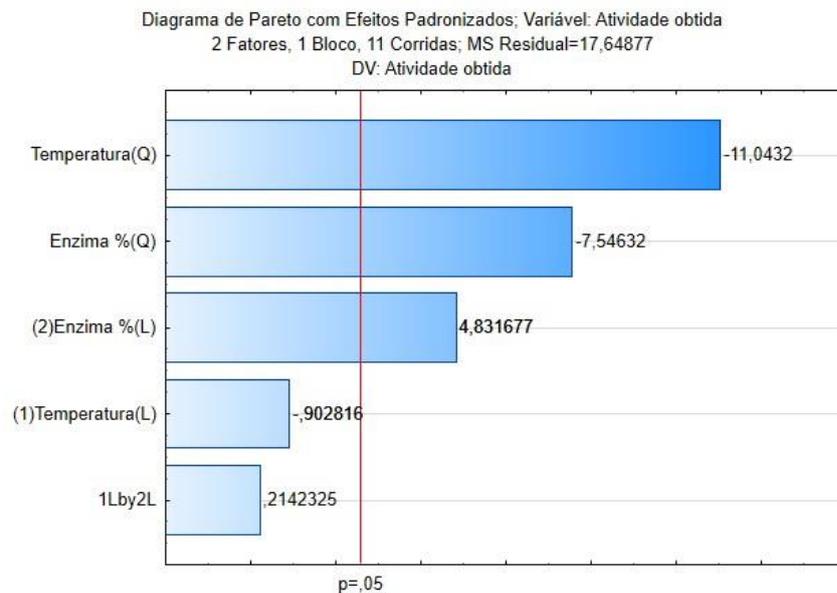
Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	p
Média/Intercep. *	88,6630	2,4254	0,0000
(1) Temperatura (°C)(L)	-2,6858	2,9750	0,4080
Temperatura (°C)(Q)*	-39,2030	3,5499	0,0001
(2) Enzima (%) (L)*	14,3743	2,9750	0,0047
Enzima (%) (Q)*	-26,7892	3,5499	0,0006
1L por 2L	0,9000	4,2010	0,8388

Fonte: O autor.

Os resultados nos trazem que temperatura e porcentagem de enzima foram significativas na atividade enzimática, num nível de significância de 5%, ou seja,

qualquer alteração nessas variáveis impacta nos valores da variável resposta. Nota-se, pelo desvio padrão, que os valores estão baixos e próximos, o que nos diz que se tem uma amostragem homogênea (JUNIOR, 2017). O diagrama de Pareto (Figura 28) mostra graficamente quais variáveis foram significativas (Temperatura (Q) e Enzima (Q) e (L)) em um nível de significância de 5% para o planejamento fatorial DCCR 2² apresentado acima.

Figura 28 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial DCCR 2².



Fonte: O autor.

Avaliando o diagrama de Pareto (Figura 28), nota-se que as variáveis que influenciaram no processo da atividade enzimática foram a temperatura (Q) e porcentagem (razão) de enzima (Q), tendo uma influência de modo negativo no processo, ou seja, quanto menor a temperatura e menor a concentração de enzima maior será a atividade enzimática obtida. Ademais, a porcentagem de enzima (L) também impactou positivamente, desse modo, % de enzima (L) maiores promovem melhores atividades enzimáticas.

A equação (53) corresponde a equação que representa a atividade enzimática e construção das superfícies de resposta apresentadas nas Figuras 29 e 30, respectivamente, de forma a observar a região de formação de ponto ótimo.

$$Az = 88,6631 - 1,3429x - 19,6015x^2 + 7,1872y - 13,3946y^2 + 0,45xy + 0 \quad (53)$$

Figura 29 – Superfície de contorno do DCCR 2².

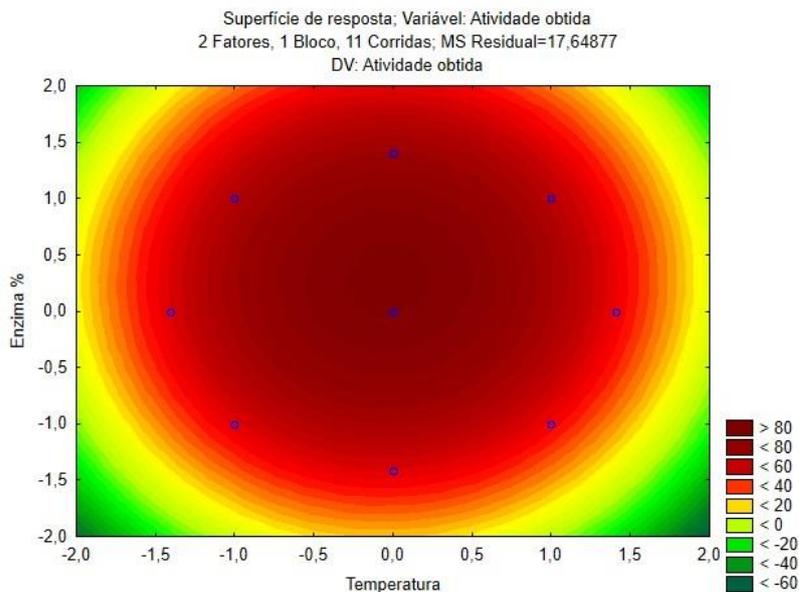
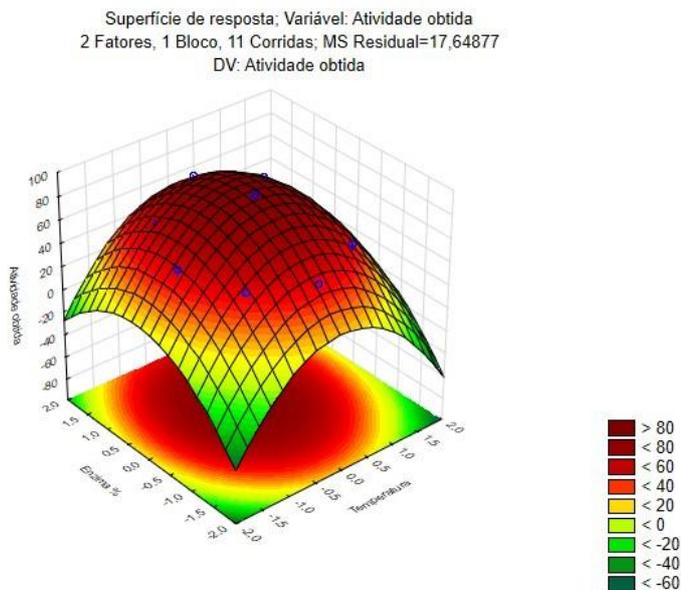


Figura 30 – Superfície resposta do DCCR 2².



A partir das superfícies de resposta, Figuras 29 e 30, nota-se que a variável resposta atividade obtida tem relação diretamente proporcional a % de enzima e inversamente proporcional com a temperatura e % de enzima (Q). Esse resultado corrobora com a literatura disponível sobre o tema, pois quanto maior a quantidade de enzima presente no meio, maior a chance de encaixe com a superfície e, conseqüentemente, maior interação entre a enzima e a lipase e maior conversão de TAG em MAG e DAG (Ferreira et al., 2021).

4.7.1 Atividade enzimática do ponto ótimo

A partir da Equação 53, foi determinada a condição ótima em termos de atividade enzimática: 34,84 °C de temperatura e 8,16 % de enzima, que corresponde ao valor da atividade enzimática imobilizada teórica ótima de 0,0280 gENZ gSUP⁻¹. Também foi realizado um ensaio em triplicata nessas mesmas condições processuais do ponto ótimo, cujos resultados são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Atividade enzimática na triplicata no ponto ótimo.

Teste	Atividade (gENZ gSUP ⁻¹)	Desvio padrão	Soma dos quadrados
Atividade ofertada	0,0491		
1	0,0269	0,0002	1,2667.10 ⁻⁷
2	0,0271		
3	0,0266		

Fonte: O autor.

Ao comparar a atividade enzimática nos pontos ótimos das enzimas imobilizadas, observa-se que estes valores ficaram coerentes entre si. O desvio entre o valor teórico e o médio das atividades obtidas foi de 0,0011 gENZ gSUP⁻¹, o que nos mostra que o modelo representou adequadamente o comportamento da variável resposta dentro da região avaliada no planejamento, já que uma variação tão discreta na atividade obtida é inferior a 5% de variação, indicando uma confiabilidade dos resultados experimentais quando comparados com os teóricos (NICHOLSON, 2021).

4.8 PLANEJAMENTO FATORIAL DCCR DA REAÇÃO DE GLICERÓLISE

Após a determinação da atividade enzimática no ponto ótimo, foi realizado um planejamento experimental fatorial do tipo DCCR. Os resultados referentes a conversão de TAG em MAG e DAG para as condições experimentais avaliadas são expostos na Tabela 29. Os valores das variáveis independentes avaliadas foram temperatura em 28; 30; 35; 40 e 42°C e enzima em 3,97; 5; 7,5; 10 e 11,02%. A enzima foi imobilizada nas seguintes condições experimentais: pH em 7,1 e atividade oferecida em 0,0491 gENZ gSUP⁻¹.

Tabela 29 – Eficiência da reação da amostra 14 (razão molar 2:1, 2 horas de reação) no planejamento DCCR.

Teste	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Eficiência (%)
1	-1 / 30	-1 / 5	56,52
2	1 / 40	-1 / 5	71,14
3	-1 / 30	1 / 10	62,93
4	1 / 40	1 / 10	73,24
5	-1,41 / 28	0 / 7,5	58,61
6	1,41 / 42	0 / 7,5	77,78
7	0 / 35	-1,41 / 3,97	79,91
8	0 / 35	1,41 / 11,02	90,87
9	0 / 35	0 / 7,5	94,88
10	0 / 35	0 / 7,5	95,68
11	0 / 35	0 / 7,5	94,79

Fonte: O autor.

Na análise da Tabela 29, são apresentados os valores experimentais obtidos da eficiência de conversão, que corresponde a faixa entre 56% e 94%, ou seja, ocorreu uma ampla variação da variável resposta nas condições propostas do DCCR para a conversão de TAG em MAG e DAG.

Para os resultados da análise estatística, foram empregados o software Statistica e a tabela ANOVA, coeficiente de regressão, tabela de efeitos e gráficos de superfície resposta e que são apresentados nas Tabelas 30 e 31, e Figuras 29 e 30, respectivamente.

É possível observar, nas Tabelas 25 e 28, que há um mesmo padrão das demais análises de atividade, em que as amostras que tiveram maiores conversões também apresentaram maiores atividades enzimáticas, destacando os pontos centrais A9, A10 e A11.

Tabela 30 – ANOVA do delineamento DCCR 2².

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
(1) Temp. (°C)(L)*	338,483	1	338,483	7,17205
Temp (°C)(Q)*	1481,053	1	1481,053	31,38171
(2) Enzima (%) (L)	71,996	1	71,996	1,52551
Enzima (%) (Q)*	324,505	1	324,505	6,87587
1L by 2L	4,644	1	4,644	0,09840
Erro	235,974	5	47,195	
Total SS	2182,691	10		

Fonte: O autor.

Tabela 31 – Coeficiente de Regressão no planejamento DCCR 2².

Parâmetro	Coeficiente de Regressão	Desvio Padrão	p
Média/Intercep. *	95,1592	3,9663	0,0000
(1) Enzima (%) (L)	6,0088	4,8650	0,2717
Enzima (%) (Q)*	-15,2222	5,8052	0,0470
(2) Temp. (°C)(L)*	13,0287	4,8650	0,0439
Temp (°C)(Q)*	-32,5201	5,8052	0,0025
1L by 2L	-2,1550	6,8698	0,7664

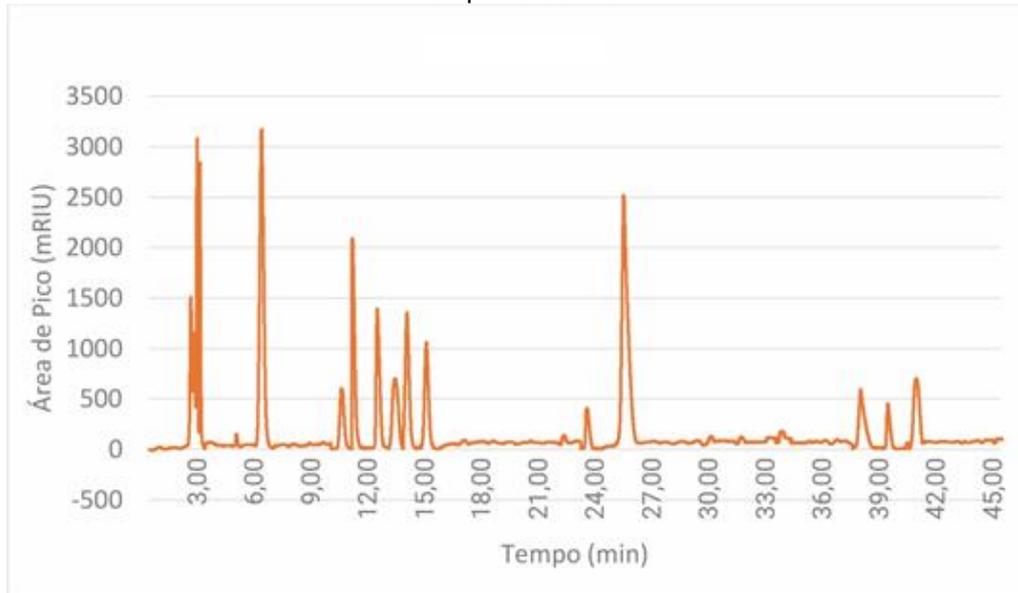
Fonte: O autor.

Os resultados das Tabelas 30 e 31 apresentam médias com diferença significativa em praticamente todas as variáveis, dessa forma, plotou-se a superfície de resposta entre temperatura e teor de enzima para encontrar a região com melhor resposta e, assim, fazer a determinação dos pontos ótimo do sistema, em que a formação de MAG e DAG foi mais elevada para as duas variáveis. Os pontos da triplicata apresentaram desvios discretos, isso mostra que ocorreu uma boa reprodutibilidade dos ensaios experimentais. Valério (2009) ressalta que, dessa maneira, os resultados das conversões podem ser confirmados pela triplicata.

Para obter os valores de eficiências elevadas, é fundamental a otimização das condições dos testes e, assim, buscaram-se os valores de temperatura, concentração de enzima. Na Figura 31, o cromatograma das amostras do ponto central pode ser analisado no DCCR e nota-se a presença da região de MAG, DAG e TAG, para a determinação da eficiência, que, como citado, nas condições de realização do trabalho, obtiveram-se as condições de 35°C e 7,5% de enzima. Nota-se, também, que os picos se apresentam distintos nas regiões propostas e foram obtidos nos

tempos condizentes com a curva de calibração e na ordem esperada, em que a ordem foi: o solvente (3 min), glicerol (6 min), seguido dos MAG (10 a 15 min), DAG (23 a 27 min) e, por fim, os TAG (38 a 42 min).

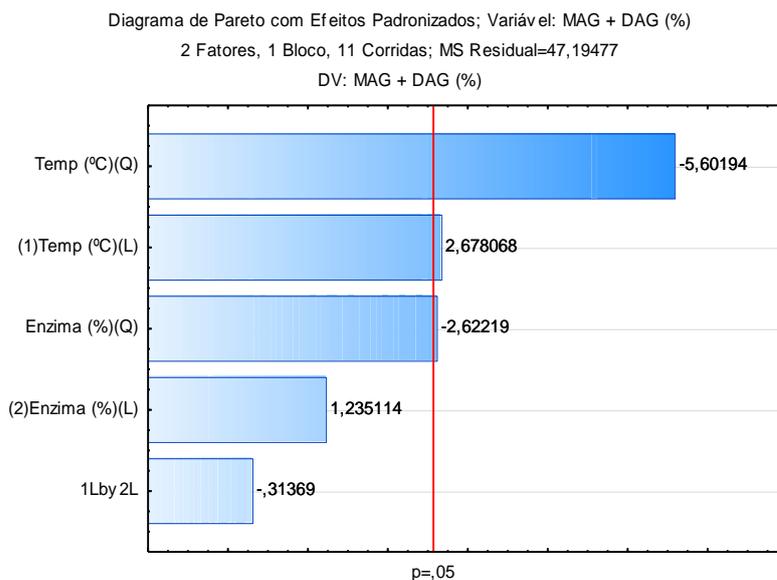
Figura 31 – Cromatograma do ponto central, sistema a 35°C e 7,5% de enzima – Área de pico x Tempo de corrida.



Fonte: O autor.

O diagrama de Pareto nos indica quais as variáveis significativas no processo, como observado na Figura 32. O diagrama indica, num nível de significância de $p = 0,5$, as variáveis significativas para o processo foram a temperatura e a quantidade de enzima, ou seja, qualquer redução no volume de enzima utilizado na imobilização ou variação de temperatura interfere significativamente na reação de glicerólise enzimática imobilizada.

Figura 32 – Diagrama de Pareto do planejamento fatorial 2².

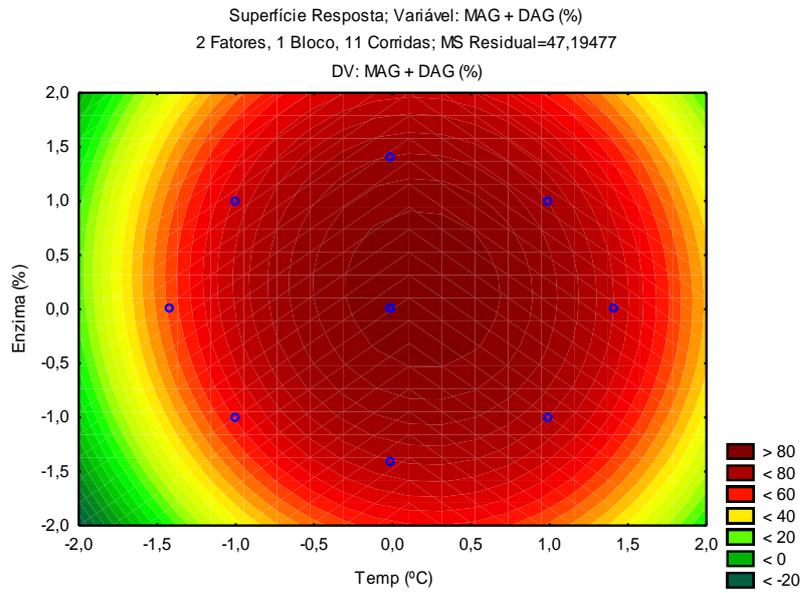


Fonte: O autor.

A análise dos gráficos de superfície de resposta apresentados nas Figuras 33 e 34 possibilita a verificação dos pontos ótimos de temperatura, nos quais os valores descritos estão, aproximadamente, na região do ponto central, enquanto, para a concentração de enzima, eles ficaram na região entre o ponto central e o de máximo da quantidade de biocatalizador. Dessa forma, afirma-se que a temperatura obteve valor em torno de 35°C e a quantidade de enzima de 7,5 a 10%.

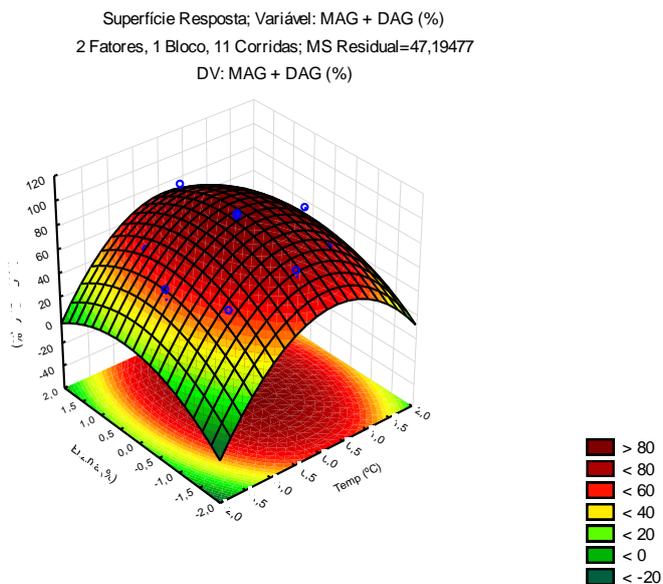
Os resultados obtidos são condizentes e esperados, já que a temperatura ótima da enzima *Lipozyme TL 100L* é de 35°C e, em temperaturas menores, há uma redução de atividade e, em valores superiores a este, há uma possível desnaturação proteica em ambos, bem como a perda de função. O modelo chave-fechadura pode explicar que quantidade de enzima foi suficiente para o substrato do meio, possibilitando, dessa forma, a catálise ser desencadeada e não causando prejuízo na catálise pelo excesso de enzima (CORREIA et al., 2011; JUNIOR, 2017; TU et al., 2017).

Figura 33 – Superfície de contorno do DCCR 2².



Fonte: O autor.

Figura 34 – Gráfico de superfície de resposta do DCCR 2².



Fonte: O autor.

Para otimizar o método descrito acima, por meio do planejamento Box-Behnken de um planejamento fatorial 2², combinado com o software Maple, encontrou-se os pontos ótimos da reação, que serão descritos no tópico a seguir.

4.8.1 Otimização da conversão da reação de glicerólise

A partir da equação (57) obtida a partir da análise estatística do planejamento experimental e com o auxílio do software Maple 2020, determinou-se a condição de

máxima conversão (95,36%), que foi a temperatura de 36°C e a concentração de 7,95. Nessa condição experimental identificada como ponto ótimo, foram conduzidos experimentos em triplicata, cujos resultados estão apresentados na Tabela 32.

A análise de variância ANOVA, para um modelo quadrático apresentado na Tabela 30, demonstra que as seguintes variáveis tiveram efeito significativo: Temperatura (L) e (Q) e Enzima (Q). Os valores dos parâmetros estatísticos mostram que o modelo é adequado para descrever o comportamento dos dados experimentais, uma vez que as variáveis apresentaram valor $p < 0,05$ para as variáveis significativas. O R^2 para esses testes foi de 0,8919, indicando que 89,2% das variações na resposta são causadas pelas variáveis independentes do processo. A viabilidade do modelo também foi confirmada pelo teste F, no qual a condição de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$) foi satisfeita e foi calculado a partir de ANOVA e dados tabelados, respectivamente (ALVES, 2021).

$$Az = 95,1592 + 6,5143x - 16,2601x^2 + 3,0044y - 7,6111y^2 - 1,0775xy + 0 \quad (57)$$

Tabela 32 – Eficiência da reação do ponto ótimo definido pelo modelo.

Teste	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Eficiência (%)	Desvio padrão	Soma dos Quadrados
1	36	7,95	96,61	0,36	0,13
2	36	7,95	96,34	0,63	0,40
3	36	7,95	97,96	0,99	0,98

Fonte: O autor.

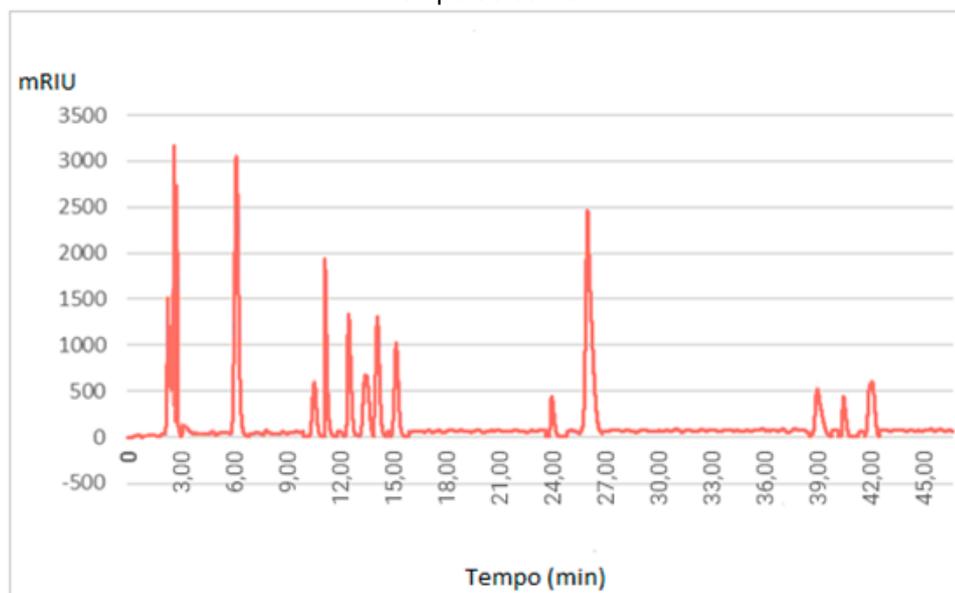
Analisando a tabela acima, obteve-se uma eficiência média de conversão média de 96,97%, ou seja, muito próximo aos valores propostos pelo modelo. Essa conversão pode ser analisada no cromatograma disposto na Figura 31. Ao comparar a eficiência de conversão média de TAG em MAG e DAG do ponto ótimo teórico com o experimental, observa-se que esses valores ficaram muito próximos. Esse desvio entre as conversões foi de 0,90%, o que nos mostra que o modelo representou adequadamente o comportamento da variável resposta dentro da região avaliada no planejamento (NICHOLSON, 2021). Esses valores elevados de conversão estão de acordo com alguns trabalhos reportados na literatura e, para comparar esses resultados que empregaram óleo e reação de glicerólise, construiu-se uma tabela, indicando o sistema (óleo+enzima), descrição de processos e conversão (Tabela 33).

Tabela 33 – Estudos com a *Lipozyme TL 100L* e condições ótimas.

SISTEMA	Processos	CONVERSÃO	AUTORES
Azeite de oliva e lipase Novozym 435; Azeite de oliva e lipase <i>Lipozyme TL 100L</i> .	Glicerólise enzimática livre do azeite de oliva com várias lipases, incluindo a <i>Lipozyme TL 100L</i> e Novozym 435.	Conversão de, aproximadamente, 89% de TAG em MAG e DAG.	KRUGER (2010).
Azeite de oliva e lipase Novozym 435.	Fluídos pressurizados e ultrassom para produção MAG e DAG a partir da reação de glicerólise enzimática livre de óleo de oliva.	Conversão de, aproximadamente, 84% de TAG em MAG e DAG.	FIAMETTI (2012).
Lipase extraída de <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizada em argilas (incluindo a <i>Spectrogel tipo C</i>) para produção de ésteres etílicos a partir do biodiesel.	Reação de esterificação a partir da imobilização em diversos suportes de argila para a produção de ésteres etílicos.	Maior conversão em 98,05%.	MOLINARI (2020).
Diversos óleos vegetais e lipases combinadas para estruturação dos lipídeos em sistemas livres e imobilizados.	Reação de glicerólise enzimática imobilizada e livre em vários suportes (polímeros, sílica, argila) com lipases de origem vegetal e animal.	Conversão máxima de 90% obtida.	NICHOLSON (2021).
Lipase vegetal extraída de sementes de mamona para a hidrólise enzimática de óleo de crambe em sistema sem imobilização.	Reação de hidrólise enzimática com lipase vegetal das sementes de mamona sem imobilização, e aplicada em óleo de crambe.	Conversão máxima de 91% em ultrassom.	TAVARES (2018).
Óleo de alpejuro em CO ₂ supercrítico com mistura das enzimas Novozym 435 e <i>Lipozyme TL IM</i> não imobilizadas.	Reação de esterificação em fluido supercrítico para produção de biodiesel.	Fator de conversão de biodiesel superior a 96%.	QUINTANA-GÓMEZ et al. (2021).
Óleo de larva da mosca soldado-negro e lipase MAS1 imobilizada em suportes diversos (argilas e sílica).	Glicerólise enzimática imobilizada do óleo de larva da mosca soldado negro para produção de MAG e DAG.	Conversão de, aproximadamente, 98% de TAG em MAG e DAG.	Xu et al. (2021).
Semente da palmeira fênix e lipase <i>Lipozyme TL 100L</i> livre.	Reação de esterificação e transesterificação da semente da palmeira fênix por enzima não imobilizada.	Fator de conversão de biodiesel 93,8% ± 0.5%.	ZHOU, LI, SUN (2021).
Azeite de oliva e lipase <i>Lipozyme TL 100L</i> não imobilizada.	Reação de glicerólise enzimática livre para conversão de TAG em MAG e DAG do azeite de oliva.	Conversão máxima de 98%.	FINCO et al. (2022).

Fonte: O autor.

Figura 35 – Cromatograma do ponto ótimo, sistema a 36°C e 7,95% de enzima – Área de pico x Tempo de corrida.



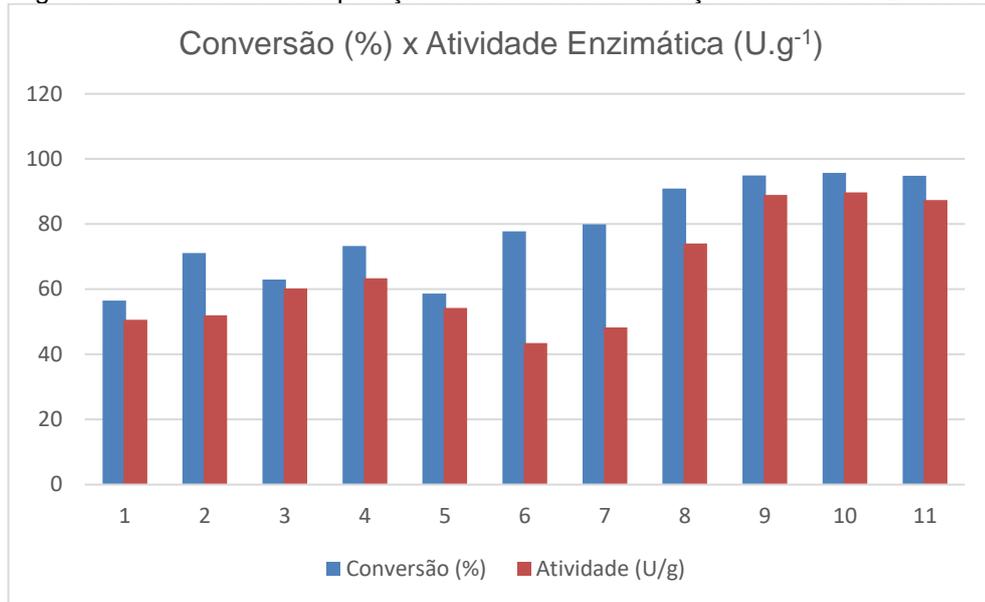
Fonte: O autor.

Ao analisar a Figura 35, observa-se que os cromatogramas (anexados no Apêndice C) seguem um padrão: que seria a região de, aproximadamente, 6 minutos de tempo de retenção, referente ao solvente restante, gás de arraste e glicerol; a região de, aproximadamente, 10 a 16 minutos referente aos MAG; e a região de 36 a 43 minutos, que é o TAG. Ou seja, a amostra foi separada e teve tempo de retenção diferente, segundo suas características estruturais e método utilizado. Essa região bem dividida entre MAG, DAG e TAG dá-se pela diferença estrutural de cada um, sendo que os TAG, compostos mais complexos, demoram mais para percorrer a coluna até chegar no detector (FIAMETTI, 2012; SKOOG et al., 2014; FINCO, 2018).

Ao comparar o ponto ótimo de conversão com a atividade enzimática (onde as condições experimentais foram as mesmas), construiu-se um gráfico da atividade em função da conversão, observado na Figura 36. Analisando este resultado, pode-se inferir que, quanto maior foi a atividade enzimática, maior foi a conversão, especialmente para os pontos ótimos do sistema que são os pontos 9, 10 e 11, que se referem a uma triplicata do ponto central.

Nos pontos 6 e 7, os valores de atividade não foram tão altos, porém obtiveram-se altas conversões, isso pode ser explicado pelas condições de processo que se mantiveram na temperatura de 35°C, enquanto a variação da enzima foi nos pontos extrapolados de máximo e de mínimo, logo, a temperatura proporcionou manter níveis altos de conversão mesmo com a atividade sendo menor.

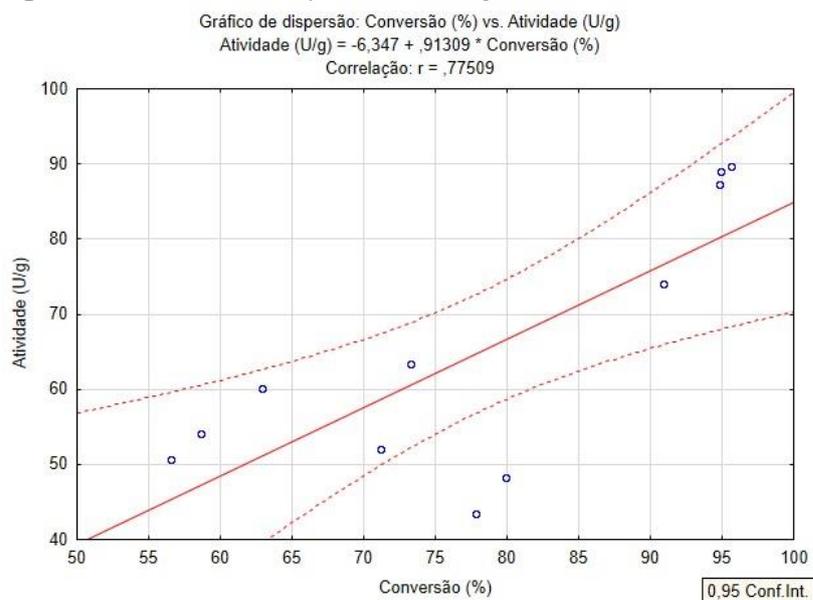
Figura 36 – Gráfico de comparação da conversão em função atividade enzimática.



Fonte: O autor.

Nas Figuras 36 e 37, pode se observar a conversão em função da atividade enzimática e notou-se que os valores apresentaram níveis de dispersão baixos e pode-se concluir que há correlação entre as variáveis dependentes, visto que somente dois pontos se apresentaram como *outliers*, ou seja, seus valores ficaram fora dos parâmetros de correlação, esses são os pontos 6 e 7, que já foram explicados anteriormente.

Figura 37 – Gráfico da dispersão em função da atividade enzimática.



Fonte: O autor.

4.9 CINÉTICA DE REAÇÃO POR PING-PONG BI-BI

Escolheu-se as condições experimentais baseadas em todos os testes realizados até agora em termos da conversão de TAG em MAG e DAG. Portanto, empregou-se o ponto ótimo da reação, que apresentaram os melhores resultados, que são as seguintes condições: 7,4% de glicerol, 10% de azeite de oliva, 5% de água e 7,95% de enzima, 36°C. A quantidade de enzima foi testada com base na conversão e a temperatura, na faixa ótima da enzima *Lipozyme TL 100L*.

As constantes da cinética foram estimadas inicialmente utilizando 7,95% da enzima Lipozyme e assumindo a hipótese de ter-se um coeficiente de reação como fator independente no meio. Tal parâmetro é importante pois a aplicabilidade de enzima em excesso pode resultar na agregação da enzima, o que acaba expondo o sítio ativo da enzima para moléculas do substrato e assim, o modelo não seria eficiente e teria de reformular as condições de análise (CHOONG et al., 2018). Os valores dos parâmetros estimados do modelo são apresentados na Tabela 34.

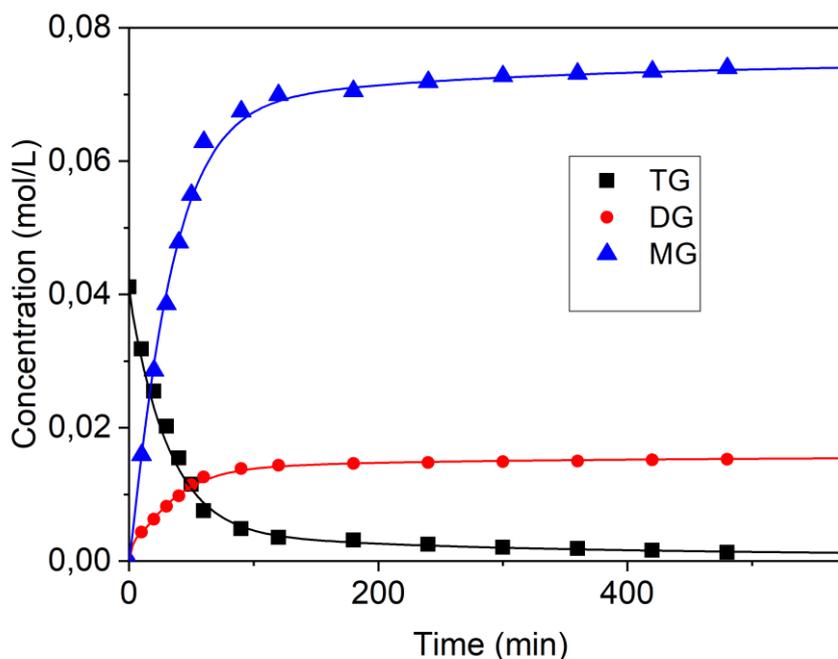
Tabela 34 – Valores estimados das constantes cinéticas de reação

K ₁	23,87
K ₋₁	42,97
K ₂	1,34
K ₃	1,01x10 ⁹
K ₋₃	6,04x10 ⁻⁸
K ₄	95330,59
K ₅	9,82
K ₋₅	10,44
K ₆	15,22
K ₇	0,88
K ₋₇	18,07
K ₈	5,06x10 ⁻⁹
K ₋₈	226,96
K ₉	3,65
K ₋₉	6,13
K ₁₀	289,98
K ₋₁₀	212,34

Fonte: O autor.

Os resultados das simulações são apresentados na Figura 38. Observa-se nesta figura que o modelo proposto representou apropriadamente a cinética de glicerólise do óleo de oliva.

Figura 38 - Cinética da glicerólise do óleo de oliva (7,4% de glicerol, 10% de azeite de oliva, 5% de água e 7,95% de enzima, 36°C e 540min de reação).



Fonte: O autor.

Os dados experimentais da cinética mostram que a concentração do TAG teve uma redução significativa entre os tempos 0 e 120 minutos, indicando que a quantidade de enzima utilizada foi adequada para promover a reação. Da mesma forma, verifica-se que a maior produção de MAG e DAG foi nesta faixa de tempo, uma vez que tais produtos são formados a partir da decomposição do TAG. Isso também foi observado nos trabalhos de CORZO-MARTINEZ et al. (2016) e MILLER et al. (1988) que a maior formação de MAG e DAG se deram nos primeiros 120 minutos de reação. Notou-se também que a formação de MAG foi muito superior à de DAG, porém, ambas estabilizam em tempos semelhantes, o que nos indica mais um sinal que a quantidade de enzima foi suficiente no processo.

Esse modelo de curvas é característico nas reações de hidrólise dos TAG, mesmo com matrizes diferentes. Como por exemplo, na pesquisa de SOLAESA et al. (2017), que os autores realizaram testes de glicerólise enzimática em diversos

sistemas com óleo de sardinha como fonte de TAG. Os autores analisaram teores de MAG e DAG em sistemas micelares e catalizado pela enzima Lipozyme 435. Ao comparar todas as curvas cinéticas dos compostos TAG, MAG DAG e FFA, percebe-se que há um mesmo padrão de formação, com maiores quantidades de formação de MAG, seguidos por DAG e, por último, FFA.

Ao analisar a fração de água no meio reacional, o mesmo não apresentou diferenças significativas, visto que os fatores limitantes para o processo foram a quantidade de enzima e temperatura do sistema. Assim como nos estudos de YANG et al. (1994), IRIMESCU et al. (2002) e BLANCO et al. (2015) que testaram microemulsões com várias enzimas, dentre elas as lipases, de forma imobilizada, ou não, e conseguiram taxas de conversão TAG significativas, sendo que a quantidade de água também fora importante para a estabilização do sistema micelar.

Por sua vez, no trabalho de Moya-Ramírez et al. (2016) os autores obtiveram MAG e DAG a partir de óleo de fritura usado, e a reação de glicerólise com a utilização de várias enzimas foi fortemente dependente da quantidade de água dentro do sistema micelar e nas condições com maiores concentrações de enzima, obteve-se melhores resultados. Contudo, a faixa de conversão de triglicerídeos foi na faixa de 30%, relativamente baixa quando comparado ao presente trabalho. Isto pode ter ocorrido devido a matéria-prima, uma vez que utilizaram o óleo de fritura usado que contém várias impurezas e contaminantes, devido a quebra e oxidação que o óleo fora submetido.

Outro parâmetro importante na reação de glicerólise é a formação de sistema micelar estável. As elevadas conversões de consumo de triglicerídeos mostram que isto aconteceu nos casos estudados.

4.9.1 Correlação entre os modelos de MAG, DAG e TAG

Ao analisar a o coeficiente de correlação entre o modelo teórico e os valores obtidos experimentalmente, obteve-se com ao auxílio do Maple os seguintes coeficientes: Para os MAG: 0,9985; DAG: 0,9990; TAG: 0,9972. Ou seja, obteve-se um modelo ajustado, pois todos os coeficientes foram acima de 0,99. Ressalta-se que não se utilizou os resultados para ácidos graxos livres pois não foi uma variável analisada e o objetivo do presente estudo foi analisar a conversão em MAG e DAG. Sendo assim, esse ajuste de modelo elevado nos mostra que os resultados obtidos

experimentalmente foram de acordo com os obtidos através da modelagem matemática, nos evidenciando que os resultados são coerentes e com boa confiabilidade de método.

4.10 REUTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

No intuito de avaliar a eficiência na reutilização da mesma enzima (reciclos), utilizou-se as enzimas que foram testadas no ponto ótimo e repetiu-se a glicerólise enzimática em triplicata, uma com cada enzima dos testes da Tabela 32, nos mesmos parâmetros definidos anteriormente, com os resultados descritos na Tabela 35.

Tabela 35 – Eficiência da reutilização da enzima no ponto ótimo.

Teste	Temperatura (°C)	Enzima (%)	Eficiência (%)	Desvio padrão	Soma dos quadrados
1	36	7,95	81,24	0,82	0,67
2	36	7,95	82,57		
3	36	7,95	80,61		

Fonte: O autor.

Obteve-se, assim, um valor de conversão médio em 81,47% \pm 1,00%, ou seja, o valor da conversão caiu significativamente e o parâmetro reuso apresenta uma eficiência relativamente menor de conversão do que quando em sua primeira utilização. Isso pode se dar por vários motivos, dentre eles a redução da quantidade de enzima durante a primeira glicerólise ou simplesmente a queda de atividade enzimática por se tratar de uma proteína que pode ter perdido sua função por alguma variação de pH. Ao analisar o desvio padrão das amostras, percebe-se que foi baixo, ou seja, o modelo apresenta um bom ajuste e os valores estão próximos dos valores médios obtidos, o que nos indica que as os testes foram conduzidos de forma correta, já que os três pontos ficaram com valores próximos, não apresentando nenhum *outlier* (REMONATTO, 2013).

Ressalta-se que as amostras utilizadas nesse processo não tiveram quantificação da massa da enzima. Após terminar a primeira reação de glicerólise, as enzimas foram lavadas com hexano entre uma reação e outra. Esse comportamento de queda de rendimento na reutilização da enzima pode ser observado nos resultados dos trabalhos de Molinari (2020), que havia obtido rendimento inicial de, aproximadamente, 98% e, após a reutilização, obteve 32%. O autor estudou a combinação da lipase extraída de *Burkholderia cepacia* imobilizada em vários tipos de

argila (incluindo a *Spectrogel tipo C*) para produção de ésteres etílicos a partir do biodiesel.

No estudo de Cheng et al. (2022), os autores sintetizaram triglicerídeo enriquecido com DHA a partir do éster etílico de DHA (DHA-EE) misturado com glicerol e promoveram a reação de glicerólise enzimática imobilizada com conversão de 97% e, nos testes de reuso, a atividade enzimática reduziu para 80%, afetando, assim, consideravelmente o resultado da conversão. Cheng et al. (2022) encapsularam diversas lipases de origem vegetal em nucleotídeos metálicos combinados a polímeros, estudaram a glicerólise e a transesterificação de fontes de TAG e obtiveram conversão na faixa de 90% no primeiro ciclo da enzima imobilizada. Contudo, esses valores caem para faixa de 78% na reutilização da enzima. Percebe-se que no estudo citado, os valores obtidos foram similares aos que foram encontrados no presente trabalho, ou seja, um valor de conversão próximo a 80% no reuso da enzima.

4.11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados foram essenciais para lapidar o estudo da reação de glicerólise enzimática do azeite de oliva com enzima imobilizada. Os resultados obtidos indicaram elevadas taxas de conversão, empregando a enzima Lipozyme *TL100L* suportada na argila *Spectrogel tipo C* por adsorção. Os dados obtidos são inéditos, pois não encontramos relatos do uso da imobilização da enzima neste suporte. Assim, atingiu-se todos os objetivos propostos, além de obter condições ótimas de preparo do biocatalisador e determinação das condições ótimas de reação.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi investigado a produção de MAG e DAG a partir da reação da glicerólise enzimática do azeite de oliva, empregando enzima *Lipozyme TL100L*, imobilizada pelo processo de adsorção em um suporte de argila bentonita comercial *Spectrogel tipo C*. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para avaliar a estabilidade da enzima *Lipozyme TL100L* por meio das microemulsões, que apresentaram estabilidade e a conversão de TAG. Os resultados da estabilidade e conversão enzimas livres e imobilizadas foram similares a cerca de 91% (nas condições de razão molar 2:1, 7,5% enzima, 45°C) de eficiência no melhor ponto encontrado.

A partir desse ponto, propôs-se métodos para a avaliação e determinação de MAG e DAG que foram equivalentes. Ressalta-se que os resultados para as enzimas imobilizadas foram maiores do que com as livres, o que foi condizente com a literatura e com o esperado, visto que se otimizou as condições de processo e obteve-se valores de conversão na faixa de 95% de conversão de TAG em MAG e DAG, com os parâmetros fixados em razão molar 2:1, 2 horas de reação, 35°C de temperatura e 7,5% de enzima.

Ao avaliar o método de imobilização, obteve-se a condição ótima do processo em 35,96 ° C de temperatura, 7,95 % de enzima e 0,0491 gENZ gSUP⁻¹ de atividade ofertada e, em 2 horas de tempo de reação, alcançou-se a conversão de TAG em MAG e DAG na faixa de 97% de conversão. Assim, com os valores das condições ótimas de adsorção combinados às condições de processo pode-se, assim, otimizar todo o método e encontrar a maior conversão possível da reação preposta.

As variáveis influentes na atividade e conversão do TAG foram a temperatura e a quantidade de enzima. Nessa perspectiva, denota-se que existe correlação entre as duas variáveis resposta, por meio dos testes de ANOVA, teste f, gráficos de superfície de resposta, gráficos comparativos entre os parâmetros estudados, Diagrama de Pareto e demais recursos estatísticos analisados e apresentados na presente pesquisa.

Os resultados do planejamento fatorial DCCR 2², tanto para a glicerólise enzimática quanto para o processo de adsorção, apresentaram os resultados teóricos e experimentais muito próximos e nos dizem que os estudos estão sendo conduzidos

de forma eficiente, visto que se tem grande complexidade em uma modelagem matemática para prever os resultados em função das variáveis pré-estabelecidas.

Ademais, definiu-se e caracterizou-se os compostos que foram trabalhados em todos os quesitos, o suporte, enzima, biocatalisador, TAG, MAG e DAG, bem como a forma da reação, a ordem e a cinética, para que o processo acontecesse por meio das análises estatísticas e determinação dos pontos ótimos de reação, tal qual as melhores condições de biocatalisador que recebera a enzima para a reação.

A otimização da técnica de glicerólise enzimática imobilizada apresentou resultados excelentes nos planejamentos, na otimização da atividade enzimática e na reação de glicerólise. Os estudos de reutilização mostraram que o método diminui a eficiência de conversão após a primeira reação da enzima, contudo, foi de acordo com o esperado, e obteve-se taxas de reuso com 80% de conversão de TAG em MAG e DAG. Ou seja, apesar de ter-se uma queda considerável dos 97% de conversão na primeira reação, ainda assim obteve-se níveis altos de formação dos produtos desejáveis.

Ao avaliar os resultados experimentais com os teóricos, através da simulação do processo por modelagem matemática, obteve-se um ajuste superior a 0,99 e, portanto, um modelo ajustado que comprova a confiabilidade do processo e a alta taxa de conversão obtida na reação de glicerólise enzimática imobilizada.

De modo geral, a pesquisa foi fundamental para disponibilizar um método inovador, biodegradável e conversão altíssima. Monitorou-se todas as variáveis de processo, determinou-se as variáveis significativas e lapidou-se os resultados a fim de que possa facilitar a aplicabilidade e reprodutibilidade da enzima *Lipozyme TL 100L* combinada ao suporte de argila *Spectrogel tipo C* para a reação de glicerólise enzimática imobilizada de TAG, no intuito de formação de MAG e DAG.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.; REY, F.; COSTA, E.; MOREIRA, A.S.P.; PATO, L.; PATO, L.; DOMINGUES, M.R.D.; DOMINGUES, P. Olive (*Olea europea* L. cv. *Galega vulgar*) Seed Oil: A first insight into the major lipid composition of a promising agro-industrial by product at two ripeness stages. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 4, p. 1700381, 2018.

ALVES, T. P. **Extração de compostos bioativos das folhas de espinheira santa (*Monteverdia Aquifolia*) via tecnologia supercrítica utilizando cossolventes e extração assistida por ultrassom**. Tese (doutorado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Toledo, Paraná, 2021.

AMORIM, A.A.; SOUSA, T.A.; SOUZA, A.O. Determinação do pH e acidez titulável da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*). In: VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. **Anais do evento...** Palmas, Tocantins, 2012.

AOAC. **Triglycerides (by Partition Numbers) in Vegetable Oils**. Liquid Chromatographic Method. Official Method, 993.24. Rockville, Maryland: Association of Official Agricultural Chemists, 1996.

ARAKI, C. A.; MARCUCCI, S. M. P.; DA SILVA, L. S.; MAEDA, C. H.; ARROYO, P. A., & ZANIN, G. M. Effects of a combination of lipases immobilized on desilicated and thiol-modified ZSM-5 for the synthesis of ethyl esters from macauba pulp oil in a solvent-free system. **Applied Catalysis A: General**, v. 562, p. 241-249, 2018.

ARAÚJO, C. K. C. **Avaliação da influência de surfactantes químico e biológico na hidrólise enzimática da casca do coco verde após pré-tratamento ácido/alcalino e com peróxido de hidrogênio alcalino**. Dissertação (mestrado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, 2016.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química** – Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Bookman, 2018.

ÁVILA, R. N. A.; SODRÉ, J. R. Physical – chemical properties and thermal behavior of fodder radish crude oil. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 54-57, 2012.

AWADALLAK, J. A.; VOL, F.; RIBAS, M. C.; SILVA, C.; FILHO, L. C.; SILVA, E. An Enzymatic catalyzed palm oil hydrolysis under ultrasound irradiation: Diacylglycerol synthesis. **Ultrasonics Sonochemistry**, Elsevier, v. 20, p. 1002-1007, 2013.

AYBASTIER, Ö.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene–divinylbenzene copolymer using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 3, p. 170-178, 2010.

BABICZ, I.; LEITE, S. G.; DE SOUZA, R. O.; ANTUNES, O. A. C. Lipase catalyzed acylglycerol production under son chemical irradiation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, n. 1, p. 4-6, 2010.

BAESSO, R. S.; SOUZA, A. A.; **O coeficiente de determinação é uma medida confiável no poder explicativo de modelos de estimação do valor intrínseco das ações negociadas na Bovespa**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2010. Disponível em: <http://www.congressosp.fipecafi.org/artigos102010/261.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2017.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Lipase catalyzed modification of milkfat. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 2, 309-341, 1998.

BALESTEROS, M.R.; TAVARES, M.F.M.; RIBEIRO, S.J.L.; POLACHINI, R.C.; MESSADDEQ, Y.; OLIVEIRA, M.A.L. Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis, Wiley Analytical Science**, n. 20, p. 3731-3736, 2007.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, T.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzyme as industrial biocatalyst. **Biotechnology Advances**, v. 33, issue 5, p. 435-456, 2015.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase b from candida antarctica in organic media: enantiospecific production of atenolol acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3, p. 124-132, 2011.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433-2462, 2013.

BARONI, N. A. F. **Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de azeites de oliva identificados como extra virgem produzidos no Brasil**. Dissertação (mestrado em alimentos e nutrição) – Programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2015.

BASTIDA, A; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; LAFUENTE, R. R.; HUGURT, J.; GUIBAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-93, 1998.

BERTAGNOLLI, C.; KLEINÜBING, S. J.; SILVA, M. G. C. Preparation and characterization of a Brazilian bentonite clay for removal of copper in porous beds. **Applied Clay Science**, v. 53, n. 1, p. 73-79, 2011.

BHATTACHARYYA, K. G.; GUPTA, S. S. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 140, n. 2, p. 114-131, 2008.

BON, E. P. S.; PEREIRA, Jr. N. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, 1999.

BLANCO, S.F.M.M.; SANTOS, J.S.; FELTES, M.M.C.; DORS, G.; LICODIEDOFF, S.; LERIN, L.A.; OLIVEIRA, D.; NIHOW, J.L.; FURIGO, A.J. Optimization of diacylglycerol production by glycerolysis of fish catalyzed by Lipozyme TL IM with Tween 65. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, issue 12, p. 2379-2388, 2015.

BRASILEIRO, P. P. F. **Concepções e dimensionamento de microbolhas para um processo de flotação de água oleosa com adição de surfactantes**. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

BÔAS, R. N. V.; TEIXEIRA, L. F.; CASTRO, H. F. Influência da razão molar entre óleo de bagaço e glicerol na síntese de monoglicerídeos via glicerólise contínua em reator de leito fixo. *In*: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. **Anais do evento...** Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

BORNSCHEUER, U. T. Enzymes in Lipid Modification. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 09, 2018.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie**, v. 42, n. 29, p. 3336-3337, 2003.

BORNSCHEUER, U. T.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; YAMANE, T.; KOLISIS, F. N. A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides. **Biotechnology Letters**, v. 16, issue 07, p. 697-702, 1994.

CABRAL, P. S. **Cinética enzimática da hidrólise do óleo de oliva em sistemas batelada e batelada alimentada**. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos, setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, Paraná, 2014.

CAI, C.; GAO, Y.; LIU, Y.; ZHONG, N.; LIU, NING. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B onto SBA-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis. **Food Chemistry**, v. 212, p. 205-212, 2016.

CAMPBELL-PLATT, G. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri, São Paulo: **Editora Manole**, ABDR, 2015.

CAO, X.; SÁNCHEZ, J.M.; FENG, F.; ADLERCREUTZ, P. Acyl migration in enzymatic interesterification of triacylglycerols: Effect of lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizopus ozyrae*, support material, and water activity. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 1579-1587, 2016.

CARRETEIRO, R. P.; BELMIRO, P. N. **Lubrificantes e lubrificação industrial**. Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás. Rio de Janeiro: Interciência, 2006.

CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S. Reverse micelles as reaction media for lipases. **Biochemical**, v. 82, p. 1063-1085, 2000.

CARVALHO, N.; VIDAL, B.; BARBOSA, A.; PEREIRA, M.; MATTEDI, S.; FREITAS, L.; LIMA, A. S.; SOARES, C. Lipase immobilization on silica xerogel treated with protic ionic liquid and its application in biodiesel production from different oils. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1829, 2018.

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

CAYUELA-SÁNCHEZ, J. A. Informative Note: Captive fatty acids of fresh olive oils? **Grasas y Aceites**, v. 72, n. 2, p. e413-e413, 2021.

CHEN, M.; WU, H.; LI, Z.; WU, K.; JIAO, Y.; ZHOU, C. Preparation of reduced graphene oxide porous beads for lipase immobilization and its application for oil adsorption and glycerolysis reaction in situ. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 294, 2020.

CHENG, Y.; ZHANG, L.; LI, Z.; YANG, G.; CHEN, J.; BI, Y. Synthesis of DHA-enriched triglyceride through glycerolysis: Process parameters and reuse of partially inactivated lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 178, 2022.

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

CHOONG, T.S.Y.; YEOH, C.M.; PHUAH, E.T.; SIEW, W.L.; LEE, Y.Y.; TANG, T.K. Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using *Lipozyme TLIM* in solvent-free system. **PLoS One**. 2018.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas-uma revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1282, 2007.

COLLAÇO, A.C.A.; AGUIEIRAS, E.C.G.; CAVALCANTI, E.D.C.; FREIRE, D.M.G. Development of an integrated process involving palm industry co-products for monoglyceride/diglyceride emulsifier synthesis: Use of palm cake and fiber for lipase production and palm fatty-acid distillate as raw material. **LWT – Science Direct**, v. 135, 2021.

CORREIA, A. C. V. B.; FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, M. S. L. Produção de emulsionantes através da glicerólise de óleo de bagaço de azeitona catalisada pela lipase da *Candida rugosa* imobilizada em espumas de poliuretano. **Millenium**, n. 41, p. 7-15, 2011.

CORTEZ, D. V.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, v. 40, n. 1, São Paulo, 2017.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; VAZQUEZ, L.; ARRANZ-MARTÍNEZ, P.; MENÉNDEZ, N.; REGLERO, G.; TORRES, C.F. Production of a bioactive lipid-based delivery system from ruffian liver oil by enzymatic glycerolysis. **Food Bioprod Process**. 2016.

DANTAS, J.R.A.; FREITAS, V.P. M. GOPINATH, T.; FEITOSA, R.N. **Depósitos de bentonita da região de Boa Vista**. Estado da Paraíba, Departamento Nacional de Produção Mineral, 1984.

DARLEY, H.C.H.; GRAY, G.R., **Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids**. 5ª Edição, Gulf Publishing Company, Houston, Texas, 1988.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2013.

DEMAJOROVIC, J. Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos – As novas prioridades. **Revista de Administração de Empresas**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 88-93, 1995.

DIAS, C.S.; RODRIGUES, R.S.; GONÇALVES, W.F.; JACQUES, A.; CREXI, V.T.; AZEVEDO, M. Composição fitoquímica do azeite e do bagaço de azeitona de uma agroindústria da região da Campanha. *In*: 14ª Jornada da Pós-Graduação e Pesquisa. **Anais do evento... CONGREGA URCAMP**, 2017.

DIAS, M. R.; PAULOVELOSO, A. D.; DO AMARAL, L. F.; BETIM, R. T.; NASCIMENTO, M. G.; PILISSÃO, C. Immobilization of *Burkholderia cepacia* on pristine or functionalized multi-walled carbon nanotubes and application on enzymatic resolution of (rs)-1-phenylethanol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, 1876-1884, 2018.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2, p. 220-225, 2009.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M.; FILIPIC, S.; ABGABA, D. Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Belgrado, Sérvia, v. 433, p. 25-33, 2012.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M. The influence of cosurfactants and oils on formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 231-239, 2008.

DONG, H.; LI, J.; LI, Y.; HU, L.; LUO, D. Improvement of catalytic activity and stability of lipase by immobilization on organobentonite. **Chemical Engineering Journal**, v. 181, p. 590-596, 2012.

DONG, L.; GE, C.; QIN, P.; CHEN, Y.; XU, L. Q. Immobilization and catalytic properties of candida lipolytic lipase on surface of organic intercalated and modified MgA1-LDHs. **Solid State Sciences**, v. 31, p. 8-15, 2014.

ERICSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDTRON, A. G.; BACKVALL, J. E. X-ray structure of candida antarctica lipase - a shows a novel lid structure and a likely mode of an interfacial activation. **Journal of Molecular Biological**, v. 376, p. 109-119, 2008.

EVARISTO, A. B.; GROSSI, J. A. S.; PIMENTEL, L. D.; DE MELO GOULART, S.; MARTINS, A. D.; DOS SANTOS, V. L.; MOTOIKE, S. Harvest and post-harvest conditions influencing macauba (*Acrocomia aculeata*) oil quality attributes. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. p. 63-73, 2016.

FEDERSEL, H. J.; MOODY, T. S.; TAYLOR, S. J. C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2822, 2021.

FELTES, M. M. C. **Produção de monoacilgliceróis e diacilgliceróis ricos em ácidos graxos ômega-3 a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Santa Catarina, 2011.

FERNANDES, M.L.M.; SAAD, E.B.; MEIRA, J.A.; RAMOS L.P.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalyzed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Delft, v. 44, p. 8-13, 2007.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemical and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1, p. 185- 197, 1998;

FERREIRA, A.C.V.; GARCIA, E.C.D.; MOREIRA, A.A.; MAURO, M.F.F.L.; RIBEIRO, M.L.L. Comparação de Metodologias para Determinação de Atividade de beta-glicosidase de Cotilédones de Soja. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 90-93, 2013.

FERREIRA, G.F.; PESSOA, J.G.B.; PINTO, L.F.R.; FILHO, R.M.; FREGOLENTE, L.V. Mono- and diglyceride production from microalgae: Challenges and prospects of high-value emulsifiers. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, part A, p. 589-600, 2021.

FERREIRA, M. **Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando**

seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2017.

FERRETI, C. A.; SPOTTI, M. L.; COSÍMO, J. I. Diglyceride-rich oils from glycerolysis of edible vegetables oils. **Catalysis Today**, v. 302, p. 233-241, 2017.

FIAMETTI, K. G. **Desenvolvimento de técnicas alternativas de fluidos pressurizados e ultrassom para produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática de óleo de oliva.** Tese (doutorado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2012.

FIAMETTI, K. G. **Produção enzimática de monoglicerídeos a partir de óleo de oliva na presença de surfactante.** Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Regional Integrada ao Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Rio Grande do Sul, 2009.

FINCO, G. F. **Avaliação e determinação da produção de monoglicerídeos e diglicerídeos a partir da reação de glicerólise enzimática do azeite de oliva.** Dissertação (Mestrado em processos químicos e biotecnológicos) – Programa de pós-graduação em processos químicos e biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Toledo, Paraná, 2018.

FINCO, G.F.; FIAMETTI, K.G.; LOBO, V.S.; SILVA, E.A.; PALÚ, F.; WANCURA, J.H.C; RODRIGUES, M.L.F.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J.V. Kinetic study of liquid lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil using *Lipozyme TL 100L*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 99, n. 7, p. 559-568, 2022.

FLEXOR, G.; KATO, K. Y. M.; DO SOCORRO LIMA, M.; ROCHA, B. N. Dilemas institucionais na promoção dos biocombustíveis: o caso do programa nacional de produção e uso de biodiesel no Brasil. **Cadernos do Desenvolvimento**, v. 6, n. 8, p. 329-354, 2018.

FOCKING, A. M. **Estudo da hidrólise do óleo de soja catalizada pela enzima lipozyme TL IM.** Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2017.

FOLETTTO, E. L.; ALVES, C. C. A.; PORTO, L. M. Regeneração e reutilização de uma argila comercial utilizada na clarificação de óleo vegetal. **Cerâmica Industrial**, v. 8, n. 1, p. 43-45, 2003.

FONSECA, S. B. C. **Aspectos técnicos e avaliação de metodologia para o acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo derivado enzimático lipozyme TL IM.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterification's. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 769-777, 2007.

FOSSATTI, G. **Desenvolvimento de técnicas de estabelecimento in vitro e enraizamento por estaquia de três variedades de oliveira (*Olea europaea L.*)**. Trabalho de Conclusão de curso (graduação em agronomia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2017.

FRANZOL, A.; REZENTE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, Revistas Científicas da América Latina e do Caribe, Espanha e Portugal, v. 25, p. 01-09, 2015.

FREGOLENTE, L. V. **Obtenção de monoglicerídeos de alta concentração através do processo de destilação molecular**. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em engenharia química, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2006.

FREIRE D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**, v. 16, p. 369-385, 2008.

FURTADO, M.A.M.; FERRAZ, F.O. Determinação de umidade em alimentos por intermédio de secagem em estufa convencional e radiação infravermelha – Estudo comparativo em alimentos com diferentes teores de umidade. **Faculdade de Farmácia e Bioquímica** – Departamento de Alimentos e Toxicologia, 2008.

GAO, W. W. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. **Biomechanical Engineering Journal**, v. 99, p. 67-84, 2015.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 5, 2006.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado em química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2006;

GARCIA-MESA, J. A.; PEREIRA-CARO, G.; FERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; GARCIA-ORTIZ, C. C. MATEOS R. Influence of lipid matrix in the bitterness perception of virgin olive oil. **Food Quality and Preference**, v.19, p. 421-430, 2008.

GROSSI, M.; LECCE, G.D.; TOSCHI, T.G.; RICCÒ, B. Fast and Accurate Determination of Olive Oil Acidity by Electrochemical Impedance Spectroscopy. **IEEE Sensors Journal**, v. 14, n. 3, p. 2947-2954, 2014.

GROSSI, M.; PALAGANO, R.; BENDINI, A.; RICCÒ, B.; SERVILI, M.; GONZÁLEZ, L.G.; TOSCHI, T.G. Design and in-house validation of a portable system for the

determination of free acidity in virgin olive oil. **Food Control**, v. 104, p. 208-216, 2019.

GOLANI, M.; HAJELA, K.; PANDEY, P. Screening, Identification, Characterization and Production of Bacterial Lipase from Oil Spilled Soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 3, p. 745-763, 2016.

GOLE, V. L.; GOGATE, P. R. Intensification of glycerolysis reaction of higher free fatty acid containing sustainable feedstock using microwave irradiation. **Fuel Processing Technology**, v. 118, p. 110-116, 2014.

GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Degradação térmica de tocoferol e produtos de oxidação em diferentes classes do azeite de oliva utilizando espectroscopia UV-VIS e MCR-ALS. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 06, 2015.

GOUVINHAS, I.; ALMEIDA, J.M.M.M.; CARVALHO, T.; MACHADO, N.; BARROS, A.I.R.N.A. Discrimination and characterization of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 174, p. 226-232, 2015.

GUAN, W.; ZHOU, W.; LU, C.; TANG, B.Z. Synthesis and design of aggregation-induced emission surfactants: Direct observation of micelle transitions and microemulsion droplets. **Angewandte Chemie**, v. 54, p. 15160-15164, 2015.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009.

HAMMOND, D. A.; KAREL, M. E.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic reactions in supercritical gases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 11, p. 393-397, 1985.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, v. 22, issue 6, p. 475-476, 1973.

HARWOOD, J.L.; WOODFIELD, H.K.; CHEN, G.; WESELAKE, R. Modification of oil crops to produce fatty acids for industrial applications. **Fatty acids – Chemistry, Synthesis and Applications**, p. 187-236, 2017.

HAYES, D. G. Fatty acids-based surfactants and their uses. **Fatty Acids**, Chapter 11, p. 355-384, 2017.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. Transparent water-in-oil dispersion the oleopathic hydro-micelle. **Nature**, v. 152, p. 102-103, 1943.

HU, D. J.; CHEN, J. M.; XIA, Y. M. A comparative study on production of middle chain diacylglycerol through enzymatic esterification and glycerolysis. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 1457-1463, 2013.

HUSSIN, F.; AROUA, M. K.; DAUD, W. M. A. W. Textural characteristics, surface chemistry and activation of bleaching earth: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 1, p. 90-106, 2011.

IRIMESCU, R.; IWASAKI, Y.; HOU, C.T. Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, issue 9, p. 879-883, 2002;

ISLAM, A.; MASOUMI, H.R.F.; TEO, S.H.; ABDOLLAHI, Y.; JANAUN.; YAP-TAUFIQ, Y.H. Glycerolysis of palm fatty acid distillate for biodiesel feedstock under different reactor conditions. **Fuel**, v. 174, p. 133-139, 2016.

JALA, R.C.R.; CHEN, B.; LI, H.; ZHANG, Y.; CHEONG, L.Z.; YANG, T.; XU, X. Enzymatic preparation and characterization of soybean lecithin-based emulsifiers. **Grasas y aceites – International Journal of Fats and Oils**, v. 67, n. 4, 2016.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Springer Nature**, v. 20, p. 801-821, 2014.

JIAN, X.; GANGZUO, L.; ZHIQIANG, Z.; GUOWEI, Z.; KEJIAN, J. A study of the microstructure of CTAB/1-butanol/octane/water system by PGSE-NMR, conductivity and cryo-TEM. **Colloids and Surfaces - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 191, p. 269-278, 2001.

JONSSON, C.M.; CASTRO, V.L.S.; TESSARI, C.M.; GRANERO, G. Metodologias de análise da atividade de duas enzimas com potencial uso em biossensores. **3º Workshop de Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio – Embrapa Soja**, Londrina, 2007.

JUNIOR, H. **Conversão enzimática de triacilgliceróis em mono e diacilgliceróis de interesse industrial**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações) - Programa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-16112017-171553/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

JUNIOR, I. I. **Rotas biotecnológicas para síntese de monoacilgliceróis**. Tese (doutorado em ciências farmacêuticas) – Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

JUNIOR, R. H. M. **Produção de biodiesel a partir de óleo de palmiste**: aplicação de combi-lipases como biocatalisadores em reatores descontínuo e contínuo. Dissertação (mestrado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

KAMEL, G.; BORDI, F.; CHRONOPOULOU, L., LUPI, S.; PALOCCI, C.; SENNATO, S.; VERDES, P. V. Adsorption of *Candida rugosa* lipase at water polymer interface: The case of poly (DL) lactide. **Surface Science**, v. 605, n. 23, p. 2017-2024, 2011.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 503-508, 2012.

KARLESKIND, A. **Oils and Fats**: Manual. Paris, França: Lavoisier Publishing, 1996.

KASZNAR, I. K.; GONÇALVEZ, B. M. L. Regressão múltipla: uma digressão sobre seus usos. **IBCI – Institutional Business Consultoria Internacional**, p. 3-20, 2016. Disponível em: http://ibci.com.br/Regressao_Multipla.pdf. Acesso em: 07 ago. 2022.

KAZLAUKAS R. J.; BORNSCHEUER U. T. Biotransformation with Lipases. **A Multi Volume Comprehensive Treatise in Biotechnology**, v. 8, p. 147-188, 1998.

KHALED, S. Effect of olive oil acidity on skin delivery of diclofenac: in vitro evaluation and ex vivo skin permeability studies. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 18, n 1, p. 234-242, 2022.

KHAN, M. F.; SINGH, M. K.; SEN, S. Measuring size, size distribution, and polydispersity of water-in-oil microemulsion droplets using fluorescence correlation spectroscopy: Comparison to dynamic light scattering. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 120, p. 1008-1020, 2016.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. Olive Oil: A Review. **Advances in Food Research**, v. 31, p. 453-488, 1987.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel**. 1. ed. São Paulo: Editora Blucher, 2006.

KOBLITZ, M. G. B. **Purificação e Caracterização de Lipase de *Rhizopus sp.* e sua Aplicação na Síntese de Monoacilgliceróis**. Tese (doutorado em engenharia de alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos, UNICAMP, Campinas, 2003.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Process optimization using response surface design and pilot plant production of dietary diacylglycerols by lipase-catalyzed glycerolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7059-7066, 2005.

KRUGER, R.L.; SYCHOSKI, M.; BALEN, M.; NINOW, J.L.; CORAZZA, M.L. Estudo da glicerólise enzimática na produção de mono e diacilgliceróis utilizando óleo de oliva. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 3, p. 331-351, 2011.

KRUGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática do óleo de oliva**. Tese (doutorado em engenharia de alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia química e engenharia de alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2010.

KUWAMURA, Y.; CHIOU, W. A.; MINODA, H.; DOHRMANN, R.; KAUFHOLD, S. A Novel Method of Investigating Wet Bentonite Clay Particles in TEM. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19.S2, 490-491, 2013.

LAN, D.; POPOWICZ, G.M.; PAVLIDIS, I.V.; ZHOU, P.; BORNSCHEUER, U.T.; WANG, Y. Conversion of a mono – and diacylglycerol lipase into a triacylglycerol lipase by protein engineering. **Chembiochem**, v. 16, issue 10, p. 1431-1434, 2015.

LAWRENCE, M. J.; REES, D. G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Arlington, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEI, M.; SUGAHARA, J.; HEWITT, D.; BEANE, D.; JAYAKAR, R.; CORNELL, C.; SKIDMORE, K.; KAO, Y.H.; JI, J. The effects of membrane filters used in biopharmaceutical processes on the concentration and composition of polysorbate 20. **Biotechnology Progress**, v. 29, issue 06, p. 1503-1511, 2013.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**. Blucher, EUA: John Wiley & Sons Inc., 2000.

LI, K.; FAN, Y.; HE, Y.; ZENG, L.; HAN, X.; YAN, Y. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16473, 2017.

Li, W.; Du, W.; Li, Q.; Li, R.-W.; Liu, D. Dependence on the properties of organic solvent: Study on acyl migration kinetics of partial glycerides. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5737-5742, 2010.

LIMA, A.P.; ASCHENBRENNER, E.; OLIVEIRA, S.N.; DOUCET, J.B.; WEISS, C.K.; ZIENER, U.; FONSECA, L.; RICARDO, N.M.P.S.; FREITAS, L.R.; PETZHOLD, C.S.; LANDFESTER. Towards regioselective enzymatic hydrolysis and glycerolysis of tricaprilyn in miniemulsion and the direct preparation of polyurethane from the hydrolysis products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 127-137, 2013.

LIMA, A.P.; ASCHENBRENNER, E.; OLIVEIRA, S.N.; DOUCET, J.B.; WEISS, C.K.; ZIENER, U.; FONSECA, L.; RICARDO, N.M.P.S.; FREITAS, L.R.; PETZHOLD, C.S.; LANDFESTER. **Aplicação e definição de metodologias para melhoria contínua no processo de produção na área das margarinas**. Dissertação (mestrado em tecnologia e segurança alimentar) – Programa de pós-graduação em Engenharia Alimentar, Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT, Lisboa, Portugal, 2015.

LIMA, R. T. **Produção de células íntegras de *Penicillium citrinum* para aplicação na hidrólise do óleo de soja**. 2017, 79 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

LIMA, V. M. G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. Tese (doutorado em ciências biológicas) – Programa de pós-graduação em bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

LOPES, T. J. **Desenvolvimento de estratégias para aperfeiçoar a utilização de argilas adsorventes em processos industriais**. Tese (doutorado em engenharia química). Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2006.

LU, J.; LIYANAGE, P.J.; SOLAIRAJ, S.; ADKINS, S.; ARACHCHILAGE, G.P.; KIM, D.H.; BRITTON, C.; WEERASOORIYA, U.; POPE, G.A. New surfactant developments for chemical enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 120, p. 94-101, 2014.

LUTZ, I. A. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: ANVISA, 2008.

MACHADO, M. S. **Nanocompósito de poliestireno reciclado, bentonita sódica e hemi-hidrato de sulfato de cálcio: obtenção e caracterização**. Tese (doutorado em engenharia química). Programa de pós-graduação em engenharia química. Universidade de São Paulo, 2016.

MAGALHÃES, I.S. **Hidrólise enzimática assistida por ultrassom da caseína do leite de cabra: efeitos na cinética de hidrólise, solubilidade e atividade antioxidante dos hidrolisados**. 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

MAIA, G. S.; DE ANDRADE, J. R.; DA SILVA, M. G.; VIEIRA, M. G. Adsorption of diclofenac sodium onto commercial organoclay: Kinetic, equilibrium and thermodynamic study. **Powder technology**, v. 345, p. 140-150, 2019.

MANZOTTI, F.; DOS SANTOS, O. A. A. Evaluation of removal and adsorption of different herbicides on commercial organophilic clay. **Chemical Engineering Communications**, p.1-18, 2019.

MAPRIC. Produtos farmacêuticos e Cosméticos. **Boletim técnico do TWEEN 80**. 2013.

MARTÍNEZ, M.C.; VÁZQUEZ, L; MARTÍNEZ, P.A.; MENÉNDEZ, N.; REGLERO, G.; TORRES, C.F. Production of a bioactive lipid-based delivery system from ratfish liver oil by enzymatic glycerolysis. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 311-322, 2016.

MARTÍNEZ, P.A.; MARTÍNEZ, M.C.; VÁZQUEZ, L; REGLERO, G.; TORRES, C.F. Lipase catalyzed glycerolysis of ratfish liver oil at stirred tank basket reactor: A kinetic approach. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 38-45, 2018.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and

selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MATHPATI, A. C.; VYAS, V. K.; BHANAGE, B. M. Kinetic resolution of 1, 2-diols using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase: A combined experimental and molecular dynamics investigation. **Journal of biotechnology**, v. 262, p. 1-10, 2017.

MATOS, L. M.; LEAL, I. C.; SOUZA, R. O. Diacylglycerol synthesis by lipase-catalyzed partial hydrolysis of palm oil under microwave irradiation and continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 1, p. 36-39, 2011.

MATTE, C.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J.; BENVENUTTI, E.V.; COSTA, T.M.H.; RODRIGUES, R.C.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Physical-Chemical Properties of the Support Immobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, 2017.

MATSUO, N.; TOKIMITSU, I. Metabolic characteristics of diacylglycerol. **Inform**, v. 12, p. 1098-1102, 2001.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; DE LC GIORDANO, R.; & DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011.

MEHMOOD, T.; AHMAD, A.; AHMED, A.; AHMED, Z. Optimization of olive oil-based O/W nano emulsions prepared through ultrasonic homogenization: A response surface methodology approach. **Food Chemistry**, v. 229, p. 790-796, 2017.

MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 65, p. 927-931, 1988.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa 1/2012. **Diário Oficial da União**, 2012. Disponível em: <https://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=629707739>. Acesso em: 14 Jul. 2022.

MOHAMED, O.; BENSHEB, F.; BANO, H.; BEHI, S.; JARRAR, M. Evaluating the Role of the Appropriate Catalysts on the Efficacy of Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 3, p. 468-47, 2015.

MOLINARI, D. **Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* em argila para aplicação na produção de ésteres etílicos**. Tese (doutorado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, 2020.

MOLINARI, D.; MARTIN, L.S.; ZANIN, G.M.; SILVA, E.A. Imobilização de enzima lipase de *Burkholderia cepacia* em argila por adsorção para aplicação como biocatalisador. *In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. Anais do evento...* 2018.

MORALES, M. T.; LUNA, G.; APARICIO, R. Comparative study of virgin olive oil sensory defects. **Food Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 293-301, 2005.

MORE, S.; GOGATE, P. R.; WAGHMARE, J. S. Intensification of acid catalyzed synthesis of tricaprylin using ultrasound pretreatment. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 120, p. 317-329, 2017.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1998.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos. **Documentos 108 – Embrapa Agroindustrial Tropical**, Fortaleza, Ceará, 2007.

MOYA-RAMÍREZ, I., GARCÍA-ROMAN, M., FERNÁNDEZ-ARTEAGA, A. Waste frying oil hydrolysis in a reverse micellar system. **ACS Sustain Chem Eng**. 2016.

MUIK, B.; LENDL, B.; DÍAZ, A.M.; CAÑADA, M.J.A. Fourier Transform Raman Spectrometry for the Quantitative Analysis of Oil Content and Humidity in Olives. **Applied Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 233-237, 2003.

MULLER, R. L. **Obtenção de mono e diacilgliceróis via glicerólise enzimática como alternativa para aproveitamento da glicerina obtida na produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em tecnologia ambiental) – Programa de pós-graduação em concentração em gestão e tecnologia ambiental da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, 2013.

NASCIMENTO, E. S.; NETO, A.; SILVA, M. G. C.; ANDREO DOS SANTOS, O. Síntese e caracterização de argila organofílica utilizada na remoção de óleos combustíveis. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 251-254, 2014.

NASCIMENTO, R. P.; AARESTRUP, B. J. V. Linhaça e azeite de oliva extra-virgem: composição nutricional e efeitos na colite ulcerativa. **Revista Nutrição Brasil**, v. 16, n. 3, p. 182-192, 2017.

NDIAYE, P. M. **Equilíbrio de Fases de Óleos Vegetais e de Biodiesel em CO₂, Propano e n-Butano**. Tese (doutorado em engenharia química) – Programa de pós-graduação de engenharia química, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2004.

NELDER, J. A; MEAD, R. A. A Simplex Method for Function Minimization Comput. **The Computer Journal**, v. 7, n. 4, 1965.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios De Bioquímica De Lehninger**. 7. ed. Artmed, 2018.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, p. 1109-1115, 1916.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. T.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85, p. 71-92, 2013.

NICHOLSON, R. A. **Structuring Lipids Through Glycerolysis**. Tese (doutorado em ciência dos alimentos) – Programa Food Science, Universidade de Ghelph, Ontário, Canadá, 2021.

NITBANI, F.O.; TJITDA, P.J.P.; NUROHMAH, B.A.; WOGO, H.E. Preparation of Fatty Acid and Monoglyceride from Vegetable Oil. **Journal of Oleo Science**, v. 69, issue 4, p. 277-295, 2020.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, M. V. S.; MOLGERO, P. C.; DA RÓS, S. M.; CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by Burkholderia cepacia encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, p. 445-451, 2014.

OLIVEIRA, T; GUEGAN, R; THIEBAULT, T; MILBEAU, C; MULLER, F; TEIXEIRA, V; GIOVANELA, M; BOUSSAFIR, M. Adsorption of diclofenac onto organoclays: Effects of surfactant and environmental (pH and temperature) conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 558-566, 2017.

PACETTA, C.F. **Estudo de diferentes metodologias para a obtenção de extratos de folhas de oliveira (Olea europaea) contendo oleuropeína**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia dos Alimentos), USP, São Paulo, 2013.

PACHECO, C.; PALLA, C.; CRAPISTE, G.H.; CARRIN, M.E. Simultaneous quantitation of FFA, MAG, DAG and TAG in enzymatically modified vegetable oils and fat. **Food Analytical Methods**, v. 7, issue 10, p. 2013-2022, 2014.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Organoclays: properties, preparation and applications. **Applied Clay Science**, v. 42, n. 1, p. 8-24, 2008a.

PAIVA, L. B.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. R. V. Organophilic Clays: Characteristics, Preparation Methods, Intercalation Compounds And Characterization Techniques [argilas Organofílicas: Características, Metodologias De Preparação, Compostos De Intercalação E Técnicas De Caracterização]. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 213 - 226, 2008b.

PALFEY, B. A.; SWITZER, R. L. Kinetics of Enzyme Catalysis. **American Chemical Society**, p. 350-412, 2022.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 199-207, 2011.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Identity and quality index evaluation of olive oil – proposed to Brazilian laws actualization. **Food Science and Technology**, v. 18, n. 4, 1998.

PERKINS, C.; SIDDIGUI, S.; PURI, M.; DEMAIN, A.L. Biotechnological applications of microbial bioconversions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1050-1065, 2016.

PESCARA, P. M. **Estudo da formação de microemulsões de água em óleo de Oliva**. Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnologia de Processos Químicos, UTFPR, Toledo, 2016.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511-525, 2015.

PUNEKAR, N. S. Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. **Springer**, p. 237-274, 2018.

QUINTANA-GOMÉZ, L; LADERO, M.; CALVO, L. Enzymatic production of biodiesel from alperujo oil in supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, 2021.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in colloid and interface science**, v. 162, n. 1-2, p. 87-106, 2011.

RAIZER, E. **Uso de ultrassom na síntese de diacilglicerol via hidrólise enzimática de óleo de girassol**. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Toledo, Paraná, 2015.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2012.

RAMÍREZ, I. M.; ROMÁN, M. G.; ARTEAGA, A. F. Waste frying oil hydrolysis in a reverse micellar system. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 1025-1031, 2016.

REBELO, L. P.; NETTO, C. G.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Enzymatic kinetic resolution of (RS)-1-(Phenyl) ethanol's by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1537-1542, 2010.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 6, n. 2, p. 145– 150, 2002.

REMONATTO, D. **Glicerólise enzimática de óleos vegetais assistida por ultrassom em meio livre de solvente orgânico sob agitação.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.

RODRIGUES, M.L.F.; SILVA, E.A.; BORBA, C.E.; OLIVEIRA, A.C.D.; KRUGER, C.; RAIMUNDO, R.W.; SILVA, L.P.; RODRIQUES, M.L.F.; STUANI, B.T. Produção de enzimas hidrolíticas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.* Isolado das folhas de *Ricinus communis L.* **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v.4, p. 129-145, 2015.

ROH, S.; LEE, S.; KIM, I.H.; KIM, B.H. Enzymatic structural modification of monogalactosyldiacylglycerols for potential modulation of hydrophile-lipophile balance. **Food Chemistry**, v. 385, n. 15, 2022.

ROSA, A. A. **Composição química e estabilidade térmica de azeite de oliva (*Olea europaea L.*) produzido em Canguçu-RS.** Dissertação (mestrado em tecnologia de alimentos) – Programa de pós-graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2021.

ROSENBROCK, H. H. Some general implicit processes for the numerical solution of differential equations. **The Computer Journal**, v. 5, Issue 4, p. 329–330, 1963.

ROSS, C. S.; SHANNON, E. V. The minerals of bentonite and related clays and their physical properties. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 9, n. 2, p. 77-96, 1926.

RUEDA, N.; DOS SANTOS, J. C. S.; TORRES, R., ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Chapter four-immobilization of lipases on heterofunctional octyl–glyoxyl agarose supports: improved stability and prevention of the enzyme desorption. **Methods in Enzymology**, v. 571, p. 73-85, 2016.

RUÍZ-GUTIÉRREZ, V.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 885, p. 321-341, 2002.

SALES, M. M. **Esterificação do ácido oleico com butanol utilizando diferentes catalisadores ácidos.** Trabalho de conclusão de curso (química bacharelado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Curitiba, Paraná, 2021.

SALIS, A.; BHATTACHARYYA, M. S.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1, p. 262–269, 2009.

SÁNCHEZ, J.L.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; CARRETERO, A.S.; GUTIÉRREZ, A.F. Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 04, p. 201-211, 2010.

SANTIN, C.M.T.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; DALLA ROSA, C. Estudos das lipases Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM e Novozym 435 para a produção de biodiesel. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, 2015.

SANTIN, C. M. T; MICHELIN, S.; SCHERER, R. P.; VALÉRIO, A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Comparison of macauba and soybean oils as substrates for the enzymatic biodiesel production in ultrasound-assisted system. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 35, p. 525-528, 2017.

SANTOS, C.C.; OLIVEIRA, D.F.; ALVES, L.W.R.; SOUZA, I.F.; FURTADO, D.A. Efeito de extratos orgânicos, associados ao surfactante Tween 80, na germinação e crescimento de plântulas de alface. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 296-299, 2004.

SANTOS, C. O. S. **Azeite de oliva condimentado com diferentes formas de apresentação de alho (*allium sativum*)**. Dissertação (mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Pinhalzinho, Santa Catarina, 2021.

SANTOS, J.S.; DORS, G.; OLIVEIRA, D.; BLANCO, S.F.M.M.; OLIVEIRA, J.V.; JÚNIOR, A.F.; NINOW, J.L. Glicerólise de Óleo de peixe catalisada por lipase comercial de *Rhizomucor miehei* em meio com surfactante de certo grau alimentício. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 46-51, 2013.

SANTOS, J. S. **Produção de diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de peixe utilizando meio com surfactante de grau alimentício**. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Pós-graduação em engenharia química e engenharia de alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

SANTOS, M. C. **Síntese de solketal a partir de glicerol e seu uso como precursor na síntese de ésteres de solketal e monoacilglicerídeos**. Dissertação (mestrado em biocombustíveis) – Programa de pós-graduação em Biocombustíveis. Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2016.

SANTOS, R. A. **Desenvolvimento de microemulsões e sua transformação *in situ* em géis de fase líquido-cristalina como plataforma para liberação sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do alcoolismo**. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SAUER, T. **Degradação fotocatalítica de corante e efluente têxtil**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2002.

SCHMAL, M. **Cinética e Reatores – Aplicação na Engenharia Química**. 2. ed. Synergia, 2010.

SECUNDO, F.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J.; CHELARU, C.; FERRANDI, E. E.; DUMITRIU, E. Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1, p. 350-361, 2008.

SEONG-KOON, L.; CHIN-PING, T.; KAMARIAH, L.; MOHD, S. A. Y.; OI-MING, L. Diacylglycerol Oil—Properties, Processes and Products: A Review. **Food Bioprocess Technology**, v. 1, n. 3, p. 223-233, 2007.

SILVA, A. R. V.; FERREIRA, H. C. Argilas bentoníticas: conceitos, estruturas, propriedades, usos industriais, reservas, produção e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 2, p. 26-35, 2008.

SILVA, J. A. P. **Desenvolvimento de poliuretano empregando poliálcool de óleo de andiroba obtido via catálise enzimática**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017^a.

SILVA, L. M. S. **Avaliação voltamétrica da conversão do óleo de babaçu (*orbignya phalerata*) em biodiesel**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017b.

SILVA, J.D.F; SILVA, Y.P.; PIATNICKI, C.M.S.; BOCKEL, W.J.; MENDONÇA, C.R.B. Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 9, 2015.

SILVA, R. S. **Desenvolvimento de soluções para aproveitamento de subproduto da produção de Biodiesel e outras matérias-primas com acidez livre**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 2015.

SIMSEK, E. B.; SALOGLU, D. Exploring the structural and catalytic features of lipase enzymes immobilized on g-C₃N₄: A novel platform for biocatalytic and photocatalytic reactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 337, 2021.

SINHA, S. DHAKATE, S. R.; KUMAR, P.; MATHUR, R. B.; TRIPATHI, P.; CHAND, S. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of Chito oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 152–157, 2012.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. Cengage Learning, Editora Trilha, 2014.

SOLAESA, A.G.; SANZ, M.T.; MELGOSA, R.; BELTRÁN, S. Kinetic study and kinetic parameters of lipase-catalyzed glycerolysis of sardine oil in homogeneous medium. **Chinese's Journal of Catalysis**, v. 37, p. 596-606, 2016.

SOLAESA, SOLAESA, A.G.; SANZ, M.T.; MELGOSA, R.; BELTRÁN, S. Substrates emulsification process to improve lipase-catalyzed sardine oil glycerolysis in different systems. Evaluation of a lipid oxidation of the reaction products. **Food Research International**, v. 100, part 1, p. 572-578, 2017.

SOMA, J.; PAPADOPOULOS, D. Ostwald Ripening in Sodium Dodecyl Sulfate-Stabilized Decane-in-Water Emulsions. **Journal Colloid Interface Science**, v. 181, issue 1, p. 225-231, 1996.

SOUZA, A. A.; FARIAS, R. F. **Introdução ao trabalho estatístico e a cinética química**. Cinética Química – Teoria e Prática. Campinas: Editora Átomo, 2008.

STOFELA, S. K.; DE ALMEIDA NETO, A. F.; GIMENES, M. L.; VIEIRA, M. G. Adsorption of toluene into commercial organoclay in liquid phase: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 6, p. 998-1008, 2015.

STREAM, Chemicals. **Catalog 06-3140**. Strem Chemicals Inc, 2017.

SU, F.; LI, G.; FAN, Y.; YAN, Y. Enhancing biodiesel production via a synergic effect between immobilized *Rhizopus oryzae* lipase and Novozymes 435. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 298-304, 2015.

SU, E.; WEI, D. Improvement in lipase-catalyzed methanolysis of triacylglycerols for biodiesel production using a solvent of the engineering method. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 55, p.118–125, 2008;

TACIN, M. V.; OLIVEIRA, R. C.; GATTÁS, E. A. L. Uso de alginato-quitosana e glioxil-agarose como suportes na imobilização da enzima álcool desidrogenase. **Alimentos e Nutrição**, v. 25, n. 1, 2014.

TALBERT, J. N.; GODDART, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 8-19, 2012.

TAVARES, F. **Uso de lipase vegetal a partir de sementes de mamona pra hidrólise enzimática de óleo de crambe**. Tese (Doutorado em engenharia química) – Programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, 2018.

TAVARES, F.; SACKSER, P.; PINZAN, F.; BORBA, C.E.; SILVA, E.A. Hidrólise do óleo de crambe empregando lipase vegetal extraída de sementes de diferentes oleaginosas. *In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. Anais do evento...* UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2015.

TERRASAN, C. R. F.; DE MORAIS JUNIOR, W. G.; CONTESINI, F. J. Enzyme Immobilization for Oligosaccharide Production. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, n. 2017, p. 415-423, 2019.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Immobilization of Burkholderia sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 112-119, 2012.

TITUS, M.P.; LECLERCQ, L.; CLACENS, J.M.; CAMPO, F.D.; RATAJ, V.N. Pickering interfacial catalysis for biphasic systems: From emulsion design to green reactions. **Angewandte Chemie**, v. 54, p. 2006-2021, 2015.

TU, Q.; LU, MINGMING.; KNOTHE, G. Glycerolysis with crude glycerin as an alternative pretreatment for biodiesel production from grease trap waste: Parametric study and energy analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 162, p. 504-511, 2017.

VALÉRIO, A. **Glicerólise enzimática de óleo de oliva utilizando surfactantes de grau alimentício em sistemas livre de solvente**. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos) – Programa de pós-graduação em engenharia de alimentos, Universidade Regional Integrada ao Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Rio Grande do Sul, 2009.

VESCOVI, V. **Extração, purificação, e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de pós-graduação em engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2012.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 36, p. 7461-7490, 2017.

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

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

WANG, X.; LI, D.; WANG, W.; YANG, B.; WANG, Y. A highly efficient immobilized MAS1 lipase for the glycerolysis reaction of n-3 PUFA-rich ethyl esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 25-31, 2016.

WANKHADE, G.; KAMBLE, S.; DESHMUKH, S.; JENA, L.; WAGHMARE, P.; HARINATH, B.C. Inhibition of mycobacterial CYP125 enzyme by sesamin and β -sitosterol: An *in silico* and *in vitro* study. **Biomedical and Biotechnology Research Journal**, v. 1, p. 49-54, 2017.

WEBB, E. C. Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. 6. ed. San Diego, California: Academic Press, 1992.

XUE, A. L.; Zhou, S.; Zhao, Y.; Lu, X.; Han, P. Adsorption of reactive dyes from aqueous solution by silylated palygorskite. **Applied Clay Science**. v. 48, n. 4, p. 638-640, 2010.

YANG, B.; HARPER, W.J; PARKIN, K.L.; CHEN, J. Screening of commercial lipases for production of mono- and diacylglycerols from butteroil by enzymic glycerolysis. **International Dairy Journal**, v. 4, issue 1, 1994, p. 1-13.

YANG, L.; LI.; SHAN, Y.; SHEN, S.; BAI, Y.; LIU, H. Recent advances in lipidomics for disease research. **Journal of Separation Science**, v. 39, p. 38-50, 2015.

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

YEOH, C.M.; CHOONG, T.S.Y.; ABDULLAH, L.C.; YUNUS, R.; SIEW, W.L. Influence of silica gel in production of diacylglycerol via enzymatic glycerolysis of palm olein. **European Journal of Lipid Science and Technology**, ed. 111, p. 599-606, 2009.

YIGITOGLU, M.; TEMOCIN, Z. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde-activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 66, n. 1-2, p. 130-135, 2010.

YUCEL, Y.; DEMIR, C.; DIZGE, N.; KESKINLER, B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, 4, p. 1496-1501, 2011.

YUCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource technology**, v. 102, n. 4, p. 3977-3980, 2011.

YUCEL, Y. Optimization of biocatalytic biodiesel production from pomace oil using response surface methodology. **Fuel Processing Technology**, v. 99, p. 97-102, 2012.

ZAAK, H.; SIAR, E.H.; KORNECKI, J.F.; LOPEZ, L.F.; PEDRERO, S.G.; ORTÍZ, J.J.V.; LAFUENTE, R.F. Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 117-123, 2017.

ZANATTA, P.; GABRIEL, M.; LONGARETTI, G.; DALCANTON, F.; DAL MAGRO, J.; MELLO. Hidrólise enzimática de lipídeos presents em efluentes. **Revista CSBEA**, v. 3, n. 1, 2017.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal Biological Chemistry**, v. 263, p. 8017-8021, 1988.

ZENEVICZ, M. C. P. **Hidroesterificação enzimática de óleos de soja e fritura em sistemas de ultrassom**. Tese (doutorado em engenharia química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol. Springer**, v. 93, p. 61-70, 2012.

ZHANG, N.; YANG, X.; FU, J.; CHEN, Q.; SONG, Z.; WANG, Y. Production of diacylglycerol-enriched oil by glycerolysis of soybean oil using a bubble column reactor in a solvent-free system. **Journal of Oleo Science**, v. 10, n. 2, p. 358, 2017a.

ZHANG, Z.; MA, XIANG; HUANG, H.; WANG, Y. Shea olein based specialty fats: Preparation, characterization and potential application. **LWT – Food Science and Technology**, v. 86, p. 492-500, 2017b.

ZHENG, J.; WEI, W.; WANG, S.; LI, X.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Immobilization of *Lipozyme TL 100L* for methyl esterification of soybean oil deodorizer distillate. **National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information**, 2018.

ZHONG, N.; LI, L.; XU, X.; CHEONG, L.Z.; ZHAO, X.; LI, B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis. **Food Chemistry**, v. 122, p. 228-232, 2010.

ZHOU, Y.; LI, K.; SUN, S. Simultaneous esterification and transesterification of waste phoenix seed oil with a high free fatty acid content using a free lipase catalyst to prepare biodiesel. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, 2021.

ZHU, R.; ZHOU, Q.; ZHU, J.; XI, Y.; HE, H. Organo-clays as sorbents of hydrophobic organic contaminants: sorptive characteristics and approaches to enhancing sorption capacity. **Clays Clay Miner**, v. 63, p. 199-221, 2015.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, 154, 133-141, 2012.

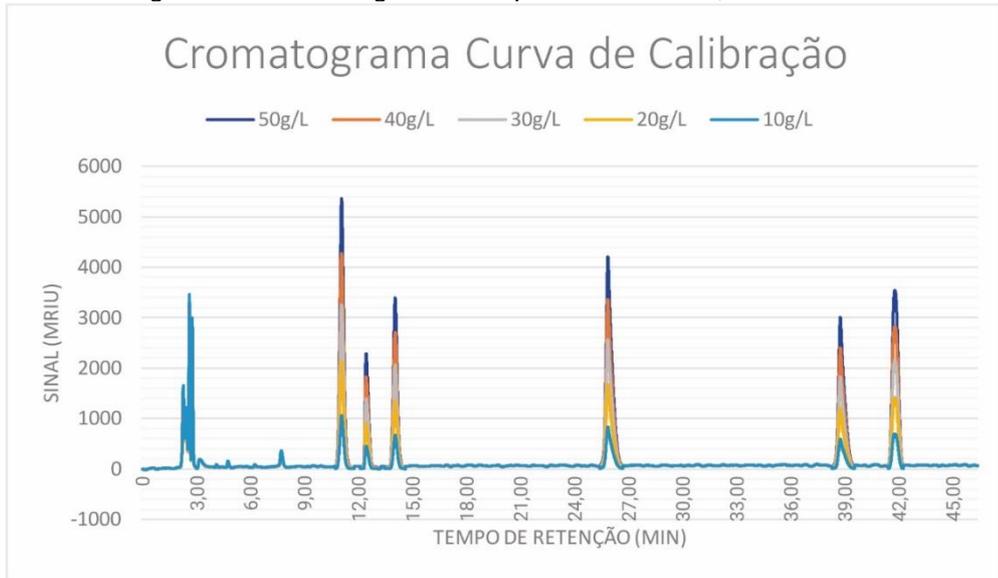
APÊNDICE

A) CURVA DE CALIBRAÇÃO

De acordo com a metodologia da AOAC (1996), a primeira série de picos observadas num cromatograma de TAG, MAG e DAG se refere ao solvente e restante de glicerol não utilizado na MO, esta afirmação pode de fato ser observado na Figura 34, sendo observado que o primeiro pico é referente à linoleína, enquanto o segundo é da oleína depois monopalmitol. É possível observar que esses três picos estão dentro da faixa dos 15 min de tempo de retenção, que são característicos dos MAG's, comportando-se da maneira esperada. A dioleína é observada no pico em 26,5 min., e os dois últimos picos, em, aproximadamente, 39 e 42 min., se referem às TAG trioleína e trilinoleína, respectivamente. É importante salientar que os tempos de retenção segundo a metodologia foram respeitados, tendo mais afinidade com a coluna. Esta separação bem-sucedida dos picos permitiu a obtenção e determinação de cada composto.

Os resultados obtidos na avaliação deste parâmetro de tempo de retenção podem ser observados nos trabalhos de PACHECO et al. 2014 e de YANG et al. 2015 em que os autores realizaram a quantificação de TAG, MAG e DAG de matrizes diferentes, o primeiro em matrizes de óleo de soja e o segundo na busca de emulsificantes para aplicar em medicamentos, para ambos, nos cromatogramas, primeiro saíram os MAG, depois os DAG os TAG, essa ordem pode estar relacionada pela interação com a coluna e com a fase móvel. Os MAG são obtidos em primeiro, pois apresentam uma maior interação com a fase móvel, neste caso, acetona:acetonitrila na proporção 1:1, sendo possível observar que os DAG têm uma interação intermediária e os TAG têm maior afinidade com a coluna C18 reversa, esta interação é possível entre os carbonos da coluna que têm forças de *Van der Waals* com os carbonos dos TAG, apresentando cadeia maior do que os MAG e DAG, por exemplo, e condizente com o cromatograma da Figura 39 e com os trabalhos de PACHECO et al. 2014 e de YANG et al. 2015.

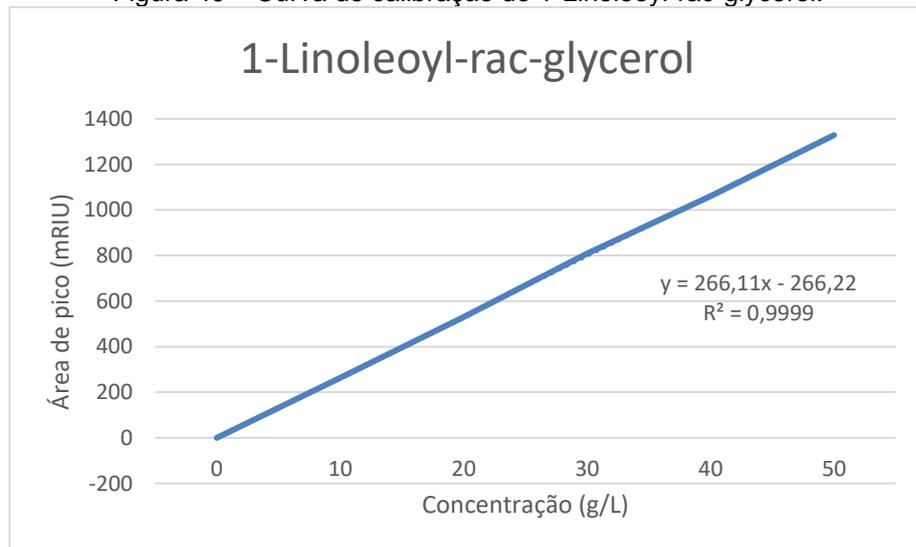
Figura 39 – Cromatograma com padrões de MAG, DAG e TAG.



Fonte: O autor.

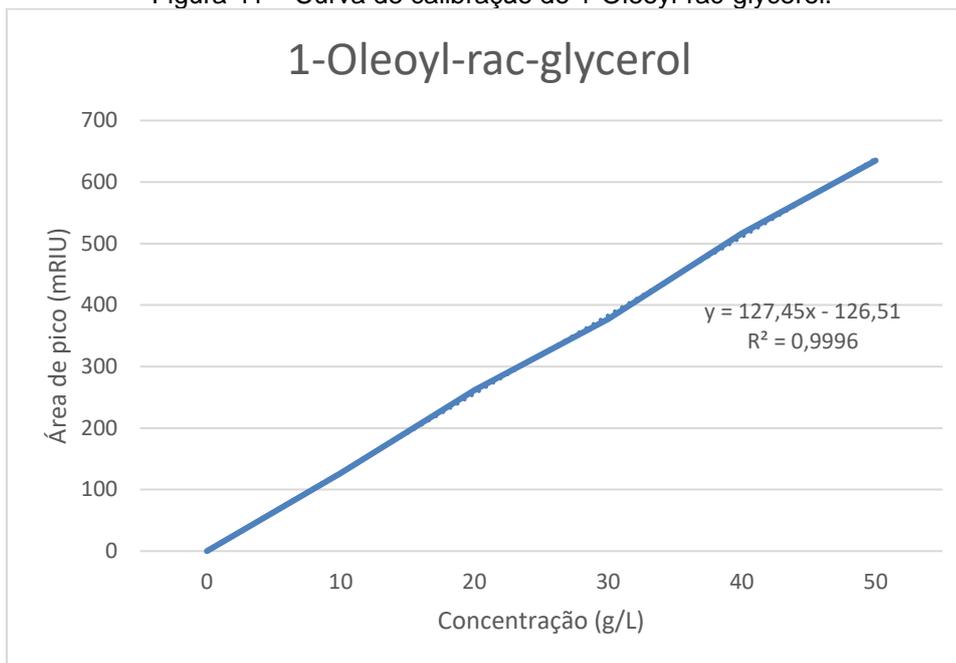
A determinação da linearidade de cada padrão na curva de calibração foi possível e, assim, realizou-se a plotagem dos gráficos individuais e determinou-se o coeficiente de determinação (R^2) de cada padrão da curva. Visando à aferição da curva de calibração, foi realizada de maneira coesa e coerente, para, assim, reconhecer quais são as linearidades dos resultados, sendo estes resultados observados nos gráficos das curvas de calibração que são apresentadas nas Figuras 40 a 45. Para tanto, utilizou-se a área de pico *versus* concentração usando sinais resposta para se contextualizar a linearidade da curva.

Figura 40 – Curva de calibração do 1-Linoleoyl-rac-glycerol.



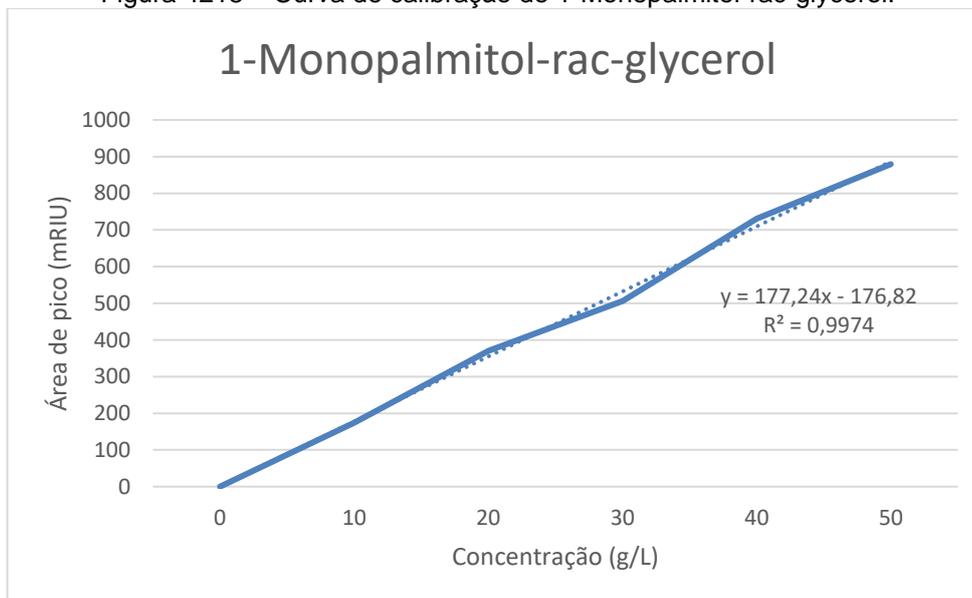
Fonte: O autor.

Figura 41 – Curva de calibração do 1-Oleoyl-rac-glycerol.



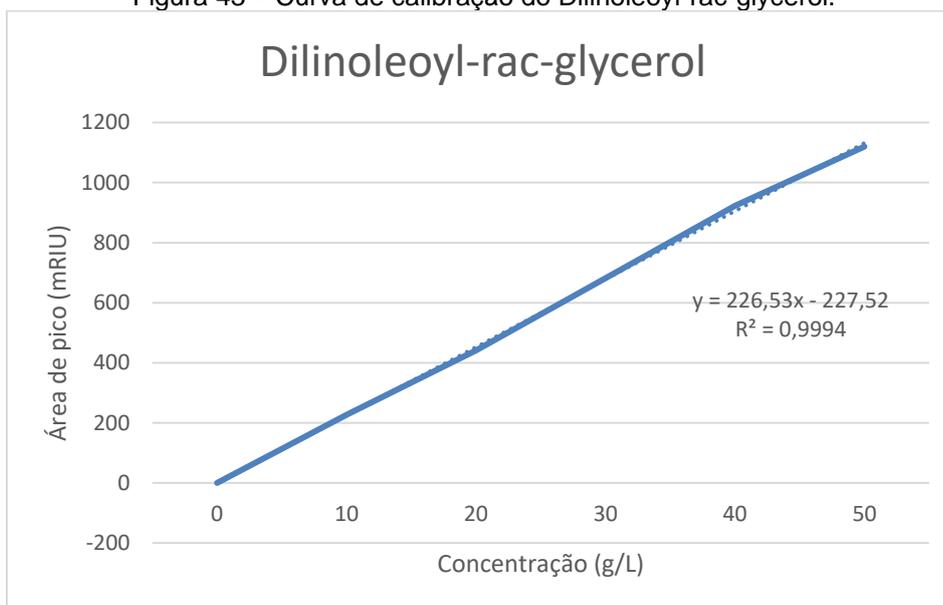
Fonte: O autor.

Figura 4215 – Curva de calibração do 1-Monopalmitol-rac-glycerol.



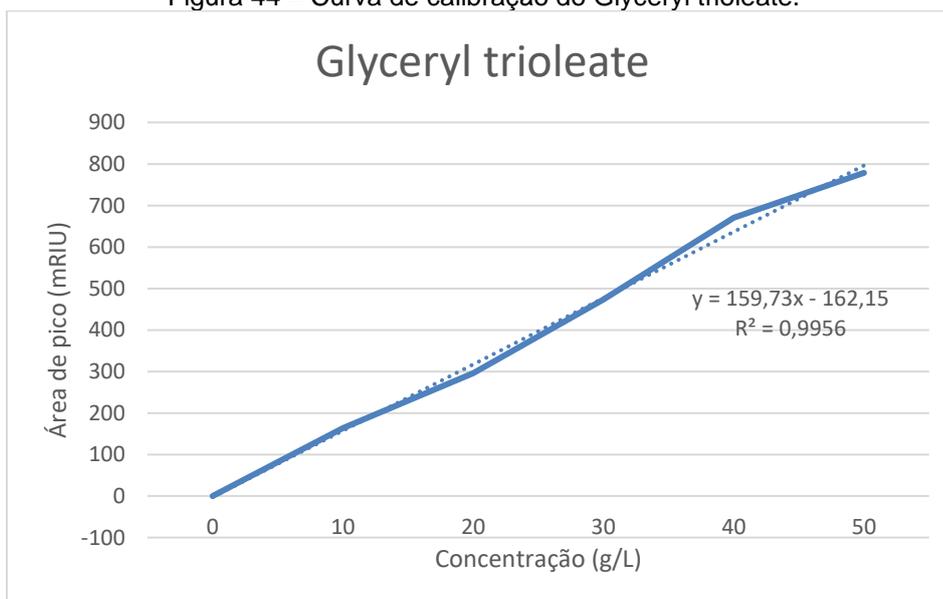
Fonte: O autor.

Figura 43 – Curva de calibração do Dilinoleoyl-rac-glycerol.



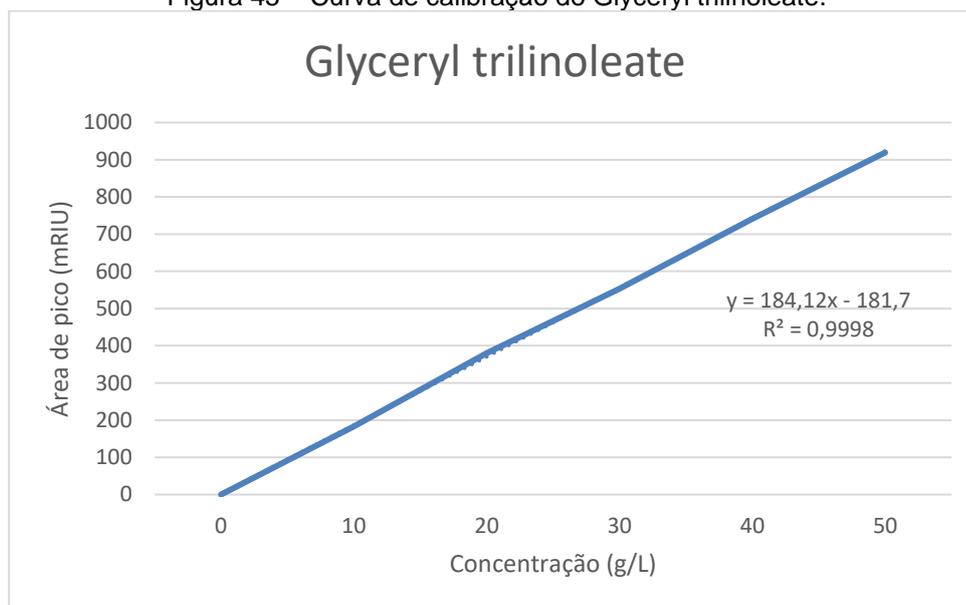
Fonte: O autor.

Figura 44 – Curva de calibração do Glyceryl trioleate.



Fonte: O autor.

Figura 45 – Curva de calibração do Glyceryl trilinoleate.



Fonte: O autor.

A quantificação dos padrões só foi possível por meio do uso da equação da reta, em que foi feita a substituição dos valores de y a área de pico do padrão e, assim, foi possível obter o valor de x. Observa-se que estes tiveram bastante variação para cada padrão, considerando sempre a conversão, nas amostras que apresentaram maior conversão, como exemplo para a 11 e 14, em que os valores da concentração de TAG foram considerados menores do que nas amostras com menores eficiências (LAN et al., 2015)

De acordo com Baesso e Souza (2010), o valor de R^2 nos confere a existência, ou não, que possa existir, entre correlação, a absorvância e concentração. Neste estudo, observou-se que todas as curvas de calibração os valores obtidos foram superiores a 0,99, observando-se que ocorreu concordância entre os dados, pois foi obtido um valor muito próximo a 1, caso seja realizada uma sequência do trabalho, este pode ser executado com uma curva de calibração de alta linearidade, dessa maneira tem-se a disposição um modelo adequado. Lima (2004), em seu estudo, ressalta que, nos resultados obtidos, foram observados valores de R^2 considerados altos e que, comparados aos resultados deste trabalho, demonstra que há confiabilidade nos resultados de toda pesquisa subsequente. Nesse sentido, é possível enfatizar que os padrões supracitados podem ser quantificados após leitura no CLAE, de maneira a respeitar toda a linearidade da curva de calibração.

O trabalho realizado por Fonseca (2015), no qual o autor semelhantemente usou o mesmo procedimento na quantificação de dois dos padrões citados nesta

pesquisa, a monooleína e dioleína, no qual o autor obteve coeficientes de determinação superiores a 0,99, ou seja, observa-se que os resultados foram semelhantes, o que também demonstra confiabilidade para quantificação dos padrões. Fonseca (2015) considerou, ainda, a conversão dos TAG em um sistema com um derivado enzimático da *Lipozyme TL IM* e, assim, agiu de forma a tratar a eficiência de catálise pela área e pico da região dos MAG, DAG e TAG, sendo que este autor utilizou apenas dois dos padrões existentes nas amostras, o que demonstra inviabilidade para tratar tal parâmetro por meio apenas desses padrões, desconsiderando todos os outros compostos presentes, assim realizou-se de forma semelhante com o presente trabalho, no qual a tal metodologia será explicada de maneira detalhada nos próximos tópicos.

B) RESULTADOS DAS ÁREAS DE PICO DOS PONTOS DAS MICROEMULSÕES DOS TESTES INICIAIS

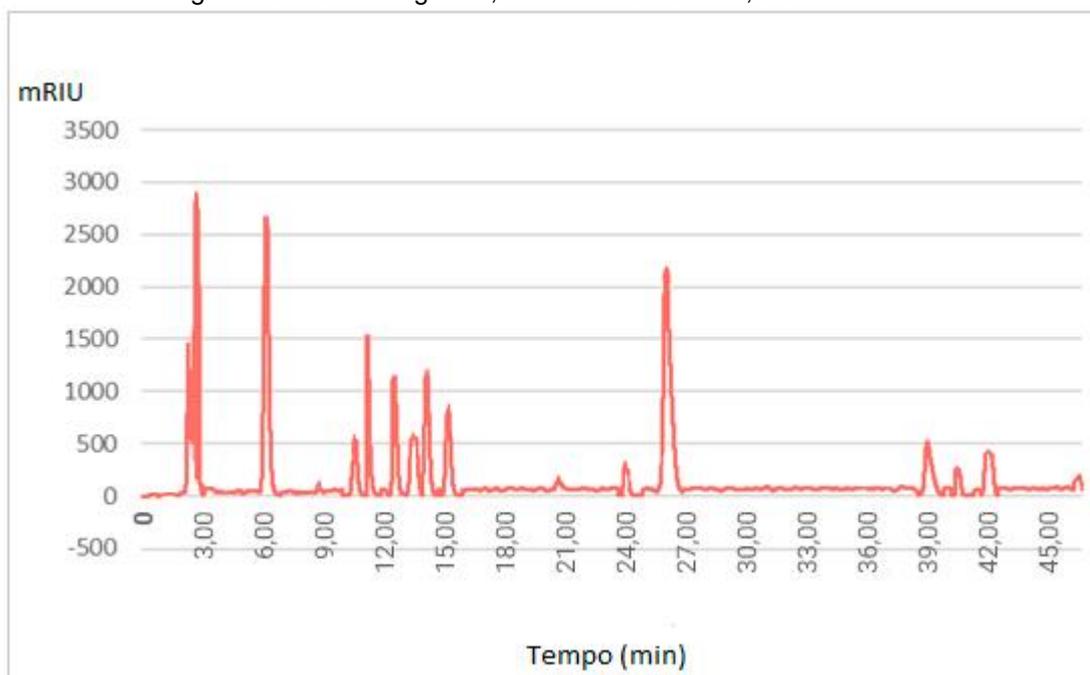
Tabela 346 – Área dos picos (Mriu) dos grupos AG's das MO's tratadas

MO	MAG	DAG	TAG	Solvente	Total
3	2963,30	1307,64	672,72	1161,77	6105,42
6	3256,62	1301,53	728,08	1197,79	6484,01
7	6459,33	2517,97	568,31	1138,22	10683,83
9	3602,24	1233,13	397,71	1214,59	6447,66
11	7015,40	2807,69	346,78	1127,66	11297,53
12	3704,22	1582,64	510,95	1267,81	7065,61
14	7382,31	2727,82	111,45	1127,82	11349,40
15	5659,67	2211,41	713,03	1064,85	9648,97
16	5734,16	2332,77	659,11	1191,25	9917,28
18	3514,47	1489,29	724,60	997,78	6726,13
20	4328,65	1784,93	629,47	1442,37	8185,42
22	4071,79	1798,13	700,00	1630,55	8200,47

Fonte: O autor.

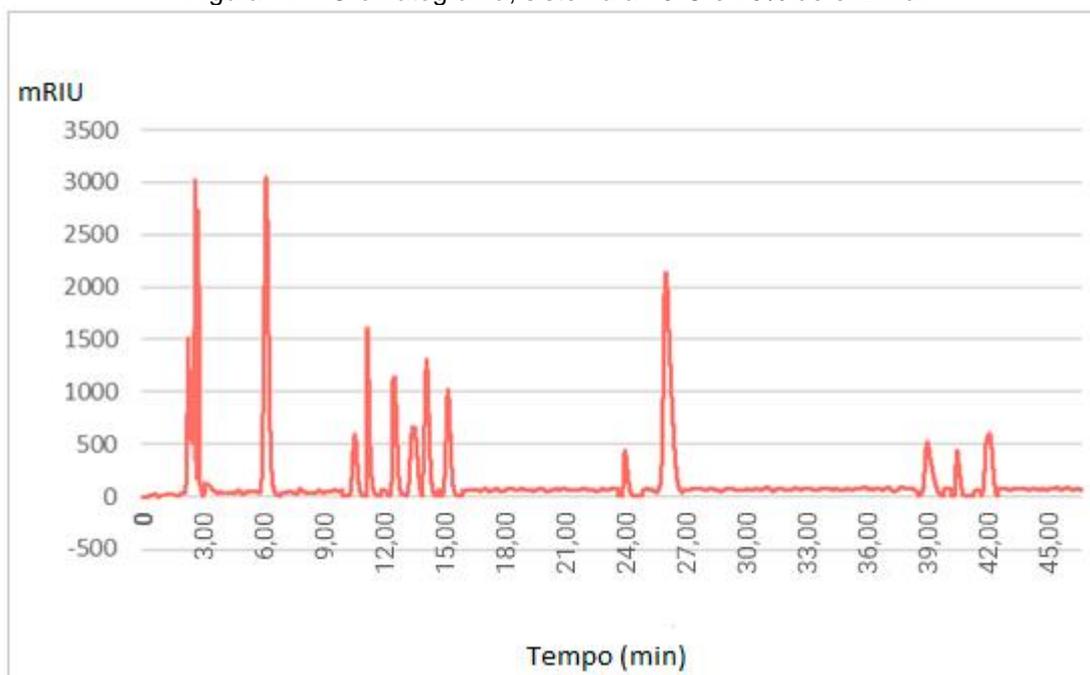
C) CROMATOGRAMAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO ITEM 4.8.1

Figura 46 – Cromatograma, sistema a 35°C e 11,02% de enzima.



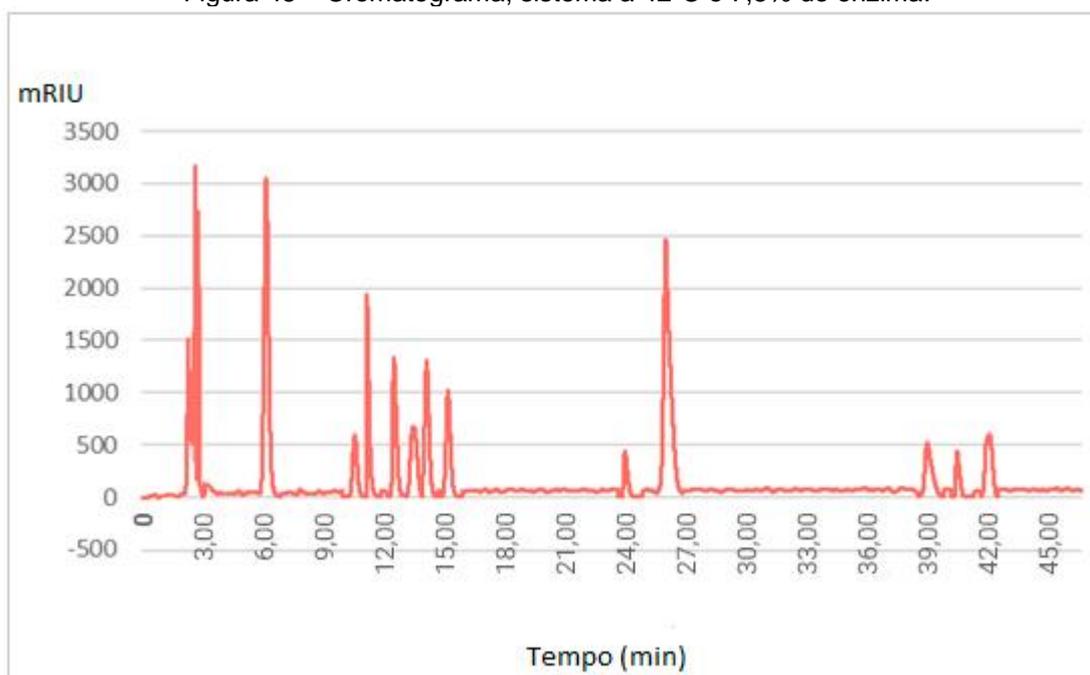
Fonte: O autor.

Figura 47 – Cromatograma, sistema a 40°C e 10% de enzima.



Fonte: O autor.

Figura 48 – Cromatograma, sistema a 42°C e 7,5% de enzima.



Fonte: O autor.